



HAL
open science

Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs innovant en thérapie photodynamique anticancéreuse dans le traitement du cancer colorectal

Rayan Chkair

► **To cite this version:**

Rayan Chkair. Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs innovant en thérapie photodynamique anticancéreuse dans le traitement du cancer colorectal. Sciences agricoles. Université de Limoges, 2024. Français. NNT : 2024LIMO0094 . tel-04959048

HAL Id: tel-04959048

<https://theses.hal.science/tel-04959048v1>

Submitted on 20 Feb 2025

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

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par

Rayan Chkair

Le 17 décembre 2024

**Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs innovants en
thérapie photodynamique anticancéreuse dans le traitement du
cancer colorectal**

Thèse dirigée par

M. **Bertrand LIAGRE**, Professeur des Universités, Université de Limoges, France
M. **Guillaume CHEMIN**, Maître de Conférences, Université de Limoges, France

JURY :

Président du jury

Mme **Mireille BLANCHARD-DESCE**, Directeur de Recherche CNRS, Université de
Bordeaux, France

Rapporteurs

Mme **Sandrine DABERNAT**, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de
Bordeaux, France

M. **Cédric CHAVEROUX**, Chargé de Recherche-HDR CNRS, Université de Lyon 1, France

Examineurs

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

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



A ma famille

“If you want to live a happy life, tie it to a goal, not to people or things.”

Albert Einstein

Remerciements

A Mme le Docteur Mireille BLANCHARD-DESCE

Je tiens sincèrement à vous remercier de me faire l'honneur d'être membre de ce jury et d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse. Merci infiniment pour votre implication au cours de la publication de mon article et de votre expertise. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de tout mon respect.

A Mme le Professeur Sandrine DABERNAT et à M. le Docteur Cédric CHAVEROUX

Veuillez accepter mes sincères remerciements pour me faire l'honneur de votre présence dans ce jury mais également d'accepter de juger mes travaux de thèse en tant que rapporteurs. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de tout mon respect. Je vous souhaite une bonne lecture !

A M. le Professeur Vincent SOL

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. Merci également pour nos échanges lors des différentes réunions et merci encore une fois pour votre investissement dans la synthèse des nanoparticules. Je vous exprime tout mon respect.

A Mme le Professeur Mona DIAB-ASSAF

Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée dès le début de cette thèse, ainsi que pour votre soutien. Je vous exprime ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

A M. le Docteur Guillaume CHEMIN

Je tiens à te remercier énormément de m'avoir fait confiance durant ces années de thèse. Merci pour ton encadrement, tes conseils, ton aide et ton temps au cours de ces trois années. Merci encore une fois pour ton encouragement au cours de nos échanges. Soyez assuré Guillaume, de toute ma reconnaissance et tout mon respect.

A M. le Professeur Bertrand LIAGRE

Un grand merci pour votre encadrement, tous vos conseils, ainsi que vos encouragements au cours de nos échanges. Merci pour votre disponibilité malgré vos nombreuses fonctions. Merci également pour les moments d'échanges que nous avons passés à Kochel am See malgré la situation au Liban qui continue de toucher profondément mon pays ! Malgré tout, cette réussite est pour moi la preuve que la persévérance et la passion peuvent nous mener loin, même dans les périodes les plus sombres. Je vous exprime ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

A Mme Aline PINON

Merci pour ta disponibilité, ta dynamique, tes conseils avisés et très utiles. Merci pour ton aide technique lors de la révision de l'article. Merci pour ton implication et ta bonne humeur.

A Mme Frédérique MARTIN

Je te remercie Fred pour nos petits échanges et ta présence au quotidien, cela a été un plaisir de faire ta connaissance.

A Mme Catherine OUK et à Mme Claire CARRION

Je tiens à vous remercier sincèrement pour votre aide dans l'analyse en cytométrie en flux et en microscopie confocale. Un grand merci pour votre temps.

Aux doctorants du laboratoire

A Suzan, Hind, Cécile, Soufiane et Luce, je vous remercie pour nos moments d'échanges ensemble, cela a été un plaisir de faire votre connaissance. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

A tous les stagiaires

A Mehdi, Samuel, Célia et Sadia, j'espère que mon encadrement durant vos stages a pu vous apporter un petit quelque chose ce soit scientifiquement ou personnellement qui restera. J'espère que j'ai pu vous aider durant votre passage au laboratoire.

A Justine COUVEZ

Je te remercie sincèrement pour la synthèse des nanoparticules FONPs[Cp6], et pour les moments d'échanges à Bordeaux, cela a été un plaisir de faire ta connaissance.

A Layla et Nader

Je vous remercie pour tous ces souvenirs durant ces années à Limoges et ces beaux moments ensemble. M. « Bayda » merci de m'avoir toujours aidé sans hésitation. Je vous souhaite le meilleur dans vos vies.

A ma famille

A mes parents, sans qui évidemment tout cela ne serait pas possible. Merci d'être mon pilier, ma source d'inspiration tout au long de ces années. C'est à vous que je dédie ce travail, sans vous il n'aurait pas vu le jour. Je vous aime jusqu'à l'infini.

A la personne qui continue à me supporter !

Je vais faire bref, tu sais déjà tout, merci d'avoir toujours été là, dans les bons et les mauvais moments, toujours à mes côtés...

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 4.0 France** »
disponible en ligne <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>



Table des matières

Remerciements	5
Liste des abréviations	15
Introduction	19
Partie I. Le cancer colorectal	20
I.1. Généralités sur le cancer	20
I.2. Anatomie et rôles physiologiques du côlon	22
I.3. Vascularisation du côlon	24
I.4. Histologie du côlon.....	25
I.5. Les pathologies du côlon	25
I.5.1. La diverticulose du côlon	26
I.5.2. Le syndrome du côlon irritable.....	27
I.5.3. Les maladies inflammatoires chroniques	27
I.6. Le cancer colorectal.....	28
I.6.1. Epidémiologie du cancer colorectal	28
I.6.2. Facteurs de risques	29
I.6.3. Dépistage	30
I.6.4. Physiopathologie	31
I.6.5. Diagnostic	34
I.6.6. Symptômes	35
I.6.7. Classification TNM.....	35
I.6.8. Traitements	39
I.6.8.1. La chirurgie	39
I.6.8.2. La radiothérapie	40
I.6.8.3. La chimiothérapie.....	40
I.6.8.4. L'immunothérapie.....	42
I.6.8.5. Les thérapies ciblées	43
I.6.8.6. Les régimes	45
I.6.9. Résistance au CCR	45
Partie II. La thérapie photodynamique	47
II.1. Historique.....	47
II.2. Principe de la PDT	48
II.3. Mécanismes de la PDT	48
II.4. Les réactions photochimiques.....	51
II.4.1. Les réactions photochimiques de type I.....	51
II.4.2. Les réactions photochimiques de type II.....	52
II.5. Mécanismes d'action médiés par la PDT	54
II.5.1. Mécanismes directs.....	55
II.5.2. Mécanismes indirects	56
II.5.2.1. Mécanismes vasculaires	56
II.5.2.2. Mécanismes immunologiques	57
II.6. Les éléments de la PDT	57
II.6.1. La lumière	57
II.6.2. L'oxygène moléculaire	62
II.6.3. Les photosensibilisateurs	62

II.6.3.1. Propriétés des PS idéaux.....	62
II.6.3.2. Les PS tétrapyrroliques.....	63
II.6.3.3. Les PS non tétrapyrroliques.....	69
II.7. Le photoblanchiment des PS.....	70
II.8. Ciblage tumoral.....	70
II.9. Les avantages et les limites de la PDT.....	73
II.10. La PDT dans le traitement du CCR.....	73
II.11. La purpurine-18.....	76
II.12. La Pp-18 dans la PDT anticancéreuse.....	78
Partie III. Les nanoparticules.....	79
III.1. Intérêt des nanoparticules.....	79
III.2. Les différents types de nanoparticules.....	79
III.2.1. Nanoparticules organiques.....	79
III.2.1.1. Liposomes.....	80
III.2.1.2. Les nanoparticules polymériques.....	81
III.2.1.3. Les Cyclodextrines.....	82
III.2.2. Les nanoparticules inorganiques.....	83
III.2.2.1. Les nanoparticules de silice.....	83
III.2.2.2. Les nanoparticules d'or.....	84
III.3. Voies passives et actives.....	84
III.4. Les nanoparticules de première génération.....	85
III.5. Les nanoparticules de deuxième génération.....	86
III.6. Les nanoparticules de troisième génération.....	87
III.7. Les nanoparticules et la PDT dans le traitement du CCR.....	88
Partie IV. L'apoptose.....	90
IV.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose.....	91
IV.2. Les voies d'induction de l'apoptose.....	91
IV.3. Les caspases : les éléments clés de l'apoptose.....	92
IV.3.1. Structure des caspases.....	92
IV.3.2. L'activation des caspases.....	93
IV.3.3. Les cibles cellulaires des caspases.....	94
IV.4. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale.....	95
IV.4.1. Les protéines de la famille Bcl-2.....	98
IV.5. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.....	99
IV.6. L'apoptose et la PDT anticancéreuse.....	101
Partie V. L'autophagie.....	103
V.1. La micro-autophagie.....	104
V.2. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes.....	104
V.3. La macro-autophagie.....	105
V.4. Les étapes de l'autophagie.....	105
V.4.1. L'initiation.....	105
V.4.2. L'élongation.....	106
V.4.3. La maturation.....	107
V.5. Paradoxe de l'autophagie dans les cancers.....	108
V.6. L'autophagie et la PDT anticancéreuse.....	110
Projet de recherche.....	112

Partie VI. Matériels et méthodes.....	114
Partie VII. Résultats.....	125
VII.1. Application des FONPs[Cp6] dans le traitement du CCR.....	126
VII.1.1. Article 1	126
VII.1. Application des FONPs[Cp6] dans le traitement du CCR.....	128
VII.1.2. Article 2	128
VII.1.3. Résultats supplémentaires de l'utilisation des FONPs[Cp6]	130
VII.1.3.1. Analyse de la viabilité cellulaire après traitement à la Pp-18 seule	130
VII.1.3.2. Localisation cellulaire des FONPs[Cp6]	131
VII.1.3.3. Analyse quantitative des caspases-3/7 activées	132
VII.1.3.4. Analyse des différents marqueurs de l'autophagie par Western-blot.....	135
VII.1.3.5. L'activité anticancéreuse des FONPs[Cp6] dans les cultures 3D	138
VII.2. Application d'un nouveau dérivé purpurinimide adamantane vectorisé dans nanocristaux de cellulose couplés à des cyclodextrines cationiques dans le traitement du CCR.....	143
VII.2.1. Article 3.....	143
VII.2.1.1. Résultats supplémentaires d'application des NCCs/ β -CD+ dans le traitement du CCR.....	145
Discussion et Perspectives.....	147
Références bibliographiques	152

Table des illustrations

Figure 1. Dernières statistiques estimant le nombre de nouveaux cas de cancer (A) et de nouveaux décès (B) dans le monde pour les deux sexes en 2022	21
Figure 2. Localisation du côlon chez l'être humain	23
Figure 3. Organisation du côlon.....	23
Figure 4. Vascularisation du côlon	24
Figure 5. Histologie du côlon	25
Figure 6. La diverticulose et la diverticulite du côlon.....	26
Figure 7. Les maladies inflammatoires chroniques du côlon.....	28
Figure 8. Polypose adénomateuse familiale (PAF) par coloscopie	30
Figure 9. Dépistage du CCR selon trois niveaux de risque	31
Figure 10. Les polypes adénomateux tubuleux (A) et tubulo-villeux (B)	32
Figure 11. Les lésions dentelées sessiles.....	33
Figure 12. Chirurgie du cancer du côlon par anastomose.....	39
Figure 13 . La colostomie du côlon.....	40
Figure 14. Métabolisme du 5-FU	42
Figure 15. Traitements bloquant les points de contrôle immunitaire	43
Figure 16. Voies offrant des sites potentiels pour une thérapie ciblée du CCR	45
Figure 17. Histoire de la thérapie photodynamique	47
Figure 18. Principe de la PDT.....	48
Figure 19. Principe de la PDT et du PD	49
Figure 20. Intervention chirurgicale pour l'ablation des tumeurs urétérales guidée par le PD.	50
Figure 21. Les réactions photochimiques de type I	51
Figure 22. Les réactions photochimiques de type II.....	52
Figure 23. Diagramme de Jablonski modifié décrivant le processus de la PDT	53
Figure 24. Mécanisme de la réaction photodynamique et les effets biologiques	54
Figure 25. Effets de la PDT sur les cellules cancéreuses	56
Figure 26. Pénétration de la lumière dans la peau	59
Figure 27. Activation du PS par excitation à un photon et excitation à deux photons.....	61
Figure 28 . Cycle de biosynthèse de l'hème et rôle de la PpIX induite par l'ALA	66
Figure 29. Types de ciblage cellulaires.....	72

Figure 30. Le processus de dégradation biologique de la chlorophylle peut conduire à la purpurine 18	76
Figure 31. Formule de la Pp-18	77
Figure 32. Spectre UV de la Pp-18 dans le chloroforme	77
Figure 33. Les différentes nanoparticules organiques utilisées pour la PDT	80
Figure 34. Représentation schématique modifiée d'un liposome	81
Figure 35. Les différents types de cyclodextrines	82
Figure 36. Ciblage passif et actif des tumeurs par les nanoparticules	85
Figure 37. Les trois générations de nanoparticules	86
Figure 38. Structure chimique du polyéthylène glycol (PEG)	87
Figure 39. Stratégies de nanoparticules ciblées pour le CCR	88
Figure 40. Les trois voies les plus connues de la mort cellulaire	90
Figure 41. Défaut d'activité apoptotique au cours de la différenciation des membres chez la souris	91
Figure 42. Structure des caspases	93
Figure 43. Activation des caspases	94
Figure 44. Les cibles cellulaires des caspases	95
Figure 45. Formation de l'apoptosome	96
Figure 46. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale	97
Figure 47. Les protéines de la famille Bcl-2	98
Figure 48. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort	99
Figure 49. Interaction entre les deux voies apoptotiques	100
Figure 50. Les différentes voies de mort cellulaire induites par la PDT	102
Figure 51 . Les différents types d'autophagie dans la cellule	103
Figure 52. Le tube autophagique caractérisant la micro-autophagie	104
Figure 53 . L'initiation de l'autophagie	106
Figure 54. Modèle simplifié de la formation des autophagosomes	107
Figure 55. Modèle schématique du processus d'autophagie	108
Figure 56. Relation entre l'autophagie et l'apoptose	111
Figure 57. Synthèse de la Pp-18 à partir de la chlorophylle	115
Figure 58. La synthèse des FONPs[Cp6]se fait en plusieurs étapes.	116
Figure 59. Principe du test MTT	118
Figure 60. Concept du test au tétrazolium MTS	124

Figure 61. Effets cytotoxiques in vitro de la Pp-18 sur les lignées cellulaires HCT116 et HT-29	130
Figure 62. Internalisation cellulaire des FONPs[Cp6] dans les cellules HCT116 (A) et HT-29 (B)	132
Figure 63. Quantification de l'activité des caspases-3/7 dans les cellules HCT116 (A) et HT-29 (B)	135
Figure 64. Effets de la photoactivation des FONPs[Cp6] sur l'expression des protéines dans les cellules HCT116 (A) et HT-29 (B)	137
Figure 65. Images représentatives de l'évaluation morphologique des sphéroïdes de la lignée HT-29 cultivées en 3D.	139
Figure 66. Effets cytotoxiques des FONPs[Cp6] sur les sphéroïdes de la lignée HT-29.	140
Figure 67. Images représentatives de l'évaluation morphologique des sphéroïdes de HT-29 au cours du temps.....	141
Figure 68. Vectorisation de la Pp-18 par les nanocristaux de cellulose	144
Figure 69. Effets de la photoactivation des NCCs/ β -CD+/PIA et du PIA seul sur l'expression des protéines dans les cellules HCT116.....	145
Figure 70. Effets de la photoactivation des NCCs/ β -CD+/PIA et du PIA seul sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116 du CCR	146
Figure 71. Les voies endocytaires dans la cellule eucaryote	148

Table des tableaux

Tableau 1. Classification TNM – Les indicateurs de la lettre T.....	36
Tableau 2 . Classification TNM – Les indicateurs de la lettre N	37
Tableau 3. Classification TNM – Les indicateurs de la lettre M.....	37
Tableau 4. Les différents stades du CCR selon la classification TNM	38
Tableau 5. Exemple du PS de première génération cliniquement utilisé en PDT	64
Tableau 6. Exemples du PS de deuxième génération cliniquement utilisés en PDT.....	65
Tableau 7. Exemples de nanoparticules utilisées comme vecteurs de PS dans la PDT	68
Tableau 8. Exemples de composés naturels utilisés comme PS	69
Tableau 9. Quelques études précliniques in vitro de la PDT réalisées sur des cellules de CCR	75
Tableau 10 . Essais cliniques de PDT basés sur des nano-systèmes au cours des dix dernières années	89
Tableau 11. Dilution des anticorps primaires	122
Tableau 12. Valeurs des IC ₅₀ déterminées par des tests MTT sur les lignées cellulaires HCT116 et HT-29.....	131

Liste des abréviations

3-MA : 3-méthyladénine

5-ALA : acide 5-aminolévulinique

5-FdUMP : 5-fluorodésoxyuracile monophosphate

5-FU : 5-fluorouracil

5-FUTP : 5-fluorouridine triphosphate

A

ACE : antigène carcino-embryonnaire

ADN : acide désoxyribonucléique

AIF : apoptosis-inducing factor

AJCC : american joint committee on cancer

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

Apaf-1 : apoptosis protease-activating factor-1

ARN : acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : adénosine triphosphate

B

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2

BCL-XL : B-cell lymphoma-extra large

BID : BH3 Interacting Domain Death Agonist

BH : Bcl-2 homology

BSA : albumine de sérum bovin

C

CARD : caspase activation and recruitment domain

CCR : cancer colorectal

CD : cyclodextrine

Ce6 : chlorine e6

Chl : chlorophylle

Cp6 : chlorine p6

CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

D

DCF : 2',7'-dichlorofluorescéine

DCFDA : 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate

DD : death domain

DED : death effector domain

DISC : death inducing signaling complex

DMSO : diméthylsulfoxyde

DR5 : récepteur de mort 5

E

Effet EPR : enhanced permeability and retention effect

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

F

FADD : Fas-associated death domain

FDA : Food and Drug Administration

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

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

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

FONPs : soft fluorescent organic nanoparticles

G

Gènes ATG : autophagy related genes

H

HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain

Hp : Hematoporphyrin

HpD : Hematoporphyrin derivative

HpD : hematoporphyrin derivative

HRP : peroxydase de raifort

I

IAPs : inhibitor apoptosis proteins

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane

IP : iodure de propidium

L

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

LC3-PE : light chain 3-phosphatidylethanolamine

LDL : low density lipoproteins

M

MEC : matrice extracellulaire

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization

MSI : instabilité microsatellitaire

m-THPC : méso-tétrahydroxyphénylchlorine

mTOR : mechanistic target of rapamycin

mTORC1 : mechanistic target of rapamycin complex 1

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

O

OMS : organisation mondiale de la Santé

P

PAF : polypose adénomateuse familiale

PARP : poly(ADP-ribose)-polymérase

PBS : tampon phosphate salin

Pc 4 : phtalocyanine 4

PD : photodiagnostic

PD1 : programmed cell death 1

PDT : thérapie photodynamique

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : polyéthylène glycol

Phénomène MDR : phénomène de résistance multiple aux anticancéreux

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate

POD : anticorps couplé à la peroxydase

PpIX : protoporphyrine IX

Pp-18 : purpurine-18

PS : photosensibilisateur

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

PVDF : polyfluorure de vinylidène

R

RAF : rapidly accelerated fibrosarcoma

RIP3 : receptor-interacting protein 3

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

Raptor : regulatory-associated protein of mTOR

S

SCI : syndrome du côlon irritable

SEM : erreur type de la moyenne

SVF : sérum de veau foetal

T

TIF : test immunochimique fécal

TNF : tumor necrosis factor

TNFR : tumor necrosis factor receptor

TRADD : TNF receptor associated death domain

TRAIL : TNF related apoptosis inducing ligand

U

ULK : Unc-51-like kinase

V

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

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

VPS34 : vacuolar protein sorting 34

Introduction

Partie I. Le cancer colorectal

I.1. Généralités sur le cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle qui altère l'organisme au niveau moléculaire et cellulaire. Ces altérations reflètent des changements génétiques à l'origine du développement tumoral [1]. Dans leur revue publiée en 2000, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg expliquent les altérations qui entraînent la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Selon eux, six modifications acquises au cours du développement tumoral donnent aux cellules cancéreuses un mécanisme de défense, probablement commun à tous les cancers : maintien d'une signalisation proliférative, insensibilité aux signaux suppresseurs de croissance, résistance à la mort cellulaire (apoptose), pouvoir de réplication illimité, induction d'angiogenèse, invasion et métastase. Plus récemment, ils ont mis en évidence deux modifications supplémentaires en plus des six mentionnées, qui pourraient influencer le développement tumoral, à savoir la reprogrammation du métabolisme cellulaire et l'échappement à la destruction immunitaire [2].

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer est considéré comme la deuxième cause de décès dans le monde, après les maladies cardiovasculaires, avec 9 743 832 personnes qui sont décédées d'un cancer et 19 976 499 de nouveaux cas de cancers qui ont été rapportés en 2022 (**Figure 1**). La répartition du cancer diffère entre les pays, en raison de divers facteurs comme le mode de vie, l'alimentation et les mesures prises pour la prévention. Le cancer du poumon occupe la première cause de mortalité dans la population mondiale, c'est également le cas en France. En seconde cause, on trouve le cancer colorectal (en France également) (**Figure 1C**).

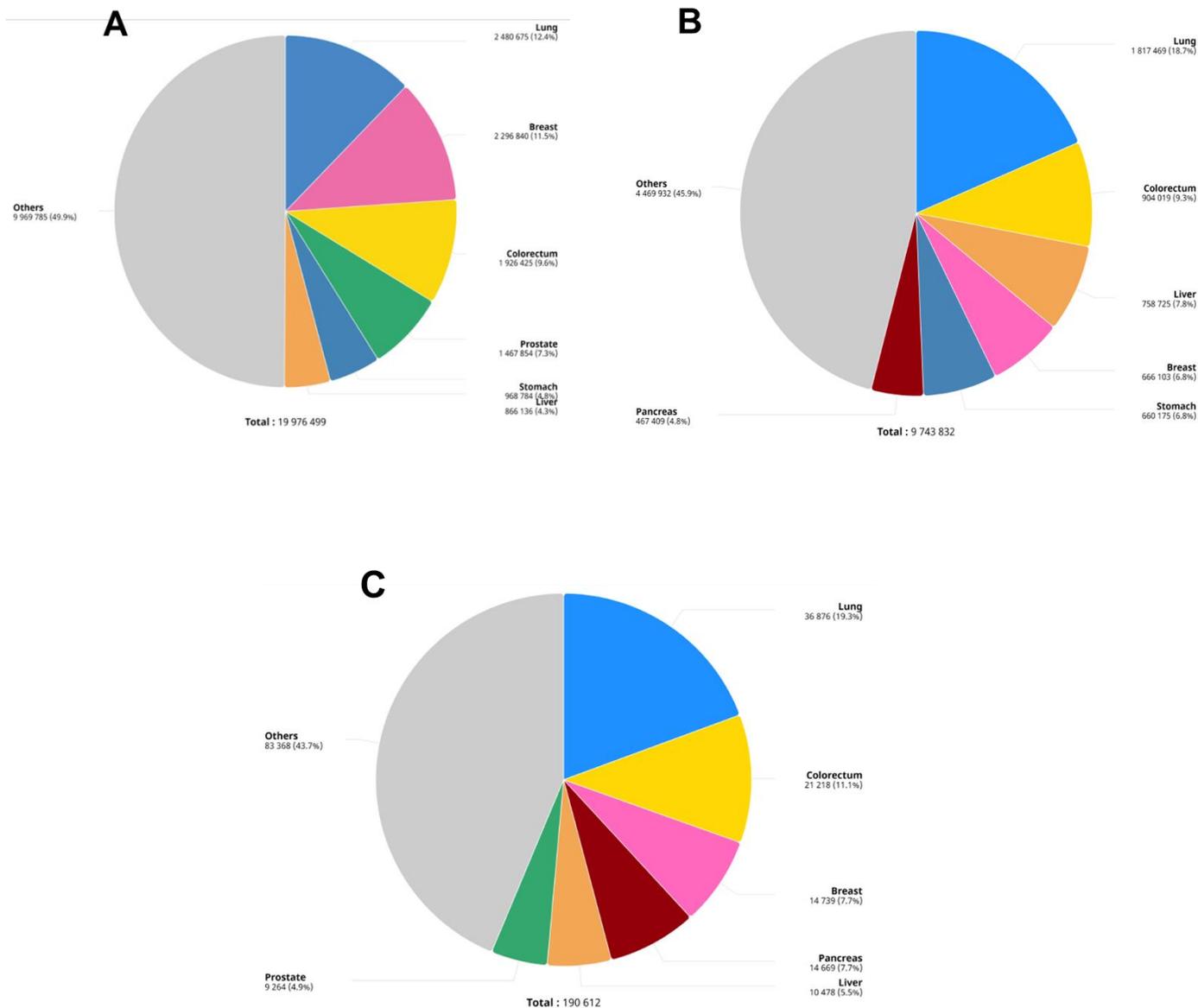


Figure 1. Dernières statistiques estimant le nombre de nouveaux cas de cancer (A) et de nouveaux décès (B) dans le monde pour les deux sexes en 2022. (C) La mortalité associée aux cancers en France en 2022. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (<https://gco.iarc.who.int>).

I.2. Anatomie et rôles physiologiques du côlon

Le côlon, ou gros intestin, est un organe constituant la partie terminale du tube digestif, relié à l'intestin grêle à une extrémité et à l'anus de l'autre. Mesurant environ 1,5 m de longueur, il est subdivisé en plusieurs parties : cæcum, côlon, rectum et se termine par l'anus (**Figure 2**).

- Le cæcum : correspond à la première partie du côlon, et fait partie du côlon ascendant. Il est séparé de l'iléon (la dernière partie de l'intestin grêle) par la valvule iléo-cæcale (également appelée valvule de Bauhin) ; c'est là que les restes alimentaires provenant de l'iléum s'accumulent.
- Le côlon ascendant : également appelé côlon droit, il s'agit d'un conduit remontant verticalement de 15 à 20 cm depuis le cæcum jusqu'au foie, où il forme un angle appelé angle colique droit. Sa face postérieure est directement en contact avec la paroi abdominale, ce qui lui confère une légère mobilité.
- Le côlon transverse : il est recouvert par le péritoine et s'étend de 24 à 40 cm jusqu'à l'angle colique gauche.
- Le côlon descendant (côlon gauche) : situé du côté gauche de l'abdomen, il mesure environ 15 à 20 cm de longueur. À son extrémité, un ligament l'attache à la paroi de la cavité pelvienne.
- Le côlon sigmoïde : situé dans le quadrant inférieur gauche de l'abdomen, il s'étend sur 40 cm de longueur de la fosse iliaque gauche jusqu'au rectum. Ce parcours confère au côlon sigmoïde sa forme typique en « S ».
- Le rectum est la partie finale du côlon qui se connecte au côlon sigmoïde d'environ 15 cm de longueur. Il reçoit les déchets du côlon et les stocke jusqu'à ce qu'ils soient évacués du corps par l'anus (**Figure 3**).

Le côlon remplit trois fonctions principales : l'absorption de l'eau et des électrolytes, la production et l'absorption de vitamines (telles que les vitamines B12 et K), et la formation et la propulsion des matières fécales vers le rectum pour les éliminer. La majorité des nutriments et jusqu'à 90 % de l'eau sont absorbés par l'intestin grêle. Lorsque les résidus alimentaires arrivent dans le côlon, le côlon ascendant a pour fonction d'absorber l'eau restante et les autres nutriments essentiels, puis de les solidifier pour former les selles. Les matières fécales sont stockées dans le côlon descendant, puis évacuées dans le rectum. La contraction du côlon sigmoïde entraîne une augmentation de la pression à l'intérieur du côlon, ce qui provoque le déplacement des selles dans le rectum [3].

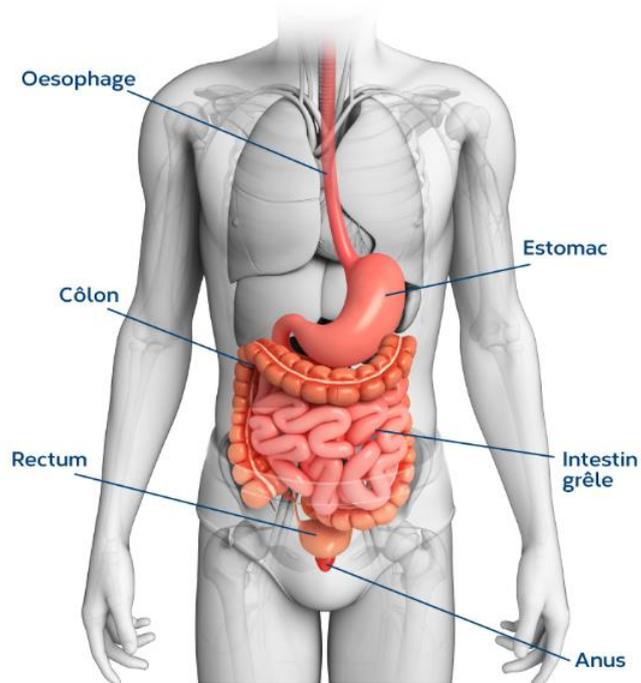


Figure 2. Localisation du côlon chez l'être humain [4].

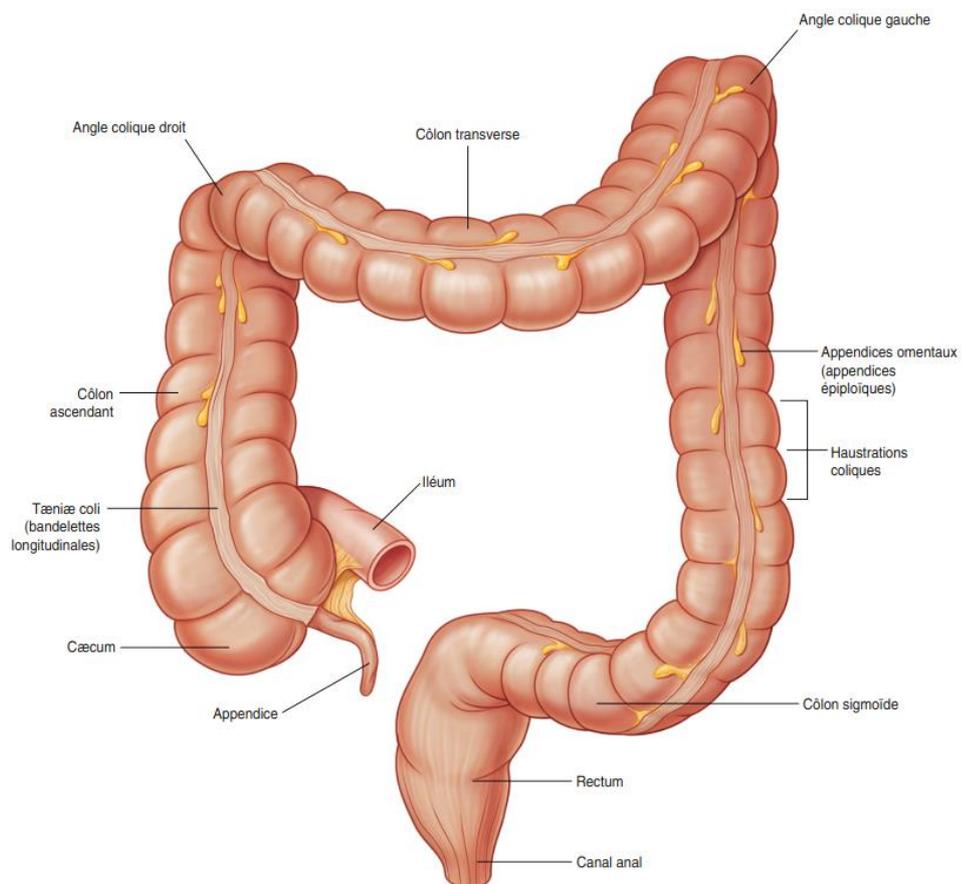


Figure 3. Organisation du côlon [5].

I.3. Vascularisation du côlon

Le côlon est irrigué par les branches de l'artère mésentérique supérieure et inférieure. Le côlon ascendant et les deux tiers proximaux du côlon transverse sont vascularisés par l'artère iléocolique et l'artère colique droite, branches collatérales du bord droit de l'artère mésentérique supérieure. Les artères caecales antérieure et postérieure, branches terminales de l'artère iléocolique, fournissent une vascularisation au cæcum. La vascularisation de l'appendice est assurée par l'artère appendiculaire qui provient de l'artère cæcale postérieure. Le rectum et le canal anal sont alimentés par des branches de l'artère mésentérique supérieure et des artères iliaques internes. Le reste du côlon est vascularisé par l'artère colique gauche et le tronc des artères sigmoïdes, branches collatérales de l'artère mésentérique inférieure (**Figure 4**). Les veines du côlon accompagnent étroitement les artères correspondantes, elles rejoignent la veine porte par des veines mésentériques supérieures ou inférieures.

Le système lymphatique suit généralement les vaisseaux et se divise en cinq groupes : épocolique, paracolique, intermédiaire, principal et central. L'innervation du côlon est assurée par les nerfs autonomes sympathiques et parasympathiques [5].

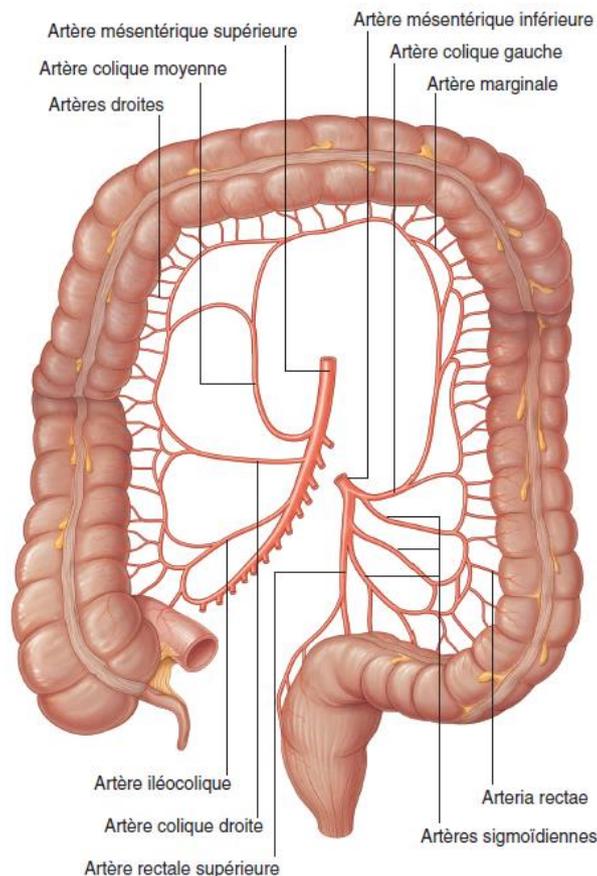


Figure 4. Vascularisation du côlon [5].

I.4. Histologie du côlon

La paroi du côlon est composée de quatre couches distinctes qui se superposent :

- La muqueuse : contrairement à celle de l'intestin grêle, la muqueuse colique ne présente pas de villosités, on trouve notamment des cryptes ou glandes de Lieberkühn. L'épithélium des cryptes est formé principalement par des cellules caliciformes (mucosécrétantes) et des cellules absorbantes ou entérocytes qui absorbent de l'eau et des vitamines produites par la flore bactérienne colique.
- La sous-muqueuse : elle est formée de tissu conjonctif lâche, avec des vaisseaux sanguins, lymphatiques, et des terminaisons nerveuses.
- La musculuse : elle est constituée de deux couches de muscles lisses : la couche interne circulaire et la couche externe longitudinale. Ce dernier présente des renforcements musculaires longitudinaux appelés bandelettes. Un réseau élastique puissant existe entre les couches, nommé le plexus d'Auerbach.
- La couche séreuse ou adventitielle : elle est constituée de tissu conjonctif qui recouvre l'extérieur du côlon et qui fait partie de la couche péritonéale (**Figure 5**) [3].

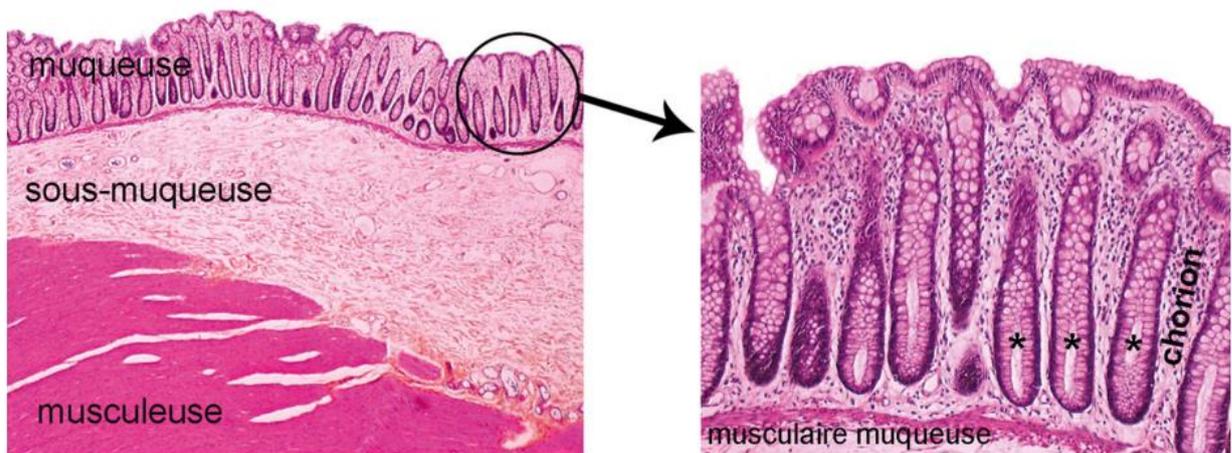


Figure 5. Histologie du côlon [5].

I.5. Les pathologies du côlon

Le côlon est le siège du développement de plusieurs pathologies généralement divisées en pathologies non néoplasiques comme la diverticulose du côlon, le syndrome du côlon irritable, et également les maladies inflammatoires chroniques, ou pathologies néoplasiques qui représentent les tumeurs colorectales.

I.5.1. La diverticulose du côlon

La diverticulose est une altération anatomique généralement asymptomatique, caractérisée par la présence de poches appelées « diverticules » (**Figure 6**). Ces diverticules se caractérisent par des saillies de la muqueuse et de la sous-muqueuse à travers la couche musculieuse. On peut détecter des diverticules aussi bien dans le côlon gauche que dans le côlon droit. La diverticulose du côlon droit se distingue par des véritables diverticules, avec des saillies traversant toutes les couches coliques, tandis que la diverticulose du côlon gauche se manifeste par des pseudo-diverticules. La diverticulose du côlon gauche est très liée à l'âge, elle est peu fréquente (prévalence de 5 %) chez les personnes âgées de moins de 40 ans et augmente jusqu'à 65 % chez les personnes âgées de 65 ans ou plus.

Bien que la plupart des personnes atteintes de diverticulose colique restent asymptomatiques, environ 20 % des patients développent des symptômes suite à l'inflammation des diverticules, on parle donc de diverticulite colique ou de maladie diverticulaire. Les personnes atteintes de diverticulite colique peuvent finir par développer des complications telles qu'un épaissement de la paroi colique, une péritonite ou même une hémorragie [7] [8].

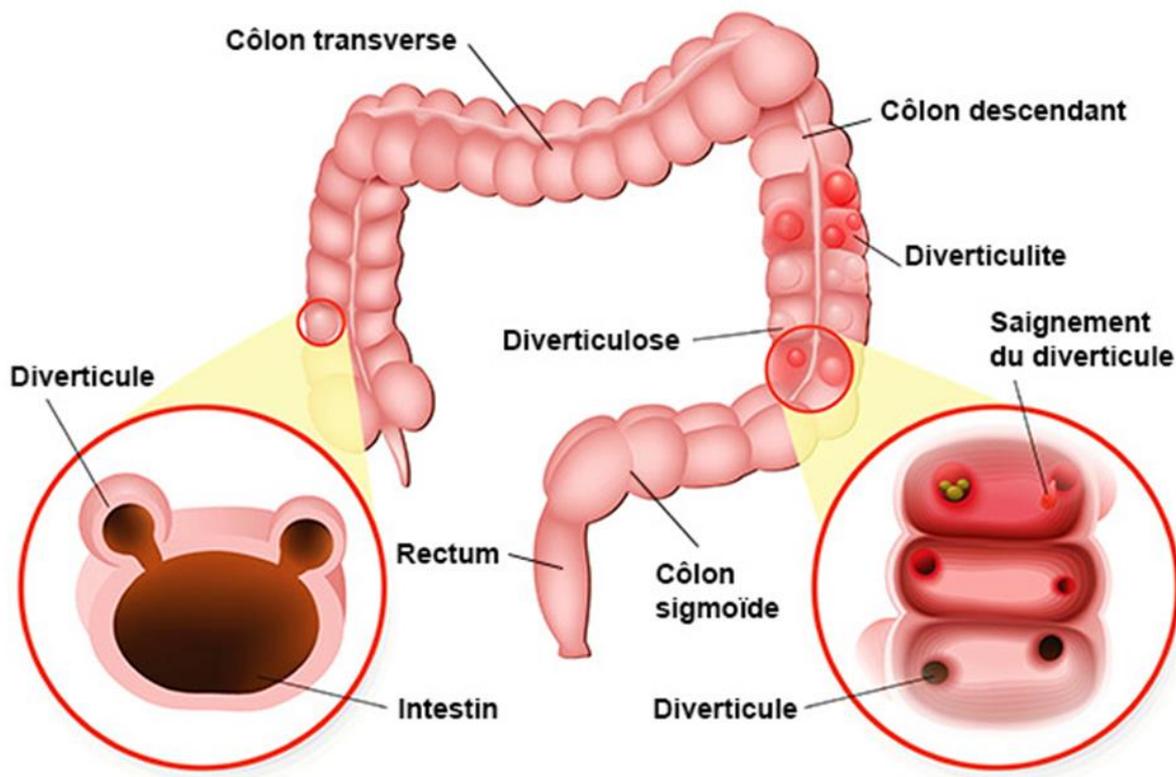


Figure 6. La diverticulose et la diverticulite du côlon.

Source : <https://www.informationhospitaliere.com/comment-traiter-la-diverticulose-colique>

I.5.2. Le syndrome du côlon irritable

Le syndrome du côlon irritable (SCI), également appelé colopathie fonctionnelle, est l'un des troubles fonctionnels chroniques les plus courants, caractérisé par des douleurs abdominales récurrentes, des ballonnements, et de la diarrhée ou de la constipation. Il est généralement classé en fonction des symptômes prédominants en trois sous-types : la première forme avec prédominance de la constipation, la seconde forme avec prédominance de la diarrhée, et la troisième forme avec alternance de symptômes de diarrhée et de constipation. Les recherches menées au cours de ces dernières années ont montré que la dérégulation de l'axe cerveau-intestin, les facteurs génétiques et psychosociaux, et le déséquilibre du microbiome gastro-intestinal jouent un rôle principal dans le développement du SCI [8][9].

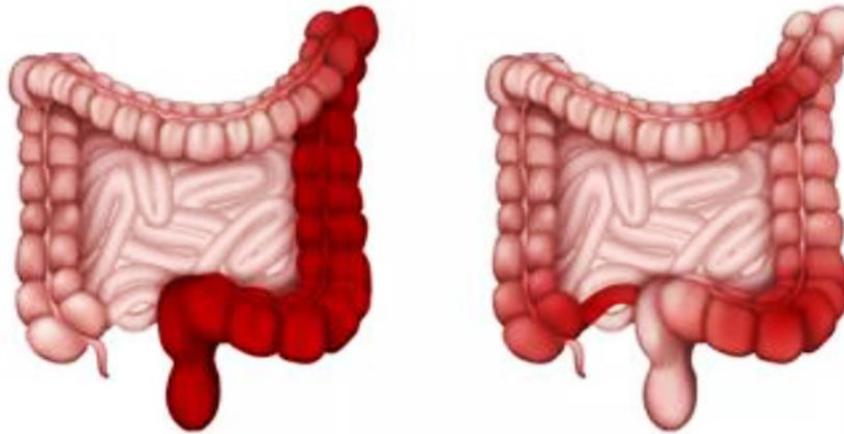
I.5.3. Les maladies inflammatoires chroniques

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), un terme général désignant les maladies inflammatoires chroniques du tractus gastro-intestinal, se réfèrent généralement à la colite ulcéreuse et à la maladie de Crohn.

La colite ulcéreuse ou rectocolite hémorragique est une inflammation diffuse qui endommage continuellement la muqueuse colique du côté rectal. Elle commence dans le rectum et se poursuit de manière continue jusqu'à inclure l'ensemble du côlon (pancolite), entraînant souvent des érosions et des ulcères. La prévalence de la colite ulcéreuse est estimée à 5 millions de cas dans le monde en 2023, et son incidence est en augmentation dans le monde. Cette pathologie est souvent multifactorielle et survient chez les patients génétiquement prédisposés à la suite d'expositions environnementales. Les défauts de la barrière épithéliale de l'intestin, le microbiote et le déséquilibre du système immunitaire sont également impliqués dans le développement de la pathologie. Les patients présentent généralement une diarrhée sanglante et le diagnostic repose sur une combinaison de résultats cliniques, biologiques, endoscopiques et histologiques. Le traitement standard pour la colite ulcéreuse inclut les médicaments à base d'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) et les corticostéroïdes [10][11].

La maladie de Crohn est une forme majeure des maladies inflammatoires chroniques du tube digestif, avec une incidence croissante dans le monde. Elle se caractérise par une inflammation granulomateuse transmurale qui se produit de manière discontinue, avec une tendance à former des fistules. Cette pathologie pourrait résulter de l'interaction entre une susceptibilité génétique (environ 12 % des cas), des facteurs environnementaux et le déséquilibre de la microflore intestinale, entraînant une réponse immunitaire dérégulée. Les symptômes les plus courants sont la diarrhée, les douleurs abdominales, les saignements rectaux, la fièvre, la perte de poids et la fatigue. La maladie de Crohn est souvent traitée par des médicaments tels que les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs. L'objectif des stratégies thérapeutiques actuelles est d'atteindre une rémission profonde et durable, afin d'éviter les complications [12].

Le développement du cancer colorectal est l'une des conséquences les plus importantes des maladies inflammatoires chroniques du côlon. Les personnes atteintes de ces pathologies présentent un risque plus élevé, pouvant atteindre 30 % de développer un cancer colorectal (**Figure 7**) [13].



Colite ulcéreuse

Maladie de Crohn

Figure 7. Les maladies inflammatoires chroniques du côlon.

I.6. Le cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR), comme tous les cancers, résulte de la prolifération incontrôlée de cellules, ici les cellules épithéliales glandulaires du côlon, pour former à terme une masse appelée tumeur. Ces cellules tumorales ont tendance à se détacher de la tumeur et à s'échapper vers les tissus voisins, et à terme peuvent atteindre tous les organes du corps, via les vaisseaux sanguins et lymphatiques, pouvant entraîner la formation de métastases. D'un point de vue clinique, les cancers du côlon sont généralement subdivisés en proximaux ou droits lorsqu'ils proviennent de sections du côlon proches de la flexion splénique (cæcum, côlon ascendant et côlon transverse), tandis que les tumeurs du côlon distales ou gauches surviennent distalement par rapport à ce site (côlon descendant et côlon sigmoïde). Enfin, les cancers du côlon sont classés comme des cancers du rectum lorsqu'ils surviennent à moins de 15 cm du sphincter anal. Le cancer du côlon est plus fréquent que le cancer du rectum, avec un rapport entre les cancers du côlon et du rectum de 2 :1 et même plus dans les pays industrialisés. Généralement, on compte trois principaux types de CCR : sporadique, héréditaire et associé à la colite. La plupart des cas de CCR sont sporadiques et ne sont pas liés à une prédisposition génétique ou à des antécédents familiaux. Étant donné que les symptômes cliniques de ce cancer apparaissent aux derniers stades de la maladie et qu'il existe un temps d'attente significatif entre la formation de polypes et l'apparition du cancer, un diagnostic précoce peut jouer un rôle important dans la réduction de la mortalité [14][15].

I.6.1. Épidémiologie du cancer colorectal

Le CCR se situe en troisième position en termes d'incidence (9,6 %) avec 1 926 425 nouveaux cas et en deuxième position en termes de mortalité (9,3 %) avec 904 019 décès, selon la dernière estimation réalisée en 2022 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). En général, 71 % des cas de CCR se situent dans le côlon et 29 % dans le rectum [16]. On estime que d'ici 2035, le nombre total de décès dus aux cancers du rectum et du côlon augmentera respectivement de 60 % et de 71,5 %. Ces chiffres peuvent varier d'un pays à l'autre en fonction du degré de développement économique. C'est pourquoi le CCR est largement reconnu comme un marqueur du développement socio-économique d'un pays [14].

L'incidence du CCR augmente régulièrement après l'âge de 50 ans et la plupart des cas sont diagnostiqués entre l'âge de 60-70 ans. L'incidence chez les personnes ayant moins de 40 ans n'est que de 5 % [17].

En France, le CCR est le troisième cancer le plus fréquent chez les hommes et le deuxième chez les femmes. En 2023, 47 582 nouveaux cas ont été enregistrés, avec 26 212 cas chez les hommes et 21 370 chez les femmes. Ce cancer est également la deuxième cause de décès par cancer chez les hommes et la troisième chez les femmes en France, avec un total de 17 100 décès estimés en 2023 (9 200 hommes et 7 900 femmes). L'âge moyen au moment du diagnostic est de 71 ans chez les hommes et 72 ans chez les femmes [18].

I.6.2. Facteurs de risques

Plusieurs facteurs contribuent au développement du CCR. Les principaux facteurs de risque associés au CCR sont les facteurs génétiques et environnementaux :

- Age : étant donné qu'environ 90 % des nouveaux cas de CCR surviennent chez les personnes de plus de 50 ans, l'âge est considéré comme l'un des facteurs les plus importants influençant le risque de développer un CCR. On estime que les personnes âgées de plus de 65 ans ont un risque trois fois plus élevé de développer un CCR que les personnes âgées de 50 à 64 ans.
- Les facteurs liés au mode de vie : il est prouvé que le surpoids et l'obésité, l'inactivité physique, le tabagisme, la consommation d'alcool et des habitudes alimentaires inappropriées (une alimentation pauvre en fibres, en fruits, en légumes, en calcium et en produits diététiques et riche en viande rouge et en viande transformée) augmentent le risque de CCR.
- Antécédents médicaux personnels ou familiaux : On estime que 2 à 8 % des cas de CCR résultent de syndromes héréditaires. Les deux syndromes héréditaires les plus courants qui prédisposent au développement du CCR sont le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC), également connu sous le nom de syndrome de Lynch, et la polypose adénomateuse familiale (PAF). Il a été également démontré que les individus présentent un risque accru de CCR s'ils ont eu des antécédents de polypes du côlon, des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, un diabète sucré ou une cholécystectomie [14][17].

Le syndrome de Lynch

Hereditary non polyposis colon cancer (HNPCC) ou syndrome de Lynch est une maladie autosomique dominante causée par des mutations dans l'un des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN : MLH1, MSH2, ou MSH6. L'altération de la réparation des mésappariements au cours de la réplication entraîne une accumulation de mutations de l'ADN, qui se produisent notamment dans des fragments d'ADN microsatellites présentant une séquence répétitive de nucléotides. Cette instabilité des microsatellites (MSI) peut être identifiée au moyen d'un test PCR, qui compare l'ADN normal et l'ADN tumoral d'un même patient. Les patients atteints de HNPCC ont environ 20 % de risque de développer un CCR avant l'âge de 50 ans et environ 80 % de risque de développer un CCR avant l'âge de 85 ans [19].

La polypose adénomateuse familiale : PAF

Comme le syndrome HNPCC, la PAF présente également un mode d'hérédité autosomique dominant. Elle est causée par une mutation du gène APC (adenomatous polyposis coli). Les personnes atteintes de PAF commencent à développer des centaines, voire des milliers de polypes du côlon au milieu de l'adolescence et il existe une forte probabilité que ces polypes se transforment en cancer (**Figure 8**). On suppose que la quasi-totalité des patients atteints de PAF non traités seront diagnostiqués avec un cancer colorectal avant l'âge de 35-40 ans [20][21].



Figure 8. Polypose adénomateuse familiale (PAF) par coloscopie [17].

I.6.3. Dépistage

L'objectif principal du dépistage est de détecter les 90 % de cas sporadiques de CCR, à un stade précoce, où ils sont plus susceptibles d'être traités, et dont la plupart survient chez les personnes âgées de plus de 50 ans. Le dépistage du CCR est plus facile que tout autre cancer en raison de divers facteurs, tels que : une longue phase préclinique de la maladie, ce qui offre une grande opportunité de dépistage, les adénomes et les cancers précoces sont des entités facilement détectables et traitables, contrairement aux signaux précurseurs d'autres cancers très courants comme ceux du sein, de la prostate et du poumon [19].

Les modalités recommandées pour le dépistage du CCR sont organisées selon trois niveaux de risque et sont présentées dans la **Figure 9**.

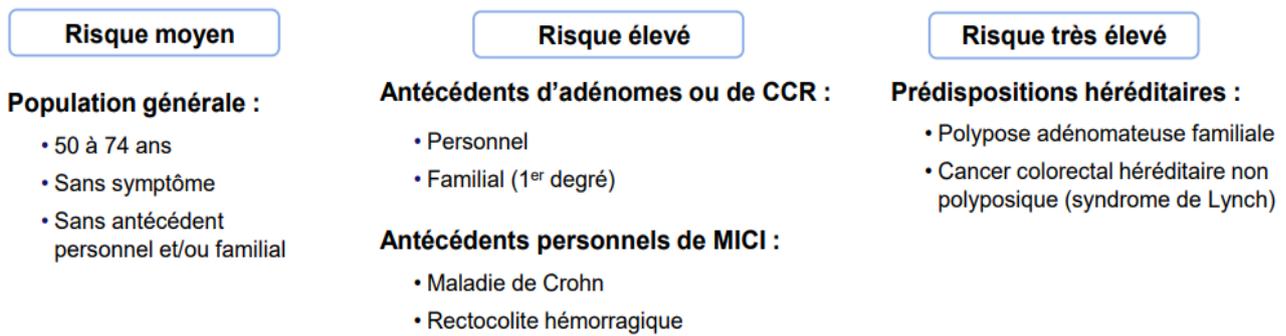


Figure 9. Dépistage du CCR selon trois niveaux de risque [22].

I.6.4. Physiopathologie

Le modèle « traditionnel » de formation du CCR montre que la plupart des cancers se forment à partir d'un polype adénomateux bénin avec une crypte aberrante, qui se transforme ensuite en un adénome précoce (<1 cm de taille). L'adénome devient ensuite un adénome avancé (de plus de 1 cm de taille) avant de se transformer en CCR. Ce processus est causé par l'accumulation de mutations et d'altérations épigénétiques pouvant s'étendre sur 10 à 15 ans. Les polypes du côlon (lésions néoplasiques précancéreuses) sont définis comme une croissance anormale de tissu faisant saillie à partir d'une couche muqueuse vers la lumière intestinale. Ils sont classés histologiquement en deux catégories principales : les polypes non néoplasiques (hamartomateux, hyperplasiques et inflammatoires) et les polypes néoplasiques (adénomateux). Les polypes adénomateux sont d'une grande importance, ayant le potentiel de devenir malins. On estime qu'environ 85 % à 90 % des CCR se développent à partir de polypes adénomateux. Les polypes néoplasiques sont généralement classés en deux types histologiques principaux : les adénomes classiques et les polypes dentelés [23].

Les polypes adénomateux

Il est bien établi que la grande majorité des adénocarcinomes colorectaux dérivent de lésions précoces telles que les adénomes et les dysplasies. Les adénomes classiques sont classés en tubulaires, tubulovillaires et villositaires en fonction de leurs caractéristiques architecturales.

- L'adénome tubuleux : c'est le plus courant et il constitue environ 75 % des adénomes. Ils sont généralement pédiculés, leur surface est plane et ils secrètent peu de mucus. Si les polypes ont un diamètre supérieur à 2 cm, il y a environ 30 % de risque qu'ils se transforment en CCR.
- L'adénome villositaire : ils sont volumineux et sessiles (plat). Les granules de leur surface imitent les villosités intestinales avec une apparence velue. Ils sont généralement localisés au niveau du côlon gauche. Il est retrouvé dans 5% des cas.

- L'adénome tubulo-villeux : constitue environ 20 % des adénomes et présente à la fois les caractéristiques de l'adénome vilieux et de l'adénome tubuleux (**Figure 10**).
- Dysplasie ou adénome plan : à la différence des autres adénomes, il ne se développe pas en relief sous forme d'excroissance, mais à plat. Cette lésion a un diamètre inférieur à 1 cm. Une dysplasie est généralement préalable au cancer invasif [23] [24][25].

Les polypes dentelés

Les polypes dentelés se répartissent en trois grands types :

- Les polypes hyperplasiques (HP) : c'est le type de polype dentelé le plus courant. Ils sont principalement situés dans le côlon rectosigmoïde (moins de 5 mm) et ne sont pas associés à un risque de transformation maligne.
- Les lésions dentelées sessiles (LDS) : ces lésions sont traditionnellement plus grandes que les HP, prédominent dans le côlon droit et, selon les critères de l'OMS, se distinguent des HP par la présence d'une distorsion de la crypte à l'histologie (**Figure 11**).
- Les adénomes dentelés traditionnels (ADT) : ils sont plus souvent localisés dans le côlon distal et peuvent avoir un aspect érythémateux. Sur le plan histologique, les ADT présentent une éosinophilie cytoplasmique importante, des noyaux allongés et des cryptes ectopiques [25].

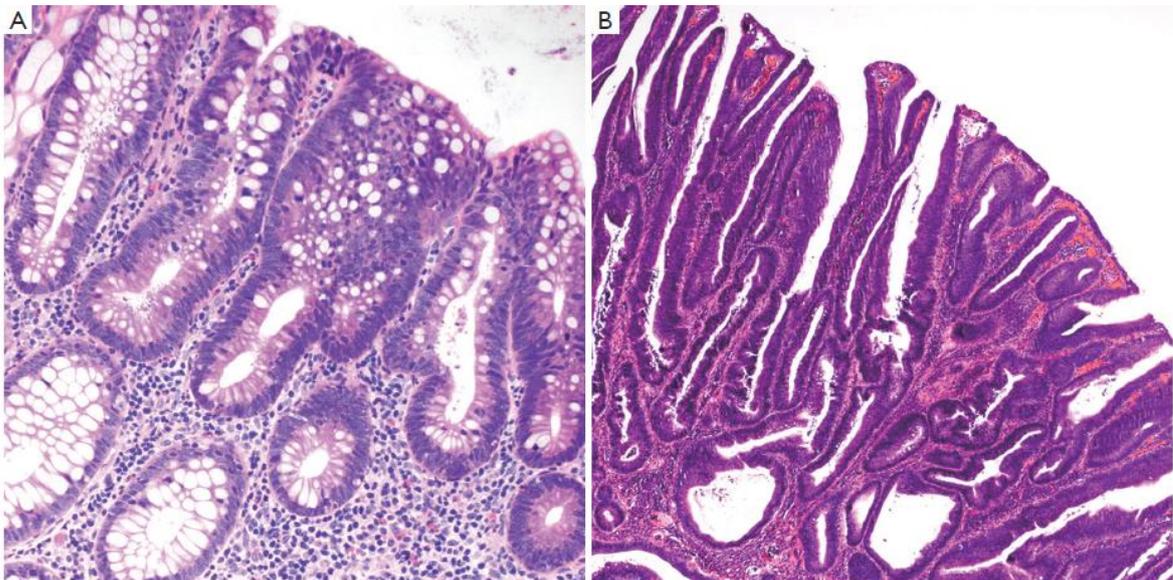


Figure 10. Les polypes adénomateux tubuleux (A) et tubulo-villeux (B) [26].

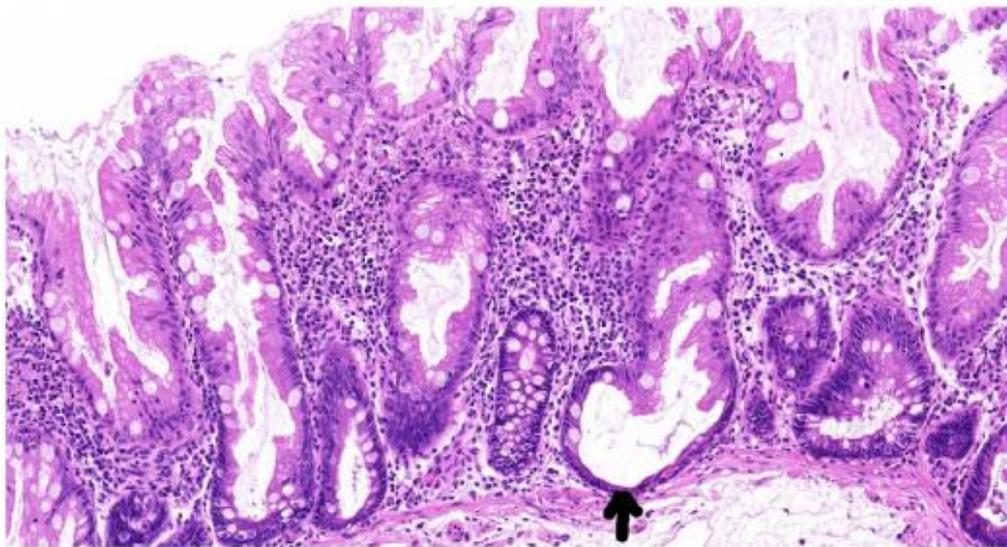


Figure 11. Les lésions dentelées sessiles [26].

Les polypes non néoplasiques

- Les polypes hyperplasiques sont le type le plus courant de polypes colorectaux. Ces polypes ont généralement un diamètre inférieur à 5 mm, sont sessiles et se trouvent le plus souvent dans le côlon distal et le rectum. Les polypes hyperplasiques de plus de 2 cm de diamètre peuvent présenter un léger risque de dysplasie et de dégénérescence maligne.
- Les polypes hamartomateux, également connus sous le nom de polypes juvéniles, sont principalement constitués de tissu conjonctif (muscle lisse, lamina propria et infiltrats inflammatoires) recouvert d'un épithélium hypertrophique. Les hamartomes peuvent apparaître de manière sporadique ou dans le cadre d'un syndrome de polypose. Un polype hamartomateux sporadique est généralement solitaire et apparaît à un âge précoce ; 75 % d'entre eux surviennent chez des enfants de moins de dix ans (d'où le nom de polype "juvénile"). Les polypes hamartomateux sporadiques n'ont généralement pas de potentiel malin. Cependant, comme ils sont très vascularisés, ils ont tendance à provoquer des saignements.
- Les polypes inflammatoires (pseudo-polypes) surviennent le plus souvent chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin, principalement la colite ulcéreuse. Ces lésions ne sont pas de véritables polypes, mais plutôt des accumulations d'infiltrations inflammatoires avec une muqueuse déformée. Ces lésions ne sont pas pré-malignes, mais elles ne peuvent pas être distinguées des polypes adénomateux sur la base de l'aspect coloscopique. Il est donc recommandé de procéder à une biopsie [27].

I.6.5. Diagnostic

Pour les personnes suspectées d'être atteintes de CCR, les médecins doivent procéder à un examen physique de l'abdomen et analyser les antécédents médicaux afin de poser un diagnostic. Le toucher rectal permet également d'évaluer et de détecter avec le doigt la présence d'une masse.

La coloscopie est souvent utilisée comme étant l'examen de référence pour détecter le CCR. Elle permet d'évaluer la localisation de la tumeur dans l'ensemble du côlon et permet d'effectuer des biopsies afin de fournir des données histologiques et de favoriser le diagnostic et la thérapeutique à suivre. Bien que la coloscopie ait une précision et une spécificité élevées pour la détection du CCR, cette technique est coûteuse, invasive et contraignante pour les patients, notamment parce qu'elle nécessite une sédation et une préparation de l'intestin avant le processus. De plus, il existe également un risque de perforation au cours de l'examen médical. Le diagnostic par coloscopie est la procédure qui présente la sensibilité et la spécificité les plus élevées pour le diagnostic du CCR avec une sensibilité comprise entre 88 % et 98 % pour un adénome de 10 mm de diamètre. Les études ont démontré une diminution de l'incidence du CCR de 53 à 72 % et une diminution de 31 % de la mortalité liée au CCR grâce à la coloscopie précoce. Les analyses de selles, telles que le test immunochimique fécal (TIF) et la recherche de sang occulte dans les selles (RSOS), permettant de détecter la présence de matériel génétique dans les selles, sont également utilisées [14].

Après la détection d'un polype, il est nécessaire de réaliser plusieurs examens afin de confirmer le diagnostic de CCR et d'évaluer son stade. Ces examens sont connus sous le nom de "bilan diagnostic". On sait que certains marqueurs tumoraux, en particulier l'ACE (antigène carcino-embryonnaire), sont associés au CCR. Une étude menée chez des patients avec des symptômes abdominaux permet de conclure que l'ACE ne devrait pas être utilisée comme un outil de triage des patients atteints de CCR. Les taux d'ACE sont peu liés au niveau de différenciation, au diamètre et au stade de la tumeur [28]. Cependant, l'ACE semble être un marqueur prédictif et pronostic important pour le choix d'une thérapie ciblée dans certains types de CCR. Un taux élevé d'ACE suggère la présence de métastases. En outre, après un traitement approprié, l'augmentation du taux d'ACE au cours du suivi doit être évaluée en faveur d'une récurrence ou d'une métastase [14][17].

Au cours des dernières années, de nombreux chercheurs ont travaillé à l'identification de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic du CCR. Il existe un grand nombre de candidats pour les biomarqueurs diagnostics. Par exemple, les mutations des gènes RAS (rat sarcoma) ou BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) ou encore une instabilité micro-satellitaire (MSI) sont fréquemment étudiées. En outre, des gènes anormalement méthylés qui peuvent affecter la fonction de réparation de l'ADN (MGMT), l'apoptose (BNIP3), la migration cellulaire (vimentine), et d'autres, permettent de prédire les résultats cliniques, tels que le pronostic de traitement et de survie, l'apparition de métastases et la résistance à la thérapie [29].

Une fois le CCR confirmé par l'examen histopathologique, la suite du diagnostic est déterminée individuellement en fonction des résultats. Les diagnostics complémentaires comprennent des examens d'imagerie pour évaluer le stade local, la présence de ganglions lymphatiques et de métastases à distance.

I.6.6. Symptômes

Le CCR peut être suspecté en présence de certains symptômes gastro-intestinaux. La reconnaissance d'une suspicion de CCR et l'orientation vers un diagnostic ultérieur sont liées à l'apparition de saignements rectaux, d'une masse abdominale, de douleurs abdominales, d'une modification des habitudes intestinales, d'une perte de poids et d'une anémie ferriprive. Cependant, certains symptômes non spécifiques, tels que la perte d'appétit inexplicée et la thrombose veineuse profonde, doivent être mentionnés. Pour ces symptômes, une évaluation des signes ou des résultats supplémentaires peut aider à clarifier le cancer le plus probable [17].

I.6.7. Classification TNM

La classification de l'OMS a permis de distinguer des groupes de patients en fonction de leur situation oncologique ou pathologique, ce qui offre une vision claire pour établir un traitement ciblé et des soins appropriés aux patients, en fonction du stade du cancer. La classification TNM, établie par l'AJCC (American Joint Committee on Cancer), a été mise à jour en 2018 avec la huitième édition, pour une classification plus « personnalisée » des patients atteints de cancer [30]. La classification TNM est une classification topographique basée sur les trois critères représentés par l'acronyme TNM :

- **T** : désigne la taille et la profondeur de la tumeur primaire avec des valeurs allant de 0 à 4 (T1, T2, T3 et T4). T0 indique l'absence de tumeur primaire, tandis que T4 indique l'invasion de la tumeur dans le péritoine viscéral (**Tableau 1**).
- **N** : se réfère à l'invasion des cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques proches et/ou distants avec des valeurs allant de 0 à 2 (N0, N1, N2). N0 indique l'absence de cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques, tandis que N2 indique l'implication de ganglions lymphatiques situés à proximité ou à distance de la tumeur (**Tableau 2**).
- **M** : désigne la présence de métastases. M0 représente l'absence de métastases et M1 représente une ou plusieurs métastases (**Tableau 3**).

Sur la base de la sous-classification TNM, le cancer colorectal peut être classé en 4 stades (I-IV) :

- **Stade 0** : carcinome *in situ* ou carcinome intramuqueux, les cellules cancéreuses sont localisées uniquement dans la muqueuse interne du côlon ou du rectum.
- **Stade I** : la tumeur s'est développée dans la couche sous-muqueuse du côlon ou du rectum, sans s'étendre dans les ganglions lymphatiques voisins ou à des sites éloignés.
- **Stade II** : regroupe 3 sous-classes IIA, IIB et IIC
 - Le stade IIA : la tumeur envahit les tissus péri-corectaux à travers la musculature en absence de métastase ganglionnaire.
 - Le stade IIB : le cancer a traversé la paroi du côlon ou du rectum, mais ne s'est pas étendu à d'autres tissus ou organes voisins. Il ne s'est pas encore propagé aux ganglions lymphatiques voisins ou à des sites distants.
 - Le stade IIC : le cancer a traversé la paroi du côlon ou du rectum et s'est fixé ou développé dans d'autres tissus ou organes voisins. Il ne s'est pas encore propagé aux ganglions lymphatiques voisins ou à des sites distants.

- **Stade III** : les cellules tumorales ont envahi les ganglions lymphatiques. On peut également classer le stade III en stades IIIA, IIIB et IIIC en fonction de l'étendue de la tumeur et du nombre de ganglions lymphatiques touchés par la tumeur.
- **Stade IV** : à ce stade, le cancer s'est métastasé dans des organes distants, tels que le foie, les poumons ou d'autres parties du corps. Au stade IVA, la tumeur peut atteindre un seul organe ou des ganglions lymphatiques éloignés. En cas d'atteinte de plus d'un organe par la tumeur, on parle alors du stade IVB. Si le péritoine est envahi par la tumeur, c'est le stade le plus agressif du CCR défini par le stade IVC [31][32].

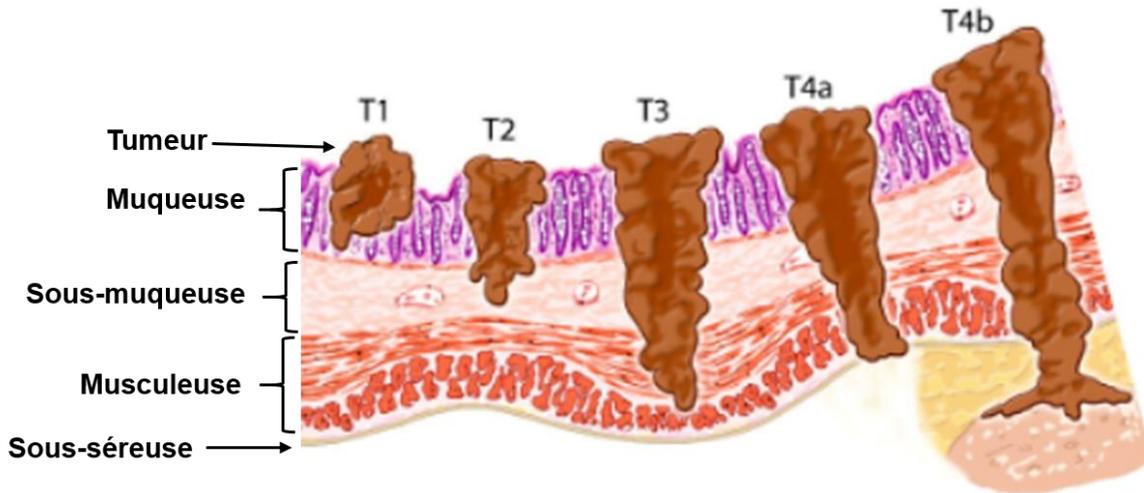


Tableau 1. Classification TNM – Les indicateurs de la lettre T

T0	Absence de tumeur primaire
Tis	Le cancer est au stade le plus précoce (in situ), il touche uniquement la couche muqueuse
T1	Tumeur s'infiltré dans la couche sous-muqueuse
T2	Tumeur s'infiltré dans la couche musculeuse
T3	Tumeur envahissant dans la couche sous-séreuse ou les tissus péri-rectaux
T4	T4a : invasion de la tumeur dans le péritoine viscéral
	T4b : tumeur envahissant d'autres organes ou structures

Source : <https://www.imaios.com/fr/e-cases/imaios/classifications/cancer-colorectal-s>

Tableau 2 . Classification TNM – Les indicateurs de la lettre N

N0	Absence de cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques
N1	N1a : métastase dans un ganglion lymphatique régional
	N1b : métastases dans 2-3 ganglions régionaux
	N1c : nodule(s) tumoral(aux) dans la couche sous-séreuse ou les tissus péri-rectaux, en absence de métastase ganglionnaire régionale
N2	N2a : métastase dans 4 à 6 ganglions régionaux
	N2b : métastase dans 7 ganglions régionaux ou plus

Tableau 3. Classification TNM – Les indicateurs de la lettre M

M0	Absence de métastases
M1	M1a : métastase localisée dans un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglions non régionaux)
	M1b : métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Tableau 4. Les différents stades du CCR selon la classification TNM

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

Source : https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#_42_toc

I.6.8. Traitements

La sélection du traitement joue un rôle crucial dans la réussite et l'efficacité de la thérapie. Ce choix est basé sur divers facteurs, tels que le stade de la tumeur, le profil moléculaire, l'âge du patient et la présence des métastases. Les options actuelles pour le traitement du CCR sont les approches chirurgicales, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie, et les thérapies ciblées.

I.6.8.1. La chirurgie

Les patients, quel que soit le stade du CCR, doivent généralement subir une intervention chirurgicale. La chirurgie, qui implique l'ablation de la tumeur et des ganglions lymphatiques associés, se divise en deux méthodes générales : la chirurgie ouverte et la chirurgie mini-invasive (MIS). Généralement, la tumeur est enlevée par l'un des types de chirurgie suivants :

- Polypectomie : si le cancer est découvert dans un polype, celui-ci est souvent enlevé au cours d'une coloscopie.
- Excision locale : Si le cancer est découvert à un stade très précoce, le médecin peut l'enlever sans couper la paroi abdominale. Au lieu de cela, le médecin peut introduire un tube muni d'un outil de coupe à travers le rectum dans le côlon et couper le cancer. C'est ce qu'on appelle une excision locale.
- Résection du côlon avec anastomose : Si le cancer est plus important, le médecin procédera à une colectomie partielle (il enlèvera le cancer et une petite quantité de tissu sain autour). Il peut ensuite procéder à une anastomose (recoudre les parties saines du côlon) et prélèvera également les ganglions lymphatiques à proximité du côlon pour les examiner sous microscope (**Figure 12**).
- Résection du côlon avec colostomie : si le médecin n'est pas en mesure de recoudre les deux extrémités du côlon, une stomie (ouverture) est pratiquée à l'extérieur du corps pour laisser passer les déchets. Cette procédure est appelée colostomie. Un sac est placé autour de la stomie pour recueillir les déchets (**Figure 13**).

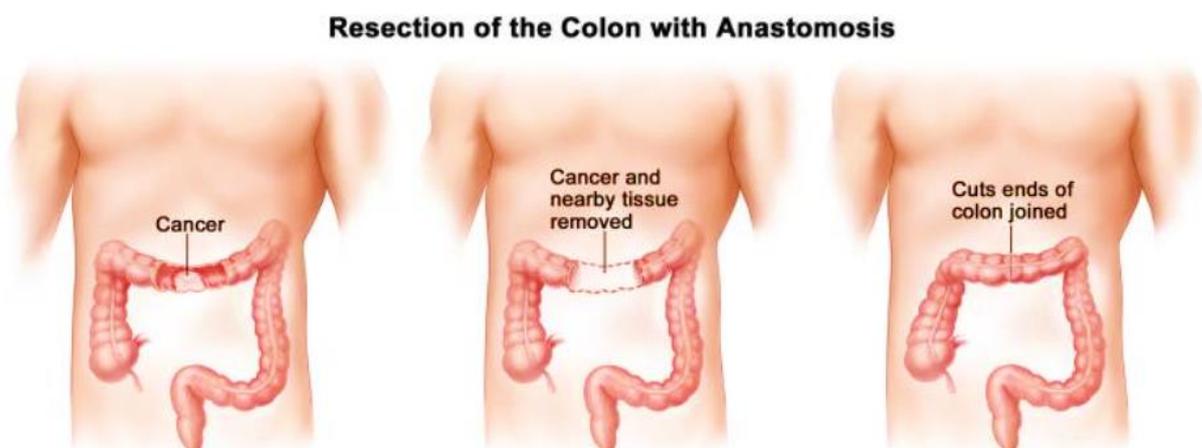


Figure 12. Chirurgie du cancer du côlon par anastomose.

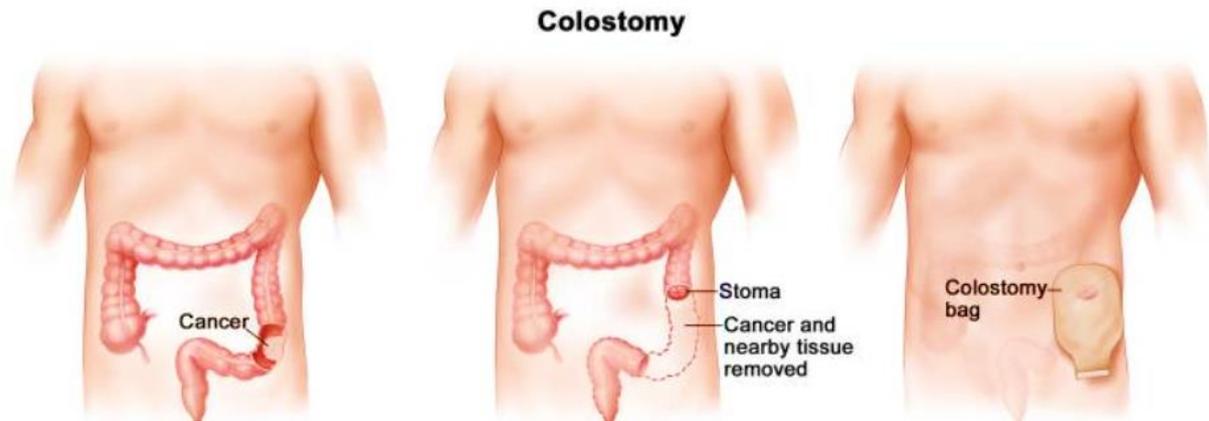


Figure 13 . La colostomie du côlon.

Source: PDQ Adult Treatment Editorial Board. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. 2024 Apr 30.
 In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002–. PMID:
 26389319. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65880/>

I.6.8.2. La radiothérapie

La radiothérapie est utilisée pour traiter les patients atteints d'un cancer du rectum localement avancé, soit comme thérapie adjuvante après la chirurgie pour prévenir la récurrence, soit avant la chirurgie pour réduire le volume de la tumeur et préserver le sphincter anal, ainsi que comme soins palliatifs pour soulager les symptômes et prolonger la durée de survie des patients. Elle utilise des rayons X à haute énergie ou d'autres types de radiations pour tuer les cellules cancéreuses et/ou les empêcher de se développer. Le cancer du côlon est parfois traité par deux types de radiothérapie :

La radiothérapie externe : utilise une machine à l'extérieur du corps pour envoyer des radiations vers la zone du corps atteinte par le cancer. La radiothérapie interne : utilise une substance radioactive scellée dans des aiguilles, des graines, des fils ou des cathéters qui sont placés directement dans ou près du cancer. La radiothérapie interne peut être utilisée pour traiter un cancer du côlon qui s'est propagé au foie.

Le principal inconvénient de la radiothérapie est qu'elle provoque la destruction des cellules saines adjacentes. En outre, d'autres effets secondaires tels que des troubles intestinaux, des nausées, des troubles vésicaux, de la fatigue et des irritations cutanées ont été signalés chez des patients atteints de CCR et recevant ce type de traitement [33].

I.6.8.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie est une méthode de traitement anticancéreux qui consiste à administrer au patient une ou plusieurs molécules en série, visant à détruire les cellules cancéreuses ayant un taux de prolifération élevé. Étant donné que la chirurgie est considérée comme le traitement « standard » pour le CCR, il est fréquent de recevoir une prescription de chimiothérapie en

complément de celle-ci. La chimiothérapie néoadjuvante ou préopératoire est prescrite avant la chirurgie et la résection de la tumeur. Elle améliore le résultat de la chirurgie, prévient la propagation des métastases systémiques et empêche l'augmentation de la prolifération cellulaire après l'ablation de la tumeur [34]. La chimiothérapie adjuvante est une étape de la chimiothérapie qui est effectuée après la chirurgie. Cette étape est administrée pour tous les cas de cancer du côlon métastatique et de cancer du côlon non métastatique localement avancé, y compris les stades II (tumeur T4) et III et tous les stades II et III des cancers du rectum. En cas de métastases, la chimiothérapie représente le premier traitement dans le but de prolonger la survie, d'améliorer et de maintenir la qualité de vie [34].

Le 5-Fluorouracile (5-FU), inhibiteur de la thymidine synthase (TS), a été considéré comme le traitement standard de première ligne pour les patients atteints de CCR, ainsi que d'autres cancers tels que le cancer du sein pendant plus de 50 ans (**Figure 14**) [35]. Il est généralement administré en association avec des médicaments tels que la leucovorine, la capécitabine, et l'oxaliplatine dans le but d'améliorer son efficacité. Ainsi, la capécitabine (pro-droque du 5-FU) et l'oxaliplatine (CAPOX) ou le 5-FU, la leucovorine et l'oxaliplatine (FOLFOX) sont les options de traitement de première ligne pour les patients atteints de CCR de stade II. Cependant, les résultats des études montrent que la chimiothérapie chez les patients atteints de CCR de stade II réduit la qualité de vie et augmente la probabilité de récurrence de la maladie [36].

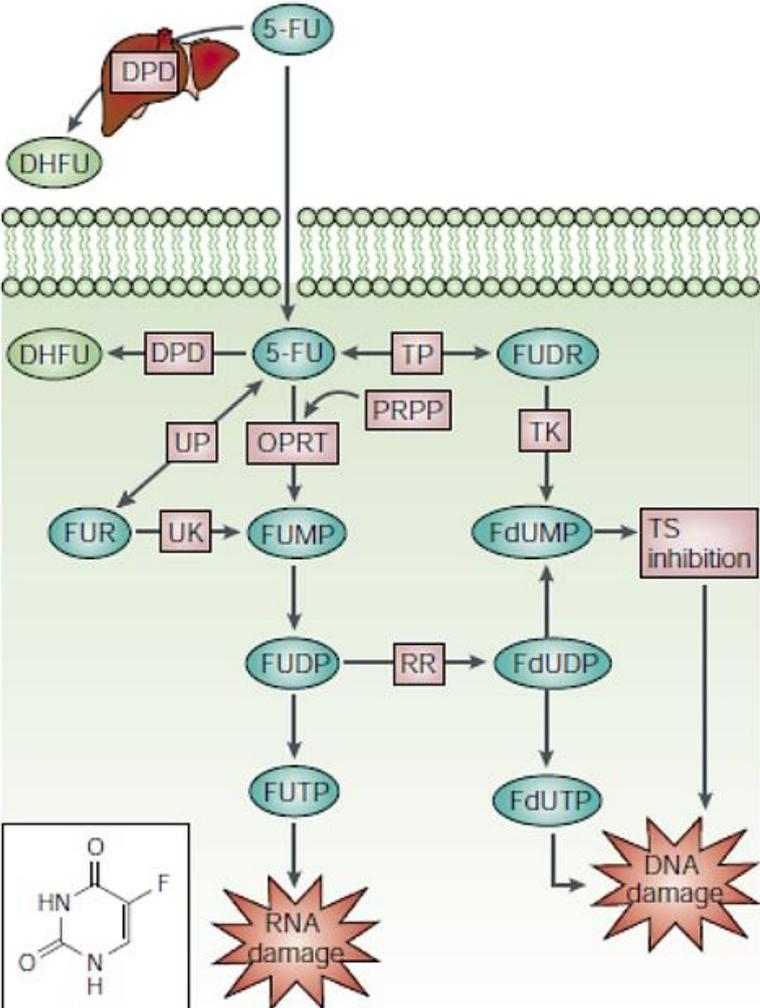


Figure 14. Métabolisme du 5-FU.

Dans le foie, une grande partie du 5-FU est convertie en un métabolite inactif, le dihydrofluorouracile (DHFU), par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). Le 5-FU se transforme en trois métabolites actifs : le monophosphate de fluorodésoxyuridine (FdUMP), le triphosphate de fluorodésoxyuridine (FdUTP) et le triphosphate de fluorouridine (FUTP). Ces trois composés actifs entraînent des dommages de l'ADN et à l'ARN [35].

I.6.8.4. L'immunothérapie

L'immunothérapie exploite les mécanismes naturels du système immunitaire de l'organisme, ce qui permet de détruire les cellules tumorales sans endommager les cellules saines. Le système immunitaire reconnaît une cellule cancéreuse grâce aux antigènes associés à la tumeur (TAA) et aux antigènes spécifiques à la tumeur (TSA) et déclenche une réponse immunitaire grâce aux motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) et aux médiateurs pro-inflammatoires qui sont libérés par les cellules endommagées. Une autre caractéristique unique de l'immunothérapie est le développement d'une mémoire immunitaire, qui peut prévenir la récurrence de la maladie. Des preuves récentes ont montré que même certains médicaments de chimiothérapie détruisent les cellules tumorales en stimulant les mécanismes immunitaires [37]. Les anticorps bloquant les points de contrôle immunitaire (ICB) ou « checkpoints inhibiteurs », constituent la dernière approche dans l'immunothérapie du CCR. Physiologiquement, les points de contrôle immunitaire sont des molécules exprimées sur les cellules T et qui empêchent l'apparition de réponses auto-immunes en agissant comme un frein pour inhiber les cellules T stimulées. Malheureusement, en cas de cancer, ce mécanisme naturel est utilisé par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire. Le PD1 (programmed cell death 1) et son ligand (PD-L1) et le CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) sont les checkpoints inhibiteurs les plus connus en cancérologie (**Figure 15**). Lorsque PD-1 se lie à son propre ligand, PDL-1, qui est exprimé sur les cellules tumorales, un signal transduit conduit à l'inhibition des cellules T cytotoxiques activées, et à la conversion de ces cellules en T regs, et finalement à la suppression de la réponse immunitaire. De la même manière, CTLA-4 entre en compétition avec CD28, qui est un récepteur de co-stimulation pour l'activation des lymphocytes T après la reconnaissance de l'antigène en liant le récepteur des cellules T au complexe peptide-CMH. CTLA-4 se lie aux molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) sur les cellules présentatrices d'antigènes (APC) avec une affinité beaucoup plus élevée que CD28, envoyant ainsi un signal inhibiteur au lymphocyte T activé [34]. Les études ont confirmé que ces molécules de contrôle sont surexprimées dans le microenvironnement tumoral et que les cellules cancéreuses utilisent ces mécanismes pour bloquer les cellules T et empêcher le développement d'une réponse immunitaire [38]. Différents anticorps bloquant ces molécules de contrôle sont utilisés, comme le Pembrolizumab (PD-1), le Nivolumab (PD-1) et Ipilimumab (CTLA4). La plupart de ces molécules sont en phase I ou II d'essais cliniques, avec des résultats prometteurs dans plusieurs études [39].

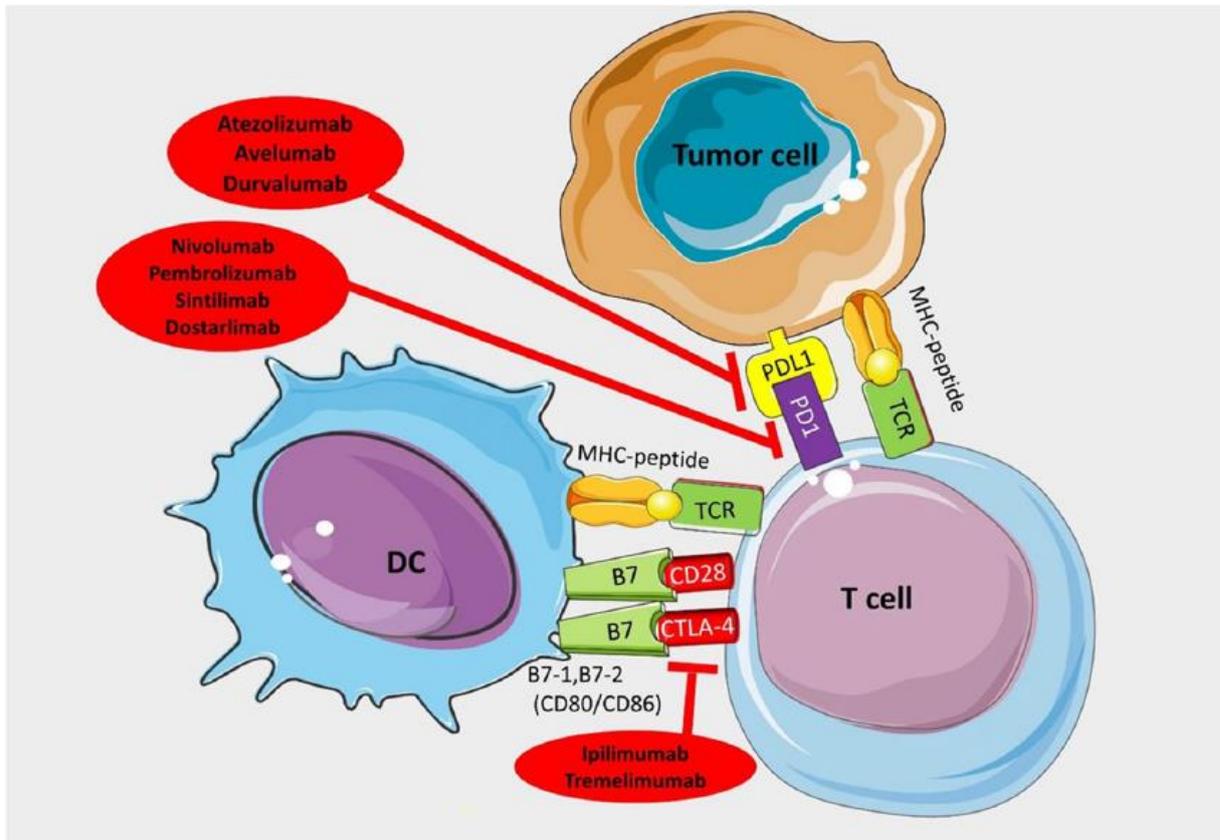


Figure 15. Traitements bloquant les points de contrôle immunitaire ou checkpoints inhibitors [34].

Dans l'ensemble, ces thérapies conventionnelles sont généralement plus efficaces lorsque la maladie est diagnostiquée à un stade précoce (taux de survie d'environ 90 %). Cependant, lorsque le CCR est détecté à un stade avancé, les patients ont souvent un mauvais pronostic (environ 15 % de taux de survie au stade 4), ce qui montre la nécessité d'améliorer les méthodes de détection et les options thérapeutiques [40].

I.6.8.5. Les thérapies ciblées

La thérapie ciblée est une approche qui détruit directement et uniquement les cellules cancéreuses en ciblant l'une de leurs voies spécifiques, au lieu de tuer à la fois les cellules saines et les cellules tumorales (comme c'est le cas avec la chimiothérapie). Cette méthode a donc moins d'effets secondaires que la chimiothérapie. Les thérapies ciblées sont des traitements utilisant de petites molécules qui sont capables de pénétrer facilement les cellules tumorales. Il s'agit principalement d'anticorps monoclonaux qui ciblent des enzymes essentielles présentes dans les cellules cancéreuses, ou à la surface de la cellule cancéreuse, telles que des récepteurs réduisant ainsi la prolifération ou même l'angiogenèse [41][42]. Diverses voies médiant l'initiation, la progression et la migration du CCR, telles que Wnt/ β -

caténine, Notch, Hedgehog et TGF- β (transforming growth factor- β)/SMAD, ainsi que celles capables d'activer les cascades de signalisation, telles que phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT ou RAS/rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF), constituent des sites idéaux pour une thérapie ciblée (**Figure 16**).

L'une des cibles de la thérapie ciblée est l'EGFR (epidermal growth factor receptor), un récepteur tyrosine kinase transmembranaire de la famille HER. L'activation de ce récepteur entraîne la transduction de signaux qui régulent diverses activités cellulaires, notamment la croissance, la mort, la migration et l'angiogenèse. La voie de signalisation EGFR est particulièrement dérégulée dans le CCR, avec une surexpression du récepteur. Par conséquent, l'inhibition de ce récepteur peut constituer une stratégie thérapeutique efficace pour le traitement du CCR, que ce soit en monothérapie ou en association avec la chimiothérapie. Le cetuximab est un anticorps chimérique ciblant le récepteur EGFR, approuvé pour le traitement du CCR. Des études montrent que le cetuximab induit la phagocytose des cellules du CCR par les cellules dendritiques, ce qui déclenche une réponse immunitaire [43].

L'angiogenèse est un processus dans lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés pour la croissance et les activités vitales des cellules. Ce processus joue un rôle important dans la progression des tumeurs et des métastases. Par conséquent, l'inhibition de l'angiogenèse tumorale a été considérée comme une stratégie efficace pour prévenir la croissance tumorale et les métastases dans divers cancers, y compris le CCR [42]. Le régorafénib est un inhibiteur multikinase qui cible plusieurs éléments impliqués dans l'angiogenèse, tels que VEGFR1-3 et TIE-2, ainsi que dans la prolifération et la croissance cellulaire, tels que RAF-1 et BRAF, elle a été approuvée par la FDA pour le traitement du CCR métastatique. Les résultats des premiers essais cliniques ont montré que régorafénib en combinaison avec la chimiothérapie serait bénéfique en raison de sa faible toxicité et de ses effets secondaires limités [44].

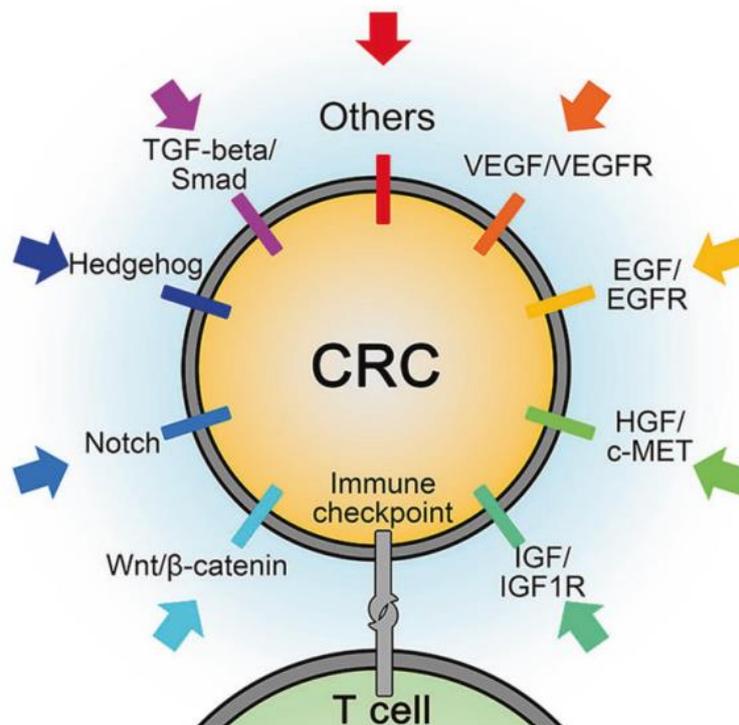


Figure 16. Voies offrant des sites potentiels pour une thérapie ciblée du CCR [45].

I.6.8.6. Les régimes

Les personnes ayant des CCR métastatiques reçoivent un traitement combinant des traitements chimiothérapeutiques ou même des thérapies ciblées pour améliorer la réponse des patients. Différents protocoles cliniques ont permis le développement de plusieurs régimes thérapeutiques. Les régimes à bithérapie tels que FOLFOX avec 5-FU et Oxaliplatine, FOXFIRI (5-FU + Irinotecan), XELOX ou CAPOX (Capecitabine + Oxaliplatine) ou encore FOLOXIRI (5-FU + Oxaliplatine + Irinotecan) sont mentionnés [45][46]. Plusieurs schémas thérapeutiques ont été élaborés, et ces régimes ont démontré une augmentation significative de la moyenne de survie par rapport aux monothérapies [47].

I.6.9. Résistance au CCR

Malgré les progrès réalisés dans le diagnostic et le traitement de ce cancer, le taux de survie à cinq ans pour les patients ayant un CCR métastatique n'est que légèrement supérieur à 12 %. L'un des principaux obstacles à cette observation est dû à l'apparition d'une résistance aux médicaments. Près de la moitié des patients atteints de CCR métastatique sont résistants aux chimiothérapies à base de 5-FU [44]. Deux catégories de résistances sont identifiées : une résistance innée (primaire) et une résistance acquise (secondaire). La résistance innée désigne une résistance qui n'est pas liée à un traitement spécifique, mais qui existe avant tout traitement. La mutation RAS est le meilleur exemple pour illustrer cela. En effet, seulement 10 à 20 % des patients répondaient aux traitements ciblant l'EGFR tels que le cetuximab et le panitumumab. C'est après l'identification de la mutation RAS et de son rôle dans les réponses aux traitements anti-EGFR que RAS est devenu un indicateur de résistance. La résistance acquise survient lorsque la tumeur est exposée à un traitement, qui était à l'origine efficace.

Résistance aux chimiothérapies :

La résistance acquise la plus fréquente après la chimiothérapie est le mécanisme d'efflux de la drogue. Lorsque le transporteur membranaire pompe les médicaments chimiothérapeutiques ou les médicaments à cible moléculaire de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur, la concentration des médicaments antitumoraux dans la cellule tumorale diminue et le développement de la résistance aux médicaments multiples (MDR) se produit. À ce jour, il a été prouvé que le génome humain compte plus de 400 transporteurs membranaires, qui sont divisés en deux familles : les transporteurs ABC (ATP binding cassette) et les transporteurs de solutés (SLC). En fait, le transporteur ABC, tel que la glycoprotéine P (P-gp), est le principal transporteur membranaire de la MDR et joue un rôle important dans la résistance du CCR à la chimiothérapie. Des études précliniques et cliniques ont démontré que la surexpression de la P-gp dans une variété de tumeurs solides, y compris le CCR, entraîne une résistance à plusieurs médicaments et l'échec de la chimiothérapie. Par exemple, la P-gp est surexprimée dans les lignées cellulaires du CCR et les spécimens résistants au 5-FU/Dox/oxaliplatine [48]. Un autre mécanisme qu'on observe fréquemment, c'est l'inactivation de la molécule thérapeutique. La grande majorité du 5-FU est catabolisée en métabolites inactifs par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) dans le foie. Une forte expression de

l'ARNm de la DPD peut conférer une résistance au 5-FU dans le CCR [48][49]. Par conséquent, l'interférence avec la DPD est un moyen de surmonter la résistance aux médicaments chez les patients. Des études ont rapporté que les inhibiteurs de la DPD tels que le 5-éthynyluracile et le 5-chloro-2,4 dihydroxypyridine (CDHP) peuvent améliorer l'activité antitumorale du 5-FU [50].

L'altération des cibles médicamenteuses et/ou des ligands correspondants peut être à l'origine de la résistance aux médicaments, qu'il s'agisse de médicaments de chimiothérapie ou de médicaments de thérapies moléculaires ciblées. Plusieurs études ont montré que la forte expression de l'enzyme TS est un déterminant crucial dans la résistance du CCR au 5-FU. Cela s'explique par la liaison du 5-FU à la TS qui bloque le mécanisme de rétroaction négative (negative feedback), ce qui entraîne une augmentation de l'expression de TS [48]. Par conséquent, les méthodes développées pour inhiber cette voie de rétroaction négative constitueront un nouveau moyen de lutter contre la résistance.

Résistance aux thérapies ciblées

En ce qui concerne la résistance aux thérapies ciblées, divers mécanismes ont également été décrits, tels qu'une mutation de la cible, une surexpression ou une activation de la voie en aval de la cible initiale, ou même un échange de signaux entre différents effecteurs de voies de signalisations [51]. Outre le statut de la protéine RAS qui influence la résistance initiale aux anti-EGFR, d'autres mécanismes de résistance à ces traitements ont été expliqués. La mutation S492R de l'EGFR consistant à remplacer une serine par une arginine au niveau du codon 492, entraîne une modification du domaine extracellulaire du récepteur et une résistance au Cetuximab [52].

Partie II. La thérapie photodynamique

II.1. Historique

Les premiers rapports connus sur la photothérapie, anciennement connue sous le nom d'héliothérapie, datent de plus de trois mille ans. La lumière solaire était utilisée par les civilisations égyptienne, indienne et chinoise pour traiter différentes pathologies telles que le vitiligo, le psoriasis ou même le cancer de la peau [53]. C'est au début du XX^{ème} siècle que l'importance de la lumière dans le traitement des maladies a été reconnue, et le Prix Nobel de médecine a été décerné à Niels Finsen pour sa contribution dans ce domaine. Finsen a découvert que la lumière du soleil ou la lumière d'une lampe à arc au carbone munie d'un filtre thermique pouvait être utilisée pour traiter le lupus vulgaris, une affection tuberculeuse de la peau. Cette découverte a marqué le début de la photothérapie moderne [54]. En 1900, un étudiant en médecine allemand, O. Raab, a rapporté pour la première fois la mort cellulaire induite par l'interaction de la lumière avec des produits chimiques. Plus tard, en 1904, H. von Tappeiner et A. Jesionek ont traité des tumeurs cutanées avec de l'éosine et de la lumière blanche, ainsi ils ont identifié que l'oxygène est un composant intégral des réactions de photosensibilisation [55]. Le terme « action photodynamique » a été ainsi introduit pour décrire ce phénomène. Depuis le XXI^{ème} siècle jusqu'à nos jours, la PDT n'a cessé d'évoluer et son application clinique a été étendue à d'autres domaines que le traitement des tumeurs (**Figure 17**).

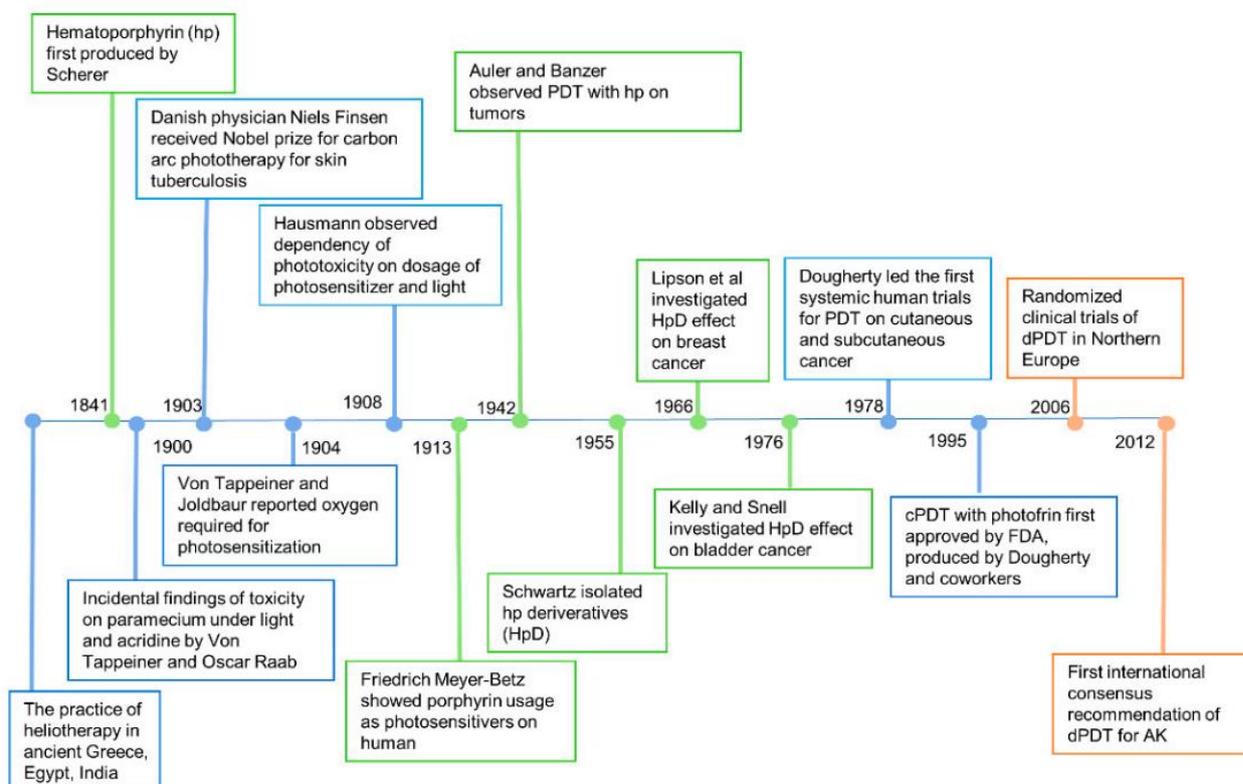


Figure 17. Histoire de la thérapie photodynamique [53].

II.2. Principe de la PDT

La PDT à visée anticancéreuse est une modalité thérapeutique non-invasive, qui implique l'intégration de trois composants non toxiques : le photosensibilisateur (PS), la lumière à une longueur d'onde appropriée qui active le PS et l'oxygène moléculaire. Tout d'abord, le PS est administré au patient (par voie topique ou intraveineuse), il s'accumule sélectivement dans les tissus tumoraux. Après un certain temps, appelé « drug-light interval », la région tumorale est éclairée par une source de lumière spécifique, généralement dans la région spectrale rouge ($\lambda \geq 600$ nm). Une fois activé par la lumière, le PS est capable de déclencher une cascade de réactions photochimiques produisant des espèces hautement toxiques : espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou reactive oxygen species (ROS) à partir de l'oxygène moléculaire qui vont entraîner la mort des cellules tumorales (**Figure 18**).

La PDT repose sur le principe de détruire les cellules tumorales tout en préservant les tissus sains avoisinants. Elle est basée sur une irradiation locale de la région tumorale, d'où une meilleure sélectivité tumorale et des effets secondaires limités par rapport aux thérapies conventionnelles [40]. En utilisant une irradiation lumineuse localisée, la sélectivité de l'action de la PDT permet de lyser les cellules tout en préservant les cellules saines.

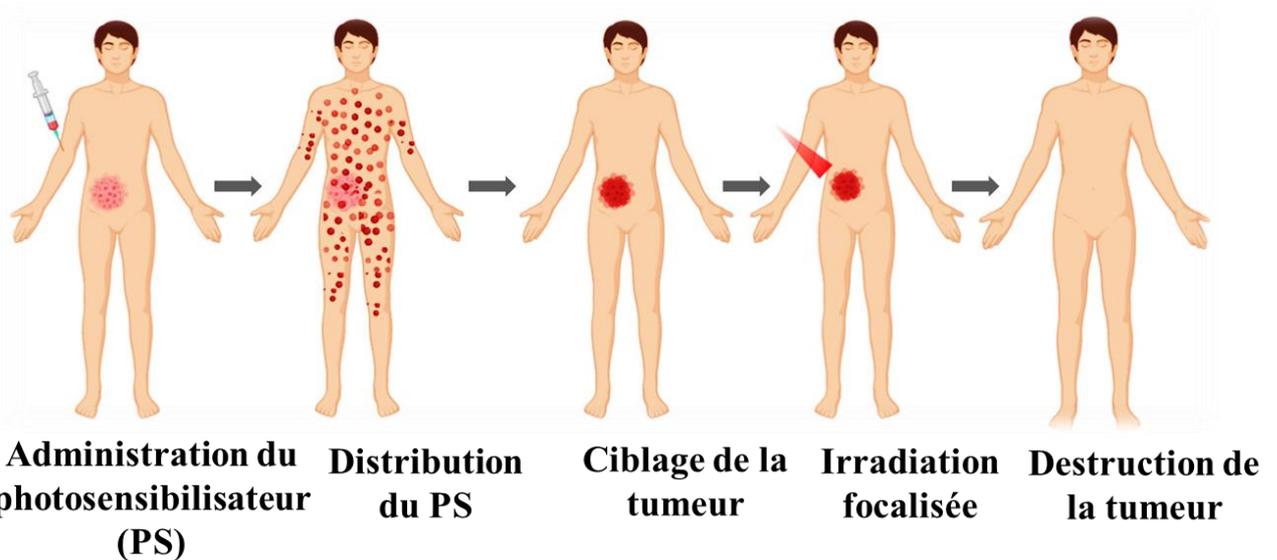


Figure 18. Principe de la PDT [56].

II.3. Mécanismes de la PDT

La sélection de longueurs d'onde adéquates et les caractéristiques photochimiques des PS donnent à cette approche deux dimensions thérapeutiques différentes :

- La photothérapie : en absorbant la lumière, le PS déclenche des réactions photochimiques qui peuvent conduire à la destruction des cellules cancéreuses en générant des ROS.
- Le photodiagnostic (PD) : est basé sur l'excitation du PS par une lumière à une longueur d'onde spécifique, entraînant l'émission de la fluorescence, ce qui facilite la détection précoce de la lésion pré-néoplasique. Ce mécanisme, lorsqu'il est

associé à des outils appropriés (émission et détection de longueurs d'onde adéquates) permet de visualiser avec précision les cellules malignes sans les endommager. Cela fait de la PD une technologie prometteuse avec un large éventail d'applications.

L'idée d'utiliser les PS dans le diagnostic du cancer vient principalement de leur affinité accrue pour les cellules cancéreuses (principalement due à l'absorption accrue par les cellules cancéreuses et à la tendance à s'accumuler dans les zones où la perfusion sanguine est plus importante). Le PD se déroule en trois étapes : (a) l'internalisation du PS dans les cellules tumorales, (b) l'application d'une lumière de courte longueur d'onde (330 à 410 nm), et (c) l'émission de fluorescence. Par conséquent, l'accumulation du PS dans le tissu néoplasique et l'absorption de la lumière entraînent l'excitation du PS d'un état fondamental à un état excité unique. Le gain d'énergie résultant du changement d'état est exprimé sous forme de fluorescence (**Figure 19**), ce qui facilite le diagnostic (**Figure 20**). L'excitation générée est de courte durée et le PS ne peut déclencher aucun processus cellulaire. Grâce à l'utilisation de PS comme l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), il est possible de repérer les tumeurs, les cellules tumorales circulantes, ou même les vésicules extracellulaires circulantes dérivées de tumeurs [57][58].

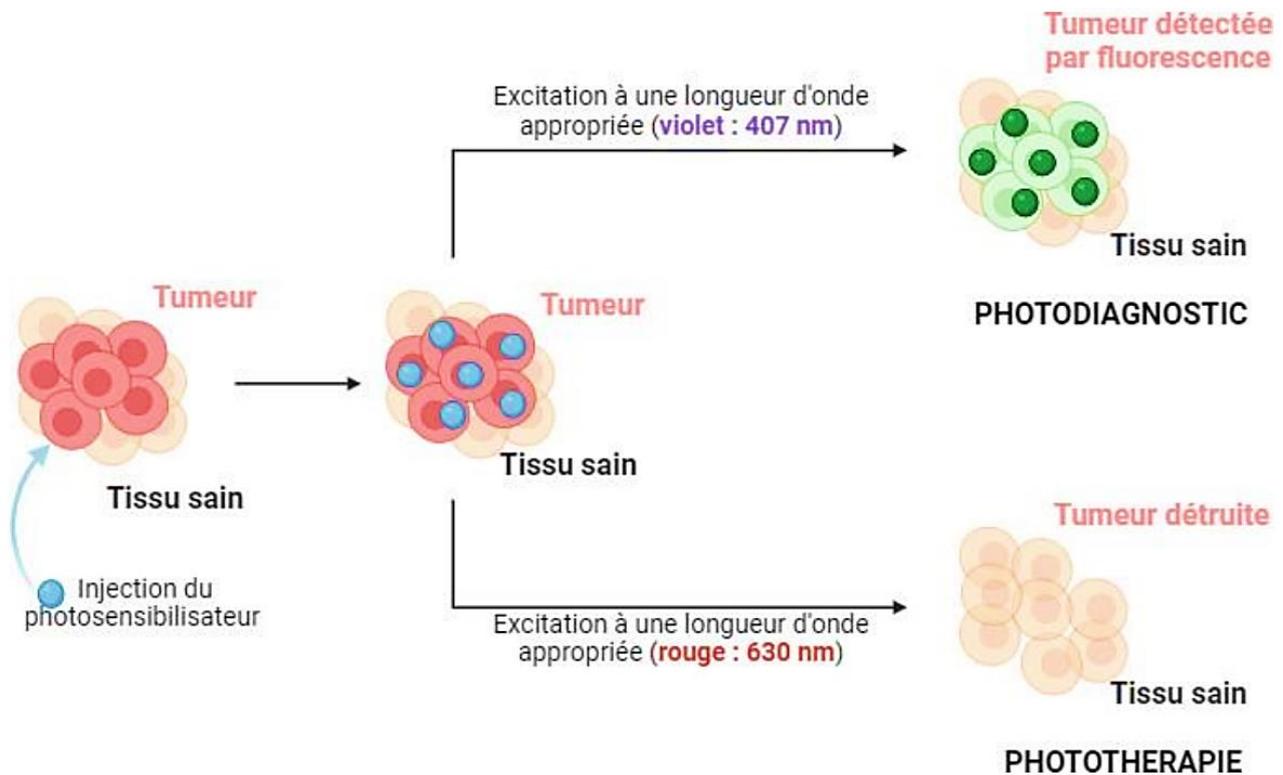


Figure 19. Principe de la PDT et du PD [59].

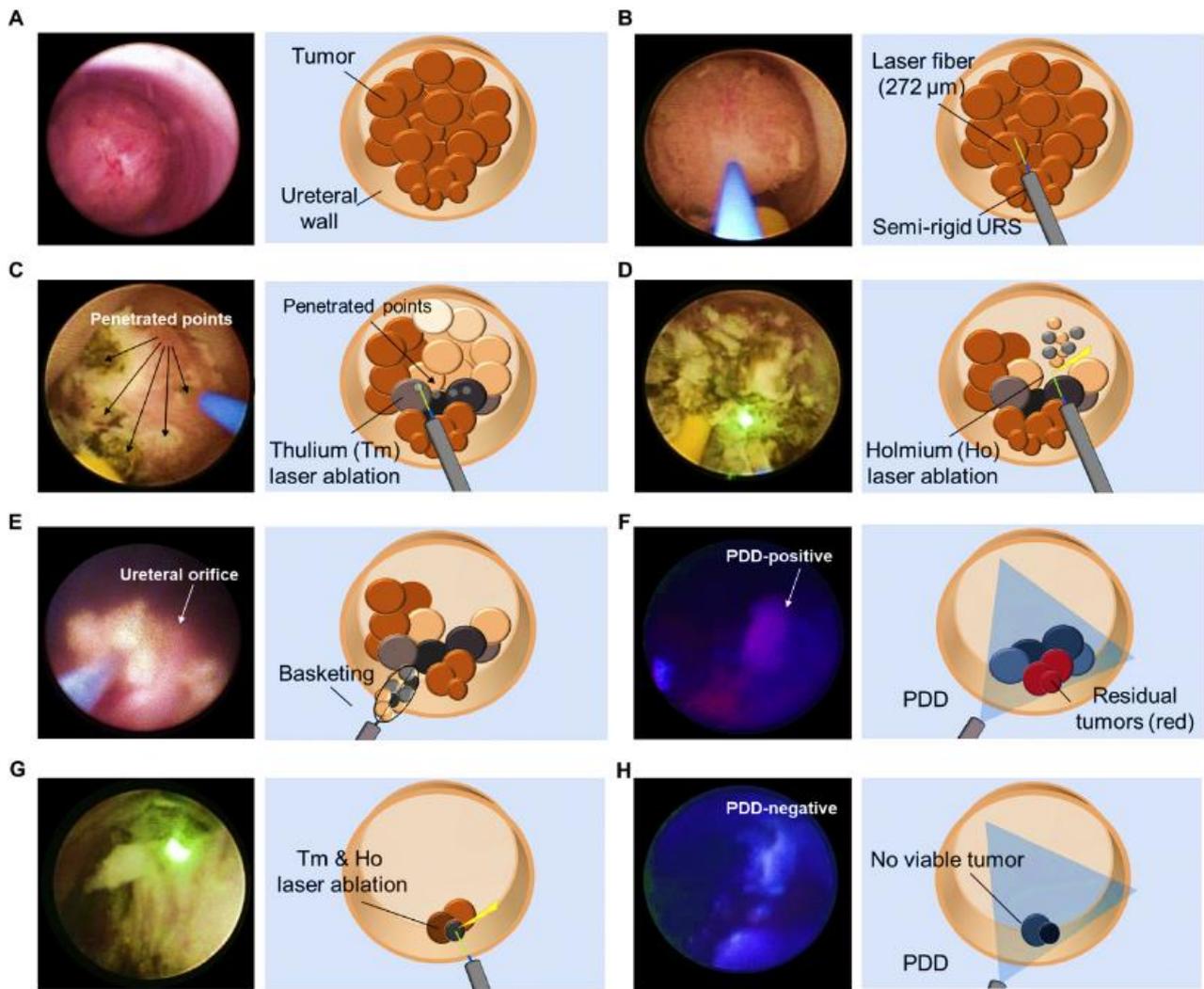


Figure 20. Intervention chirurgicale pour l'ablation des tumeurs urétérales guidée par le PD.

(A) Observation de la tumeur en lumière blanche. (B) Pénétration de la tumeur à l'aide d'une fibre laser. (C) Ablation de la tumeur avec un laser au thulium. (D) Résection de la tumeur ischémique à l'aide d'un laser holmium. (E) Élimination des fragments tumoraux à l'aide d'un panier. (F) Identification des marges chirurgicales et des microtumeurs résiduelles à l'aide du PD. (G) Ablation et résection des tumeurs résiduelles à l'aide des deux lasers. (H) Confirmation qu'il n'y a pas de tumeurs PD-positives. URS = urétéroscope [60].

II.4. Les réactions photochimiques

La PDT repose sur l'interaction de trois composants principaux : le PS, la lumière à une longueur d'onde spécifique et l'oxygène moléculaire. L'absence de l'un de ces composants entraîne l'absence d'effet de la PDT. Les réactions photodynamiques commencent lorsque les PS absorbent la lumière dans le tissu cible. La plupart des PS dans leur état fondamental (généralement singulet) ont deux électrons avec des spins opposés. Après l'absorption de la lumière, le PS passe de son état fondamental (état singulet, ^1PS) à un état singulet excité de plus haute énergie et de courte durée (quelques nanosecondes, $^1\text{PS}^*$). Cet état instable possède un excès d'énergie qui sera libéré spontanément sous forme de chaleur par conversion interne, émission de fluorescence utilisée en PD, ou passage à un état intermédiaire connu sous le nom d'« état triplet » utilisé en PDT. Par une conversion intersystème, l'état singulet peut évoluer vers un état excité plus stable et de longue durée (état triplet, $^3\text{PS}^*$), par conversion de spin de l'électron dans l'orbitale de plus haute énergie. Cet état excité peut retourner vers l'état fondamental par émission de lumière (phosphorescence) ou subir deux types de réactions. L'état triplet a une durée de vie plus longue (jusqu'à des dizaines de microsecondes), ce qui laisse suffisamment de temps pour transférer directement l'énergie à l'oxygène moléculaire.

II.4.1. Les réactions photochimiques de type I

Un processus de type I peut se produire lorsque la PS réagit directement avec une molécule organique dans un microenvironnement cellulaire, en acquérant un atome d'hydrogène ou un électron pour former un radical, conduisant à la formation d'ERO. La PS excitée et le substrat (S) à l'état fondamental peuvent tous deux agir en tant que donneurs d'hydrogène. Les espèces radicalaires résultant des processus primaires de type I peuvent ensuite participer à différents types de réactions. En présence d'oxygène, par exemple, les formes oxydées de la PS ou du substrat réagissent facilement avec l'oxygène pour donner des radicaux peroxydes, initiant ainsi une auto-oxydation de la chaîne radicalaire. Les formes semi-réduites de la PS ou du substrat interagissent aussi efficacement avec l'oxygène, et le transfert d'électrons génère des radicaux anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$). La dismutation ou la réduction à un électron de ($\text{O}_2^{\cdot-}$) donne du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peut à son tour subir une réduction à un électron pour devenir un oxydant puissant, le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) (**Figure 21**). Ces ERO produits sont très réactifs et peuvent endommager de nombreuses biomolécules [61][62].

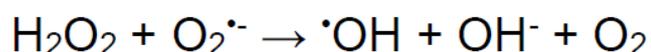
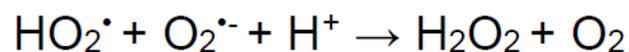
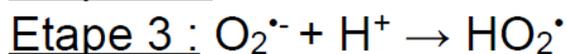
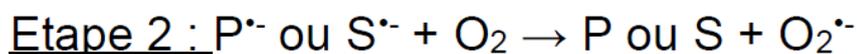
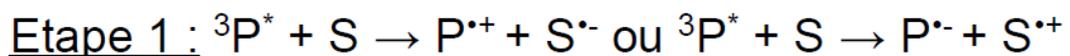


Figure 21. Les réactions photochimiques de type I [61].

II.4.2. Les réactions photochimiques de type II

Les réactions de type II se produisent lorsque l'état triplet interagit directement avec l'oxygène moléculaire, ce qui entraîne la production d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$).

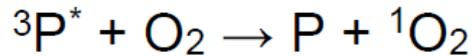


Figure 22. Les réactions photochimiques de type II.

Ces ERO, ainsi que l'oxygène singulet produit par la voie de type II, sont des agents oxydants qui peuvent réagir directement avec de nombreuses molécules biologiques. Les résidus d'acides aminés dans les protéines sont des cibles importantes, notamment la cystéine, la méthionine, la tyrosine, l'histidine et le tryptophane. En raison de leur réactivité, ces acides aminés sont la cible principale d'une attaque oxydative sur les protéines. Les lipides insaturés subissent généralement des réactions de type enzymatique pour donner des hydroperoxydes lipidiques (LOOH dérivés des phospholipides et du cholestérol). L'ADN peut être également endommagé par l'oxydation à la fois au niveau des bases nucléiques et au niveau des sucres qui relient les brins d'ADN par l'oxydation des liaisons de sucre ou la réticulation de l'ADN avec les protéines (une forme de dommage particulièrement difficile à réparer pour la cellule). Bien que toutes les cellules aient une certaine capacité à réparer les dommages oxydatifs causés aux protéines et à l'ADN, des dommages excessifs peuvent provoquer des mutations ou la mort cellulaire.

Les produits résultant des réactions de type I et de type II sont responsables de l'effet de mort cellulaire et de l'effet thérapeutique de la PDT. Les réactions de type I et de type II peuvent se produire simultanément et le rapport entre ces processus dépend du PS, du substrat, de la concentration en oxygène et de l'affinité de liaison du PS avec le substrat. Cependant, la réaction de type II est prédominante pendant la PDT et l'oxygène singulet est le principal agent cytotoxique responsable des effets biologiques. Le rendement quantique de la formation d'oxygène singulet est l'une des caractéristiques les plus importantes d'un PS et est déterminé par le rendement quantique et la durée de vie de son état excité triplet. En raison de la forte réactivité et de la courte demi-vie des ERO, les cellules proches de la zone de production des ERO (zones où le PS est localisé) sont directement affectées par la PDT. L'étendue des dommages et de la cytotoxicité résultant de la PDT est multifactorielle et dépend du type de PS, de sa localisation extracellulaire et intracellulaire et de la dose totale administrée, de la dose de lumière (fluence lumineuse) et du taux de fluence lumineuse, de la disponibilité de l'oxygène et du temps écoulé entre l'administration du PS. La PDT des tumeurs plus profondes et hypoxiques est plus difficile en raison de la faible concentration en oxygène et de la faible pénétration de la lumière dans le tissu (absorption de la lumière par le PS et transfert d'énergie à l'oxygène). En revanche, les tumeurs plus superficielles et plus oxygénées permettent une plus grande production de ROS et donc un traitement PDT plus efficace [62][63].

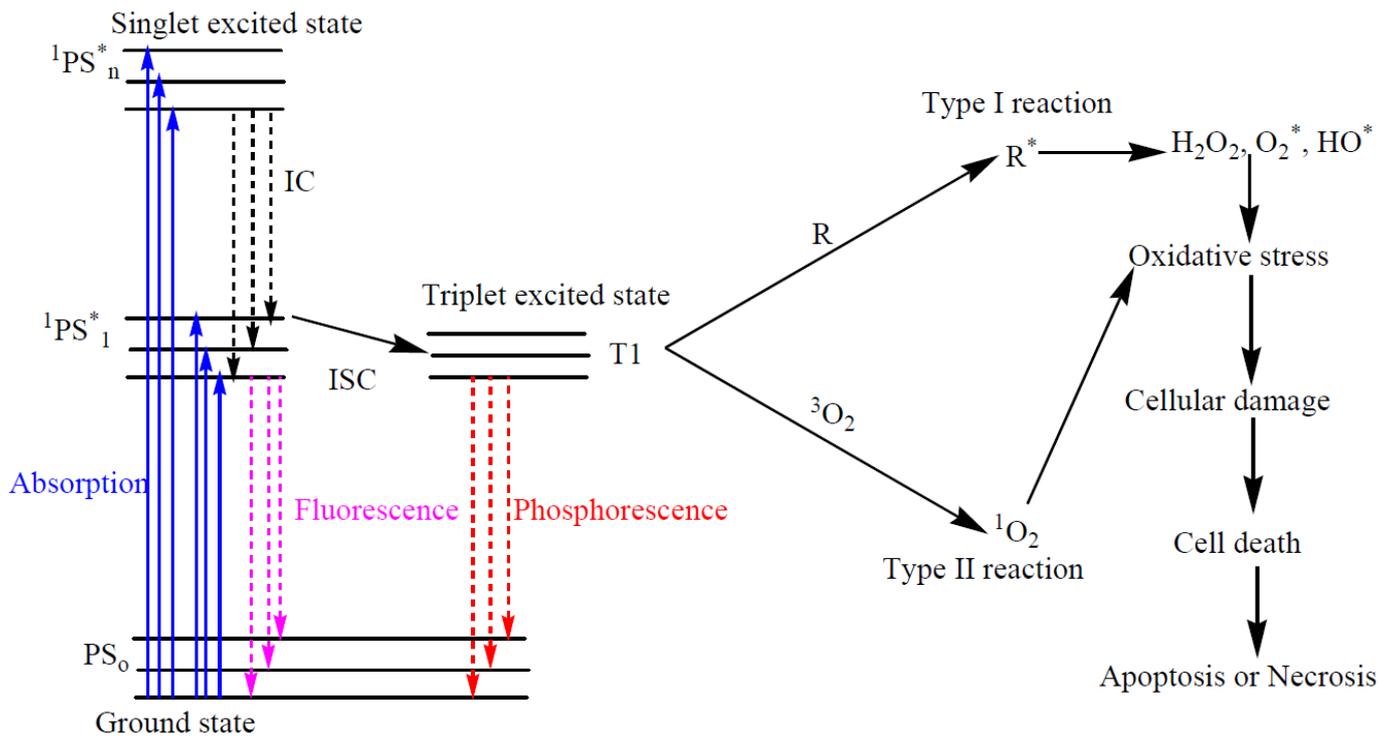


Figure 23. Diagramme de Jablonski modifié décrivant le processus de la PDT.

Abréviations : IC : conversion interne ; ISC : conversion intersystème; PS : photosensibilisateur ; $1PS^*$: photosensibilisateur excité singulet ; T1 : état excité triplet ; R : substrat biologique ; R^* : substrat biologique oxydé ; 1O_2 : oxygène singulet ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; O_2^* : superoxyde ; HO^* : radical hydroxyle.

II.5. Mécanismes d'action médiés par la PDT

Les produits résultant des deux réactions photodynamiques conduisent à la destruction de la tumeur et à l'effet thérapeutique global de la PDT par le biais de trois mécanismes interdépendants : effets cytotoxiques sur les cellules tumorales (mécanismes directs), dommages indirects au système vasculaire associé à la tumeur et induction d'une réponse inflammatoire et activation d'une réponse immunitaire (mécanismes indirects) (**Figure 24**).

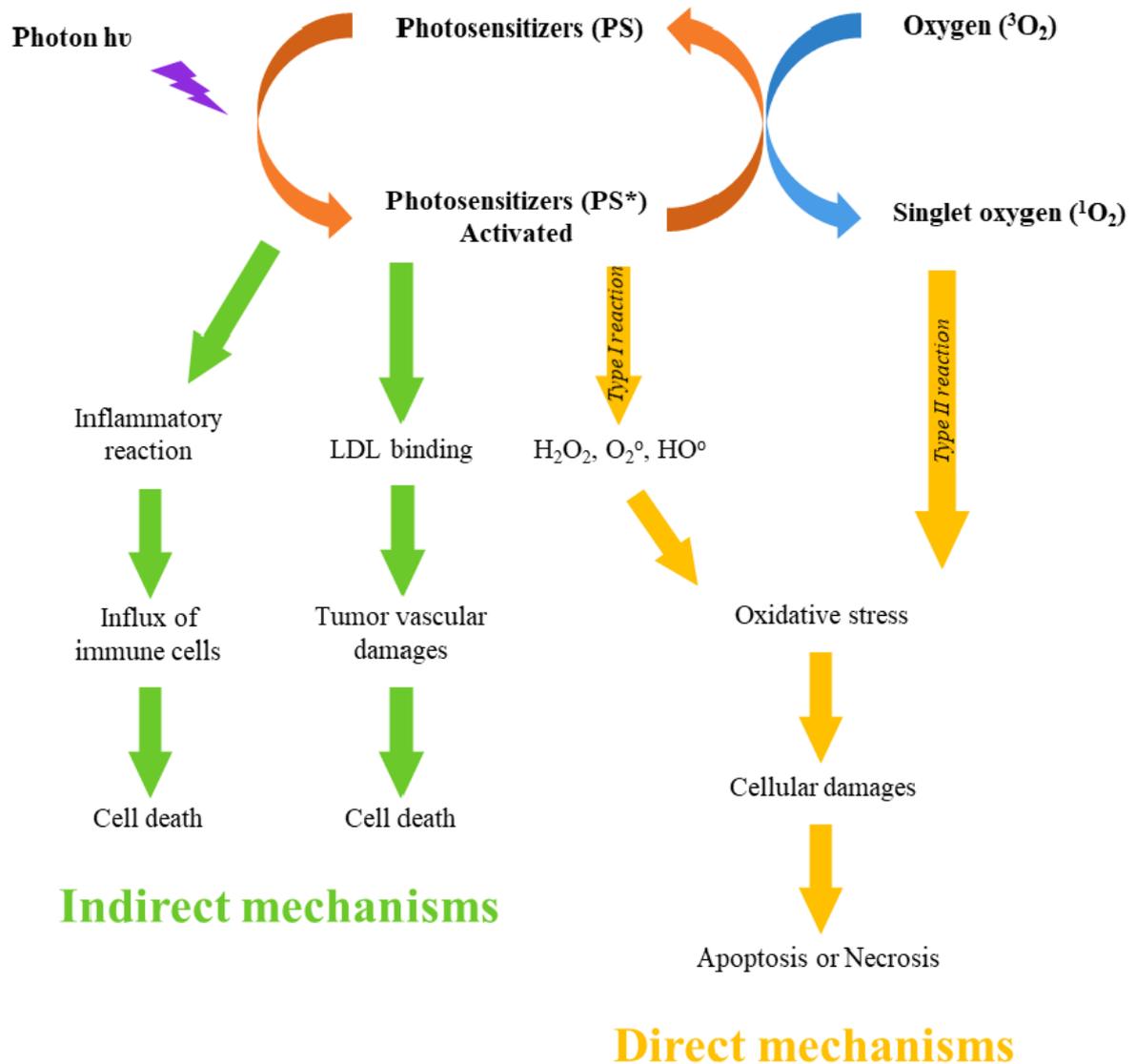


Figure 24. Mécanisme de la réaction photodynamique et les effets biologiques [64].

II.5.1. Mécanismes directs

L'activité biologique des PS dans la cellule peut varier en fonction de leur type, de leur localisation dans la cellule, de la dose et de la voie d'administration. Ces différences peuvent entraîner des altérations dans la régulation des mécanismes de signalisation cellulaire. Par conséquent, la cellule peut répondre à la PDT par plusieurs réponses biologiques telles que l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie (**Figure 25**). La nécrose est une mort cellulaire non programmée. En PDT, cette réaction cellulaire est provoquée par les ERO (réaction de type I) et par l'oxygène singulet (réaction de type II). La nécrose entraîne une augmentation de la perméabilité et une perte d'intégrité des membranes cellulaires. Le contenu cellulaire se diffuse également dans les tissus environnants, provoquant des réactions inflammatoires. Il est également proposé que la génération d'oxygène singulet par la PDT soit responsable de l'activation de la voie nécrotique dépendante de RIP3 (receptor-interacting protein 3) [65].

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme cellulaire normal et programmé par les cellules en réponse à un signal. En effet, les dommages cellulaires provoqués par la PDT peuvent être atteints par des mécanismes cruciaux d'apoptose, qui sont activés par l'induction de protéines pro-apoptotiques (rapport Bax/Bcl-2) et les protéines caspases [66].

L'autophagie est un mécanisme cellulaire essentiel, impliqué dans l'élimination des composants inutiles ou dysfonctionnels. Il a été démontré que le photodommage peut provoquer l'autophagie. Lorsque la PDT induit la génération des ERO, le stress cellulaire augmente et la protéine Bécline-1 peut induire un mécanisme d'autophagie [67].

En général, lorsqu'une intensité lumineuse élevée est utilisée, les cellules tumorales sont rapidement éliminées par nécrose. En revanche, la mort apoptotique peut être déclenchée par la PDT, généralement lorsque de faibles doses de lumière sont utilisées [63].

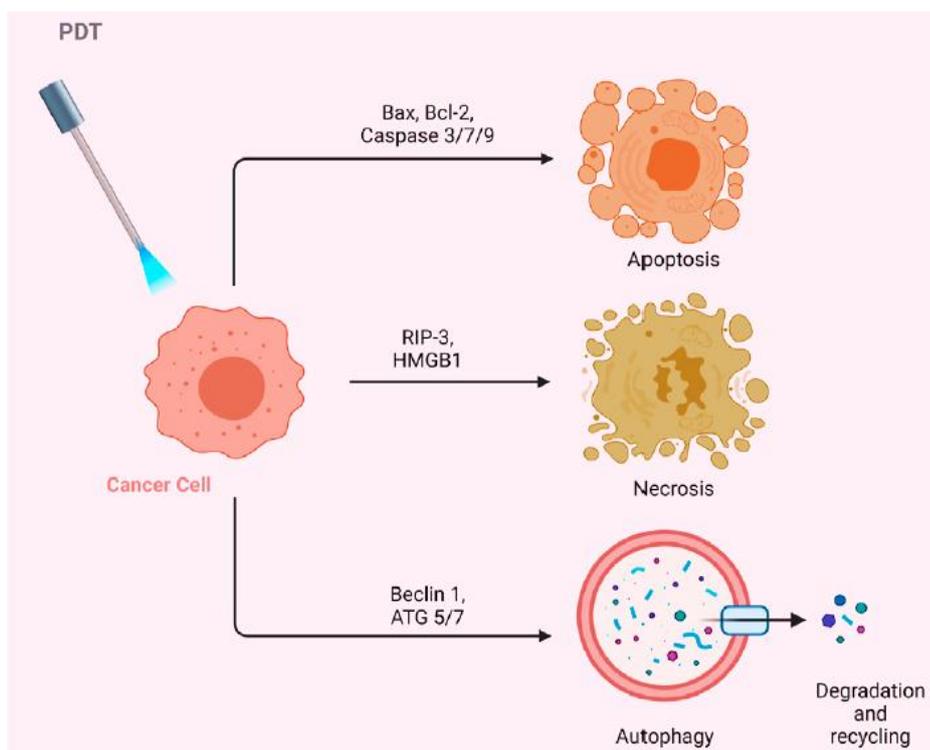


Figure 25. Effets de la PDT sur les cellules cancéreuses [65].

II.5.2. Mécanismes indirects

II.5.2.1. Mécanismes vasculaires

Outre la destruction directe des cellules tumorales, l'application de la PDT entraîne souvent la destruction de la micro-vascularisation de la tumeur. Comme les cellules tumorales, les cellules endothéliales du système vasculaire peuvent concentrer les PS pour créer des radicaux libres lorsqu'elles sont activées par une lumière appropriée. La rupture des parois vasculaires entraîne l'interruption de l'alimentation de la tumeur (l'oxygène et les nutriments) et, par conséquent, la mort des cellules tumorales. Il a été démontré que l'effet vasculaire de la PDT est très important pour l'efficacité à long terme de la PDT. La sélectivité des protocoles de PDT vasculaire est obtenue par l'application précise de la lumière sur la tumeur, avec une marge de sécurité pour les tissus sains environnants. La PDT vasculaire présente des avantages importants par rapport aux protocoles de PDT qui nécessitent une accumulation de PS dans les cellules tumorales : elle utilise des PS qui s'éliminent rapidement de l'organisme et minimisent la photosensibilité de la peau, elle est plus efficace à long terme et peut être réalisée en une seule séance courte. Les PS étant principalement hydrophobes, ils se lient aux LDL (Low Density Lipoproteins) plasmatiques et s'accumulent donc au niveau des récepteurs LDL dans le tissu endothélial en prolifération dans le cas du tissu tumoral. Avec cette accumulation dans les néovaisseaux et après l'activation des PS, des lésions vasculaires se produisent autour de la tumeur, entraînant la mort des cellules par épuisement de l'oxygène et des nutriments [63][64].

II.5.2.2. Mécanismes immunologiques

La PDT a été considérée comme un traitement localisé, n'affectant que les cellules tumorales et la vascularisation de la tumeur. Plus récemment, de nombreuses études ont démontré que la PDT peut influencer de manière significative la réponse immunitaire adaptative de diverses manières, soit par la stimulation, soit par la suppression de la réponse immunitaire [68]. L'efficacité de la PDT semble dépendre de l'induction d'une immunité antitumorale. Dans certaines conditions, la PDT induit une immunosuppression, qui a été principalement associée à des réactions à des traitements topiques avec des taux de fluence élevés et dans de grandes zones d'irradiation. En revanche, les traitements PDT non topiques sont souvent décrits comme immunostimulants. Les dommages oxydatifs par la PDT au stroma tumoral entraînent finalement la mort des cellules. Lorsque la PDT induit la nécrose des tumeurs et de leur système vasculaire, une cascade immunitaire est également déclenchée. La modification de l'intégrité et de l'homéostasie des tissus déclenche une réponse inflammatoire aiguë initiée par la libération de médiateurs pro-inflammatoires, qui comprennent diverses cytokines, facteurs de croissance et protéines. Ces médiateurs attirent les cellules immunitaires innées de l'hôte, telles que les neutrophiles, les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, qui infiltreront les tissus endommagés pour rétablir l'homéostasie dans la région touchée. À leur arrivée, les macrophages phagocytent les cellules cancéreuses endommagées par la PDT et présentent les protéines de ces tumeurs aux lymphocytes T auxiliaires CD4, qui activent ensuite les lymphocytes T cytotoxiques CD8. Ces lymphocytes T cytotoxiques peuvent reconnaître et détruire spécifiquement les cellules tumorales et peuvent circuler dans tout l'organisme pendant de longues périodes (réponse mémoire), assurant ainsi une réponse immunitaire antitumorale systémique [68].

II.6. Les éléments de la PDT

II.6.1. La lumière

La PDT a été réalisée avec différentes sources de lumière, notamment des lasers, de la lumière incandescente et des diodes électroluminescentes laser. Les sources de lumière laser sont généralement coûteuses et nécessitent l'utilisation d'un système optique pour étendre le faisceau lumineux afin d'irradier une plus grande surface de tissu. Les sources de lumière non laser (par exemple, les lampes conventionnelles) peuvent être utilisées avec des fibres optiques pour spécifier la longueur d'onde de la lumière pour l'irradiation des tissus. Cependant, les lampes conventionnelles peuvent avoir des effets thermiques, qui doivent être évités en PDT. Les diodes électroluminescentes (LED) ont également été utilisées en PDT comme sources lumineuses. Les LED sont moins coûteuses, moins dangereuses, thermiquement plus robustes et facilement disponibles en réseaux flexibles. La pénétration de la lumière dans les tissus tumoraux est très complexe, car elle peut être réfléchiée, diffusée ou absorbée. L'ampleur de ces processus dépend du type de tissu et de la longueur d'onde de la lumière. L'absorption de la lumière est principalement due aux chromophores endogènes présents dans les tissus, tels que l'hémoglobine, la myoglobine et les cytochromes.

L'absorption de la lumière par les tissus diminue avec l'augmentation de la longueur d'onde, de sorte que les longueurs d'onde de la lumière rouge pénètrent plus efficacement à travers les tissus (**Figure 26**). La région comprise entre 600 et 1200 nm est souvent appelée « fenêtre optique tissulaire ». Les longueurs d'onde plus courtes (<600 nm) pénètrent moins

bien dans les tissus et sont davantage absorbées, ce qui augmente la photosensibilité de la peau. D'autre part, les longueurs d'onde plus importantes (>850 nm) n'ont pas assez d'énergie pour exciter l'oxygène dans son état singulet et pour produire suffisamment d'ERO. Par conséquent, la perméabilité tissulaire la plus élevée se situe entre 600 et 850 nm. Cette plage, appelée « fenêtre photothérapeutique », ou “phototherapeutic window” est principalement utilisée en PDT.

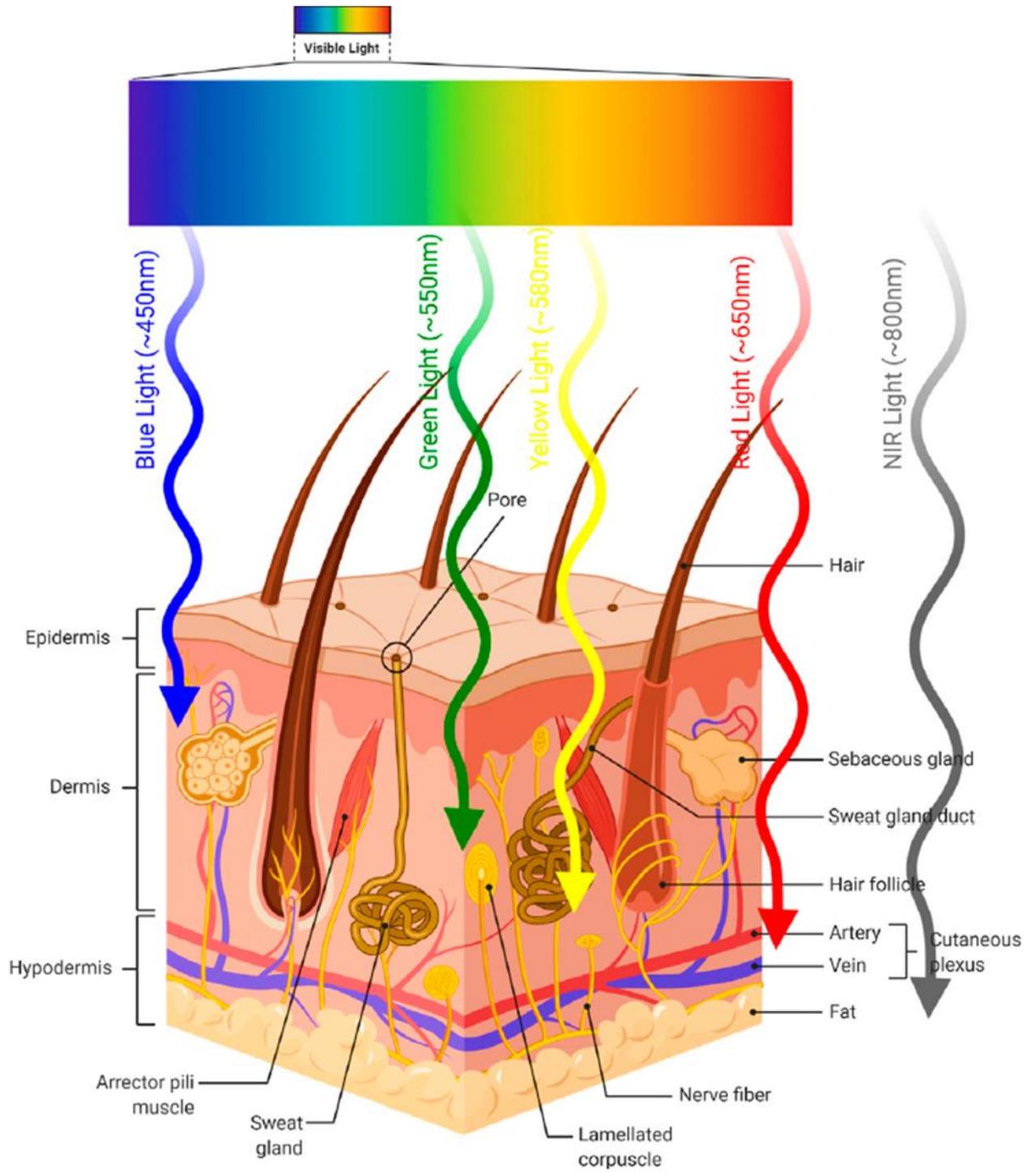


Figure 26. Pénétration de la lumière dans la peau [65].

La lumière étant un élément essentiel de la PDT, l'efficacité clinique dépend fortement de la fluence lumineuse, du taux de fluence lumineuse, du temps d'exposition à la lumière et du mode de délivrance de la lumière (unique ou fractionné). La fluence lumineuse est l'énergie totale de la lumière exposée sur une section de la tache irradiée et est exprimée en J/cm^2 . Le taux de fluence lumineuse est l'énergie incidente par seconde sur une section du spot irradié et est exprimé en W/cm^2 . Plusieurs études ont montré que les faibles débits de fluence lumineuse sont avantageux pour la PDT [65][69][70]. La lumière solaire peut également être utilisée comme source lumineuse dans la PDT [71]. On sait que la lumière du jour ne peut pas pénétrer dans les tissus profonds et que son spectre d'émission contient une grande proportion de lumière bleue, de sorte que cette thérapie est efficace pour les traitements superficiels tels que la kératose actinique. L'application de la lumière du jour-PDT est sûre, bien tolérée et presque indolore et n'est généralement pas chirurgicale. Pour cette application spécifique, les patients exposent les sites à la lumière du jour pendant 2 heures, après 30 minutes d'application du PS. La courte durée d'incubation des PS dans la PDT à la lumière du jour, comparée à la PDT conventionnelle (1-3 h nécessaires), permet une activation plus petite et plus continue des PS, ce qui entraîne une diminution de l'intensité de la douleur associée à la PDT chez le patient [63].

La PDT basée sur l'excitation mono-photonique ou « single-photon excitation » présente certaines limites, notamment lorsque l'activation lumineuse des PS est possible avec une lumière ultraviolette (UV) ou visible inférieure à la plage de longueurs d'onde thérapeutique, ce qui provoque souvent des dommages photo-induits sur les tissus sains. Pour surmonter ce problème, les chercheurs ont réussi à mettre au point de nouveaux PS qui peuvent être activés par le processus d'absorption à deux photons ou « two-photon absorption ». La PDT à deux photons (TP-PDT) est une technique qui a été développée ces dernières années grâce à de nouvelles sources de laser et de PS. Cette technique est basée sur l'utilisation de deux photons de lumière infrarouge (NIR) qui sont absorbés simultanément par le PS, ce qui entraîne la génération d'oxygène singulet et d'autres ERO qui peuvent tuer les cellules cancéreuses (**Figure 27**) [72]. L'énergie combinée de deux photons à l'aide d'un laser pulsé femtoseconde (fs) est suffisante pour exciter les PS à leurs états excités. Ainsi, TP-PDT combine les propriétés uniques de l'excitation à deux photons avec le concept de PDT. Cette combinaison augmente considérablement la précision et la profondeur du traitement par PDT. Grâce à sa capacité à cibler les tissus plus profonds et à éviter d'endommager les cellules saines, la TP-PDT est une méthode prometteuse pour un large éventail d'applications biomédicales, en particulier dans le traitement du cancer, et la dermatologie [73]. En outre, l'utilisation de la lumière NIR réduit le risque de phototoxicité et d'autres effets secondaires indésirables associés à la PDT traditionnelle, car elle a une énergie plus faible et des longueurs d'onde plus grandes qui peuvent pénétrer plus profondément dans la peau. La TP-PDT s'est révélée efficace dans le traitement de divers cancers de la peau, notamment le mélanome [72].

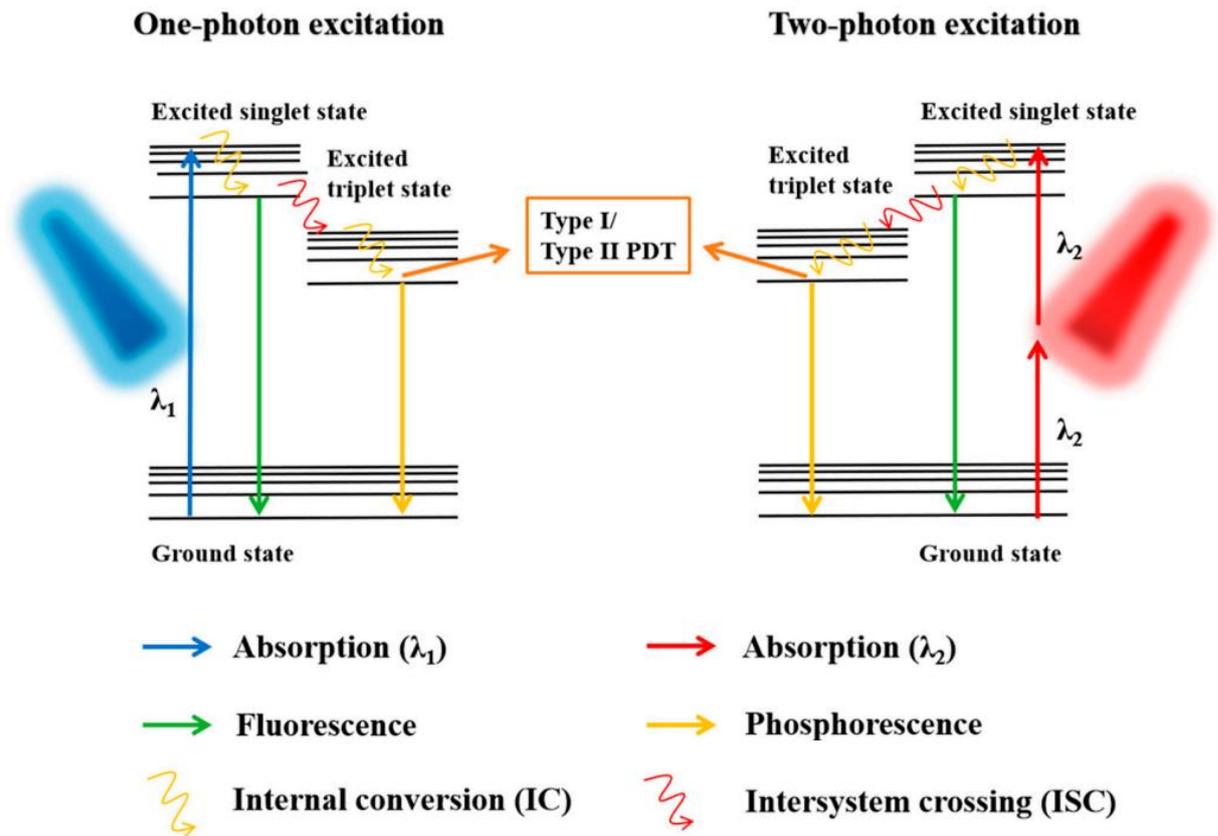


Figure 27. Activation du PS par excitation à un photon et excitation à deux photons [72].

II.6.2. L'oxygène moléculaire

Le deuxième élément clé du mécanisme de la PDT est l'oxygène moléculaire. L'oxygène est crucial pour la production d'ERO pendant la PDT. La concentration d'oxygène dans les tissus affecte l'efficacité du traitement PDT. En fait, la concentration d'oxygène peut varier de manière significative entre différentes tumeurs et même entre différentes régions d'une même tumeur, en fonction de la densité du système vasculaire. Le manque d'oxygène peut être un facteur limitant, en particulier dans les tumeurs solides profondes, souvent caractérisées par un microenvironnement anoxique. L'irradiation de la tumeur avec un taux de fluence lumineuse élevé peut conduire à un appauvrissement local temporaire en oxygène. Cela entraîne une interruption de la production d'ERO et une réduction de l'efficacité du traitement [74].

La mesure en temps réel des niveaux d'oxygène dans les tissus avant et pendant la PDT est l'un des principaux défis à relever dans un avenir proche. Cela permet d'optimiser le résultat thérapeutique de la PDT en ajustant le taux de fluence de la lumière (en augmentant le temps d'irradiation pour maintenir la dose totale de lumière) ou en utilisant une dose fractionnée de lumière. Plusieurs capteurs ont été utilisés pour surveiller le niveau d'oxygène dans les milieux biologiques, à l'aide d'agents d'imagerie. D'autres méthodes ont été testées pour augmenter la disponibilité de l'oxygène dans la tumeur, comme l'introduction indirecte de l'oxygène. Une façon indirecte d'augmenter la concentration d'oxygène dans les cellules tumorales consiste à utiliser l'enzyme catalase pour décomposer le peroxyde d'hydrogène intracellulaire en oxygène. L'apport direct d'oxygène dans les tumeurs est également réalisé en utilisant des transporteurs d'oxygène, tels que les perfluorocarbones et l'hémoglobine, couramment utilisés pour surmonter l'hypoxie tumorale dans la procédure PDT [75].

II.6.3. Les photosensibilisateurs

L'un des trois éléments cruciaux de la PDT, outre la lumière et l'oxygène, est la présence de photosensibilisateurs (PS). Ces PS sont définis comme des substances capables d'absorber la lumière à une longueur d'onde spécifique et de déclencher des réactions photochimiques. La plupart des PS approuvés pour le traitement du cancer sont basés sur une structure tétrapyrrolique, similaire à celle de la protoporphyrine contenue dans l'hémoglobine.

II.6.3.1. Propriétés des PS idéaux

Le choix du PS est essentiel pour l'efficacité de la PDT contre le cancer. Ainsi, le PS idéal doit présenter plusieurs critères :

- Toxicité minimale à l'obscurité avec des effets indésirables limités lors de l'administration tels que l'hypotension ou les réactions allergiques.
- Absorption maximale de la lumière doit se situer à des longueurs d'onde comprises entre 600 et 800 nm. L'absorption de la lumière à une longueur d'onde supérieure à 800 nm ne fournit pas suffisamment d'énergie pour stimuler l'oxygène dans son état singulet et la production d'autres ERO, et des longueurs d'onde inférieures à 400 nm entraîne une photosensibilité excessive causée par la lumière solaire.
- Synthèse simple, peu coûteuse et facilement disponible.

- Le PS doit être un composé pur avec une composition constante et stable.
- Idéalement soluble dans l'eau ou dans un mélange de solvants aqueux. Il ne doit pas s'agréger dans les environnements biologiques, car cela les rend photodynamiquement inactifs.
- Haute sélectivité pour les tissus néoplasiques : le PS doit être lentement éliminé des zones affectées et y rester au moins quelques heures, mais être rapidement éliminé des tissus sains, minimisant ainsi les effets de la phototoxicité.
- Il est préférable d'avoir un court intervalle de temps entre l'injection et l'illumination afin de faciliter un traitement ambulatoire à la fois agréable pour le patient et économique [62].

II.6.3.2. Les PS tétrapyrroliques

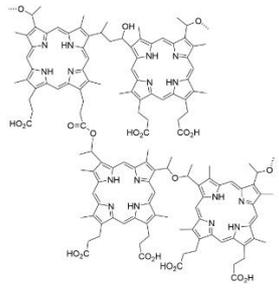
On peut classer les PS couramment utilisés dans le traitement anticancéreux en deux catégories principales : les PS non tétrapyrroliques et les PS tétrapyrroliques. La majorité des PS utilisés en clinique et en expérimentation sont dérivés du noyau aromatique tétrapyrrolique présent dans de nombreux pigments naturels tels que l'hème, la chlorophylle et la bactériochlorophylle. Les tétrapyrroles présentent généralement une bande d'absorption relativement large dans la région de 400 nm, connue sous le nom de bande de Soret, et un ensemble de bandes d'absorption progressivement plus petites à mesure que le spectre se déplace vers les longueurs d'onde rouges, connues sous le nom de bandes Q [62]. D'une manière générale, les PS tétrapyrroliques (à l'exception des bactériochlorines) ont tendance à produire principalement de l'oxygène singulet de type II, par rapport aux ERO de type I (tels que les radicaux hydroxyles) qui sont souvent produits par des PS ayant d'autres structures [76]. Les PS tétrapyrroliques incluent les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines et les phthalocyanines.

Les PS de première génération

Les PS ont été introduits dans le traitement à l'échelle commerciale pour la première fois dans les années 1970 par le Dr Thomas Dougherty et ses collègues. Ils ont testé un mélange de porphyrines solubles dans l'eau appelé « dérivé d'hématoporphyrine » (HpD). La HpD a été obtenue par purification et modification chimique de la première porphyrine utilisée comme PS l'hématoporphyrine (Hp). Ainsi, les PS de première génération comprennent principalement les HpD. Le « photofrin® » est un dérivé de l'HpD, il a été cliniquement approuvé pour les traitements par PDT de différents types de cancer tels que les cancers du poumon, de l'œsophage, de l'estomac et du col de l'utérus à un stade précoce [33] (**Tableau 5**). Actuellement, le photofrin® (également connue sous le nom de porfimère sodique) reste le PS le plus couramment utilisé. Malgré ses nombreuses applications en PDT, cette préparation présente certaines limites dans ses applications cliniques en raison des propriétés suivantes : faible pureté chimique (il s'agit d'un mélange de plus de 60 molécules) ou faible pénétration des tissus en raison d'une absorption maximale à une longueur d'onde relativement courte (630 nm). En outre, après la PDT, la peau présente une hypersensibilité à la lumière pendant plusieurs semaines en raison de la longue demi-vie du PS et de sa forte accumulation dans la

peau. Les inconvénients des PS de première génération ont rendu nécessaire la recherche de nouveaux composés et ont initié le développement des PS de deuxième génération [77][33].

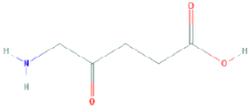
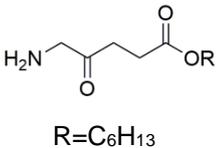
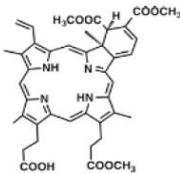
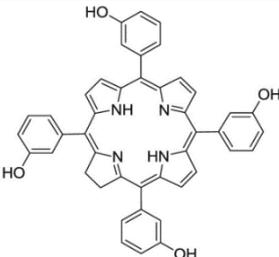
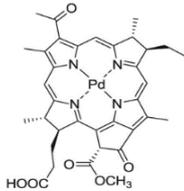
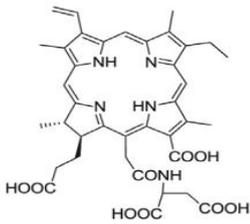
Tableau 5. Exemple du PS de première génération cliniquement utilisé en PDT [40] [77].

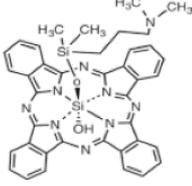
Classe	Nom	Structure	λ_{\max} (nm)	Applications
Porphyrine	Photofrin®		630	Cancer de l'œsophage et cancer du poumon

Les PS de deuxième génération

C'est à partir des années 1980 que les études sur la prochaine génération des PS ont été lancées. Plusieurs centaines de substances ayant des propriétés photosensibilisantes potentielles ont été proposées, mais seules quelques-unes d'entre elles ont été utilisées dans des essais cliniques. Le nombre de substances officiellement approuvées pour une utilisation clinique dans la PDT anticancéreuse est encore plus faible. Actuellement, le groupe de PS de deuxième génération comprend des HpD et des PS synthétiques tels que : l'acide 5-aminolévulinique, les dérivés de benzoporphyrine, les texaphyrines, les dérivés de thiopurine, la chlorine ainsi que les analogues de la bactériochlorine et les phtalocyanines (**Tableau 6**). L'utilisation de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) s'est révélée être une découverte importante du précurseur de la protoporphyrine IX (PpIX). L'ALA est une sorte de prodrogue qui ne devient une PS active qu'après avoir été transformée en protoporphyrine (**Figure 28**). C'est pourquoi l'ALA ou ses esters peuvent être utilisés par voie topique ou orale dans de nombreuses applications cliniques. Les PS de deuxième génération se caractérisent par une plus grande pureté chimique, un rendement plus élevé de la formation d'oxygène singulet et une meilleure pénétration dans les tissus profonds en raison de leur absorption maximale dans la gamme de longueurs d'onde 650-800 nm. En outre, ils présentent moins d'effets secondaires, ce qui résulte d'une plus grande sélectivité pour les tissus cancéreux et d'une élimination plus rapide du photosensibilisateur dans l'organisme. Le principal inconvénient des PS de deuxième génération est leur faible solubilité dans l'eau, ce qui limite considérablement leur administration par voie intraveineuse et oblige à rechercher de nouvelles méthodes d'administration [77] [78].

Tableau 6. Exemples du PS de deuxième génération cliniquement utilisés en PDT [41][79].

Classe	Nom	Structure	λ_{max} (nm)	Applications
Porphyrine	5-ALA (Levulan®/Ameluz®)		635	Kératose actinique et carcinome basocellulaire superficiel
Porphyrine	Hexvix®		635	Cancer de la vessie
Chlorine	Verteporfin (Visudyne®)		690	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
Chlorine	Temoporfin (Foscan®)		652	Cancer avancé de la tête et du cou
Bactérochlorine	Padeliporfin (TOOKAD®)		753	Cancer de la prostate
Chlorine	Talaporfin sodium (Laserphyrin®)		664	Cancers du poumon et de l'œsophage et tumeurs cérébrales

Phthalocyanine (Pc)	Silicon phthalocyanine (Pc4)		675	Cancers de l'estomac, peau, langue et sein
---------------------	------------------------------	---	-----	--

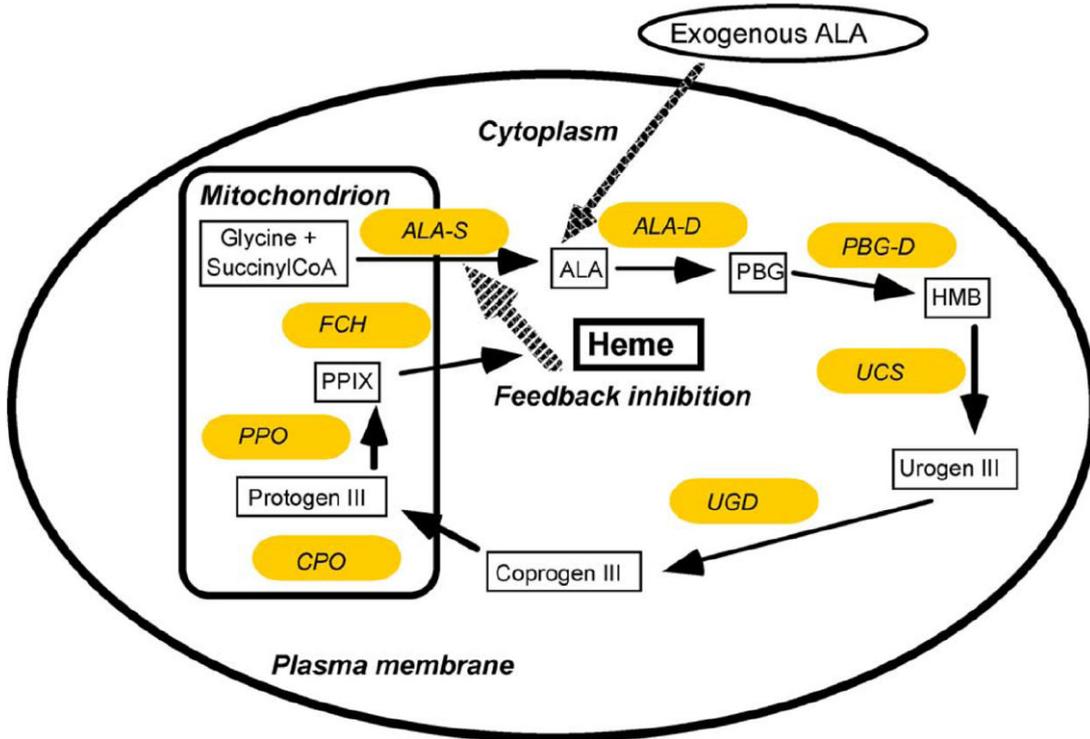


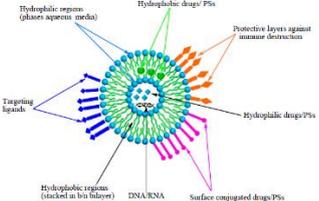
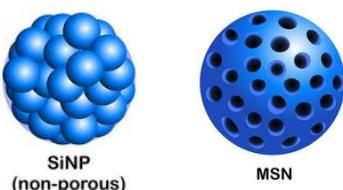
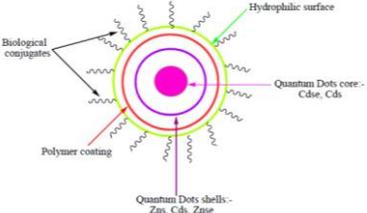
Figure 28 . Cycle de biosynthèse de l'hème et rôle de la PpIX induite par l'ALA [62].

L'ALA synthase, l'enzyme principale de la biosynthèse de l'hème, joue un rôle essentiel dans la régulation de cette biosynthèse. Elle est responsable de la synthèse des précurseurs des porphyrines (5-ALA et porphobilinogène), de la synthèse du porphyrinogène, puis de la synthèse des porphyrines pour finalement produire de l'hème en ajoutant un atome de fer. Les abréviations : 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.

Les PS de troisième génération

Les PS de troisième génération sont des molécules présentant une sélectivité améliorée pour les régions tumorales, grâce à la conjonction du PS avec des molécules de ciblage ou à son encapsulation dans des supports. Ainsi, les PS ont progressé vers l'amélioration de la spécificité et de l'efficacité de la PDT. Aujourd'hui, la fonctionnalisation des PS semble être la meilleure stratégie pour atteindre une sélectivité élevée dans les régions tumorales, en combinant les PS avec des biomolécules ou des transporteurs. Les PS peuvent être liés de manière covalente à plusieurs biomolécules qui ont une affinité pour les tumeurs. Cette nouvelle génération de PS présente un spectre d'absorption plus long et des caractéristiques améliorées avec des niveaux accrus de production des ERO par rapport aux PS de première et de deuxième génération [79]. Ces biomolécules comprennent des anticorps, des protéines, des stéroïdes, des sucres, des amines et des vitamines. Les PS peuvent également être encapsulés dans des supports, tels que des nanoparticules d'or, des nanoparticules de silice, les liposomes, les polymères, les nanoparticules métalliques, « quantum dots » ou points quantiques, des nanotubes de carbone ou d'autres supports, afin de guider les PS vers les tumeurs [80][81].

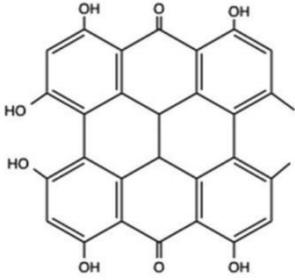
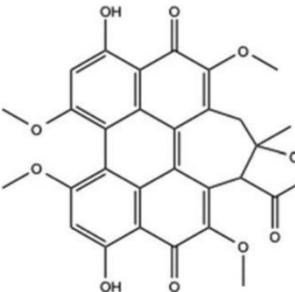
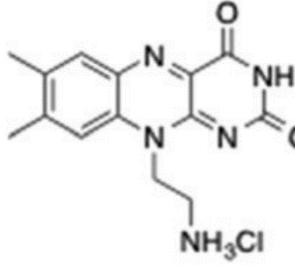
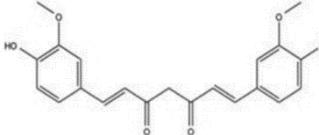
Tableau 7. Exemples de nanoparticules utilisées comme vecteurs de PS dans la PDT.

.Classe	Structure	Propriétés	Applications
Liposomes		<p>Livraison des PS hydrophobes Bonne biocompatibilité et biodégradabilité</p>	Anticancéreux
Polymères	 <p>NPs-PS</p>	<p>Biocompatibilité Livraison des PS hydrophobes Perméabilité élevée à travers les membranes cellulaires</p>	Anticancéreux
Nanoparticules de silice	 <p>SiNP (non-porous) MSN</p>	<p>Biocompatibilité et biodégradabilité élevées Hautement hydrophile Fonctionnalisation facile de la surface Production d'ERO</p>	Anticancéreux
Points quantiques		<p>Photostabilité Rendement quantique élevé</p>	Anticancéreux Antimicrobien

II.6.3.3. Les PS non tétrapyrroliques

Comme dans d'autres secteurs de la médecine, il y a aussi une tendance à l'emploi de produits naturels. Selon l'hypothèse, le PS provenant d'un produit naturel aura une toxicité globale réduite et des effets secondaires limités. Même s'ils sont beaucoup moins étudiés que les PS tétrapyrroliques, les PS non-tétrapyrroliques, principalement issus des produits naturels, constituent une autre méthodologie pour la PDT. L'utilisation de PS non-tétrapyrroliques en PDT comprend de nombreux produits tels que l'hypéricine, la riboflavine, l'hypocrelline et la curcumine [76].

Tableau 8. Exemples de composés naturels utilisés comme PS [76].

Classe	Nom	Structure	λ_{max} (nm)	Applications
Pérylènequinone	Hypéricine		570	Anticancéreux, Antimicrobien
Pérylènequinone	Hypocrelline		470	Anticancéreux Antimicrobien
Flavine	Riboflavine		440	Antimicrobien
Curcuminoïde	Curcumine		420	Anticancéreux Antimicrobien

II.7. Le photoblanchiment des PS

Comme indiqué ci-dessus, les interactions photodynamiques nécessitent la présence simultanée de PS, de lumière et d'oxygène. Cependant, de nombreux PS sont eux-mêmes sujets à la photo-destruction lorsqu'ils sont exposés à la lumière, un processus appelé « photoblanchiment ». Le photoblanchiment est un terme utilisé pour indiquer que la concentration d'un chromophore diminue pendant l'exposition à la lumière. En PDT, il est défini comme la photo-dégradation de l'intensité de la fluorescence ou la perte de fluorescence. Le taux de photoblanchiment du PS dépend principalement de sa concentration initiale [82].

On distingue 2 mécanismes de photoblanchiment des PS : la photo-transformation et la photo-dégradation. La photo-transformation est la perte d'absorbance ou de fluorescence se produit à certaines longueurs d'onde, mais la structure du PS est minimalement modifiée, alors que la photo-dégradation implique des changements chimiques majeurs et aboutit à des fragments qui n'ont plus d'absorption ou de fluorescence appréciable dans la région spectrale d'intérêt. Les espèces réactives résultant de l'excitation des PS sont à l'origine de leur photo-dégradation, ce qui a une influence sur le résultat du traitement. Ce phénomène de photoblanchiment représente un défi majeur dans la PDT en entraînant une diminution de la concentration des PS dans la zone tumorale [82][83].

II.8. Ciblage tumoral

Étant donné que le PS est idéalement non toxique sans excitation par la lumière, la PDT est un traitement localisé avec une accumulation sélective du PS dans les cellules tumorales et une irradiation lumineuse strictement centrée sur la tumeur. Afin d'améliorer l'accumulation de PS dans le site tumoral cible, deux stratégies ont été développées, à savoir le ciblage passif et le ciblage actif.

Le ciblage passif prend avantage des différences physiologiques et morphologiques entre les tissus normaux et tumoraux afin d'aboutir à une accumulation sélective du PS au niveau tumoral. En raison de la prolifération incontrôlée des cellules tumorales, les tumeurs solides présentent une architecture et une composition tissulaire anormale qui limite l'absorption et la distribution des médicaments. Les vaisseaux sanguins tumoraux ont souvent un revêtement cellulaire défectueux composé de cellules endothéliales désorganisées, peu connectées, ramifiées et chevauchantes, cela rend l'endothélium tumoral très perméable. En outre, les tumeurs solides ont un drainage lymphatique peu développé, ce qui permet une accumulation de macromolécules extravasées dans l'espace extravasculaire autour de nouveaux vaisseaux tumoraux. Ainsi, les médicaments de taille nanométrique administrés par voie systémique ou les vecteurs de diffusion tendent à s'accumuler préférentiellement dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux. Cet effet est appelé effet de perméabilité et de rétention améliorées ou enhanced permeability and retention effect (EPR) (**Figure 29**).

Les composants de la matrice extracellulaire (MEC) tumorale, y compris le collagène, et l'élastine, sont considérés comme la principale barrière à la pénétration des médicaments dans les tumeurs solides. La MEC tumorale peut agir de manière plutôt avantageuse ; par exemple, il a été rapporté que les dérivés de porphyrine anticancéreuse interagissent de préférence

avec le collagène et se localisent dans les tissus tumoraux [84]. Une autre altération physiologique des tissus tumoraux est l'acidité de leur microenvironnement. Les cellules tumorales hyper-prolifératives ont un taux métabolique élevé et se développent au-delà de l'apport en oxygène et en nutriments. Pour obtenir de l'énergie supplémentaire, les cellules tumorales utilisent un niveau élevé de glycolyse anaérobie, ce qui entraîne la production d'une grande quantité d'acide lactique, d'où une hypoxie intratumorale et un pH bas. Dans ces conditions, les PS hydrophobes à groupements carboxyliques sont distribués préférentiellement dans les cellules tumorales par diffusion à travers la membrane plasmique. Comme les molécules hydrophiles restent généralement dans la circulation sanguine systémique, alors que les molécules hydrophobes ont tendance à extravaser et à être retenues dans les tissus tumoraux, l'accumulation d'un PS dans les tumeurs est d'autant plus importante que son degré d'hydrophobie est élevé. La plupart des PS classiques sont hydrophobes, mais ces PS peuvent facilement s'agréger dans l'environnement aqueux et ne conviennent donc pas à une utilisation intraveineuse. C'est pourquoi de nombreux PS actuellement utilisés sont souvent encapsulés dans des nanostructures, telles que des liposomes, ou sont conjugués à des polymères hydrophiles. Ces nanostructures permettent non seulement de surmonter les problèmes de solubilité des PS, mais aussi de s'accumuler sélectivement dans les tissus tumoraux grâce à l'effet EPR [84][85][86].

Bien que le ciblage passif basé sur l'effet EPR constitue la base de la thérapie ciblée, il présente plusieurs limites. Par exemple, certaines tumeurs, en particulier celles qui sont à un stade précoce, ne présentent pas l'effet EPR et la perméabilité des vaisseaux sanguins peut ne pas être la même dans une seule tumeur. Pour surmonter ces limites, il est souhaitable que les transporteurs de PS aient la capacité de se lier activement aux cellules tumorales spécifiques. Bien sûr, un tel processus de ciblage actif ne peut être séparé d'un processus passif, car il ne se produit qu'après l'accumulation passive de la molécule dans les tumeurs, mais le ciblage actif devrait conduire à une accumulation intra-tumorale plus efficace, avec une toxicité systémique plus faible. Lors du ciblage actif, les ligands de ciblage sont attachés aux PS ou à la surface des nanostructures chargées en PS afin de conduire à une liaison spécifique avec les antigènes appropriés ou les molécules réceptrices surexprimées par les cellules tumorales ou la vascularisation tumorale, mais pas par les cellules saines normales [84].

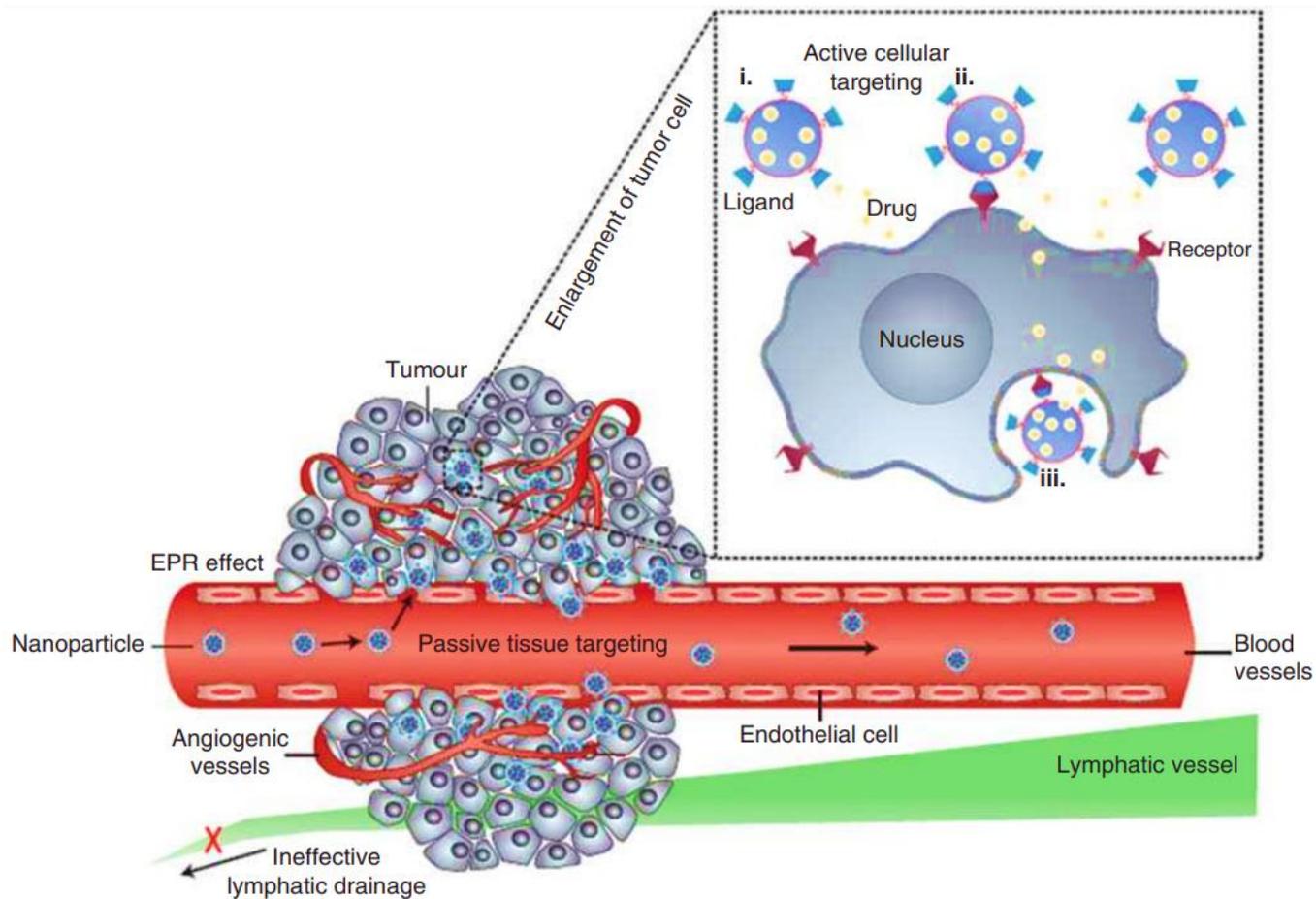


Figure 29. Types de ciblage cellulaires [87].

II.9. Les avantages et les limites de la PDT

La PDT présente plusieurs avantages par rapport aux approches conventionnelles du traitement du cancer. La PDT n'a pas d'effets secondaires à long terme lorsqu'elle est utilisée correctement. Elle est moins invasive que les procédures chirurgicales et peut être réalisée en ambulatoire. Outre la tumeur elle-même, la PDT peut également détruire le système vasculaire qui lui est associé, ce qui contribue à la destruction de la tumeur. La PDT peut être appliquée directement et avec précision dans le tissu cible, grâce à sa double sélectivité. Ainsi, les deux principaux facteurs qui contribuent à la sélectivité de la PDT sont la capacité intrinsèque de certains PS à s'accumuler préférentiellement dans le tissu tumoral et l'irradiation lumineuse exclusivement dans le tissu cible. La libération d'antigènes associés à la tumeur et l'induction de la mort cellulaire immunogène déclenchées par la PDT peuvent stimuler une réponse immunitaire antitumorale, entraînant la destruction des cellules tumorales résiduelles et apportant un bénéfice thérapeutique à long terme. L'accumulation sélective des PS dans la tumeur est facilitée en cas d'application topique, puisque les PS sont appliqués directement et uniquement sur les lésions à traiter. Lorsque les PS sont administrés par voie intraveineuse, ils doivent rester en circulation suffisamment longtemps pour atteindre la tumeur et s'y accumuler. En outre, la PDT peut être répétée plusieurs fois au même endroit, contrairement à la radiation. Il n'y a pas ou peu de cicatrices après la guérison. Enfin, elle est généralement moins coûteuse que d'autres modalités thérapeutiques dans le traitement du cancer.

Comme toutes les modalités thérapeutiques, la PDT présente également certaines limites. L'effet photodynamique se produit sélectivement dans le site irradié, ce qui rend son utilisation dans les métastases disséminées très difficile avec la technologie actuellement disponible. L'oxygénation des tissus est cruciale pour que l'effet photodynamique se produise, de sorte que les tumeurs entourées de tissus nécrotiques ou les masses tumorales denses peuvent conduire à une PDT inefficace. Enfin, la précision de l'irradiation du tissu cible est le point le plus important lorsque l'on considère la PDT comme une option thérapeutique. Par conséquent, les tumeurs profondes (difficilement accessibles sans intervention chirurgicale) sont difficiles à traiter en raison de la faible pénétration de la lumière visible dans les tissus [63][88].

II.10. La PDT dans le traitement du CCR

La résistance accrue des cellules tumorales aux médicaments chimiothérapeutiques conventionnels utilisés dans le traitement du CCR, ainsi que leur toxicité non spécifique pour les tissus sains, soulignent la nécessité d'approches thérapeutiques alternatives. L'une de ces approches est la PDT, qui offre plusieurs avantages dans le traitement du CCR. Ces dernières années, des recherches précliniques et cliniques approfondies ont été menées sur la PDT pour le traitement du CCR. Ces recherches ont montré le potentiel de la PDT en tant qu'approche thérapeutique du CCR. En outre, la combinaison de la PDT avec d'autres modalités de traitement, telles que la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, suscite un intérêt croissant. En intégrant la PDT aux méthodes de traitement établies, un effet synergique peut être obtenu, conduisant à de meilleurs résultats pour les patients atteints de CCR [89]. Plusieurs PS sont couramment utilisés pour la PDT du CCR, tels que la phtalocyanine, les dérivés de porphyrine, la chlorine et l'hypericine. Sun et ses collègues ont rapporté l'efficacité antitumorale du Photofrin® chez des patients atteints d'un CCR à un stade

avancé [90]. Plusieurs autres études ont également établi que l'application du Photofrin® dans le CCR peut être une thérapie antitumorale efficace [79]. L'ALA a fait l'objet d'études approfondies et a démontré un potentiel considérable en matière de PDT et de PD pour le traitement du CCR [91]. Les PS de type phtalocyanine, comme la phtalocyanine de zinc (ZnPc), et les PS à structure chlorine et d'autres PS de deuxième génération sont couramment utilisés dans le traitement du CCR et ont démontré une efficacité [92]. Li et *al.* ont rapporté l'amélioration de l'effet phototherapeutique de la PDT avec l'utilisation de la chlorine e6 (Ce6). Ce PS Ce6 de deuxième génération a démontré une meilleure génération d'ERO, et une inhibition de la prolifération cellulaire dans les cellules de CCR SW480 après irradiation à l'aide d'un laser de 650 nm, à une dose d'irradiation de 6 J/cm² [93]. De même, l'utilisation de phtalocyanines s'est avérée efficace dans le traitement du CCR, en particulier celles qui ont été modifiées par la coordination avec des métaux de transition tels que l'aluminium et le zinc [94]. L'application des nanoparticules dans le traitement PDT du CCR présente un grand potentiel pour réduire plusieurs limites des PS traditionnels et ainsi améliorer leur biodisponibilité. Wu et *al.* ont développé un nouveau système de délivrance de m-THPC, FosPeg®, qui est une nouvelle formulation liposomale de m-THPC. Une meilleure absorption du PS et des effets antitumoraux de la PDT ont été observés sur la lignée cellulaire HT-29 d'adénocarcinome colorectal humain [95]. Le **tableau 9** résume quelques études précliniques *in vitro* de la PDT réalisées sur des cellules de CCR.

En règle générale, les essais cliniques de PDT pour le traitement du CCR sont réalisés à l'aide de fibres optiques intégrées dans l'endoscope pour délivrer la lumière nécessaire à l'excitation des PS. Ainsi, la PDT endommage sélectivement les tissus cancéreux du côlon, en minimisant les effets secondaires indésirables et la cytotoxicité systémique pour les cellules saines adjacentes. La plupart des études explorant l'application de la PDT au CCR sont des essais cliniques pilotes, de phase I et de phase II. Les essais de phase I portent sur de petits groupes de patients à un stade avancé de la maladie et visent principalement à évaluer la sécurité et la toxicité de la PDT. Les essais de phase II portent sur des groupes de patients plus importants et visent à étudier l'efficacité clinique de la PDT. On trouve peu de données sur les essais cliniques de phase III évaluant l'efficacité globale de la PDT dans le traitement du CCR. À l'heure actuelle, aucun essai clinique de phase IV n'a été réalisé pour la PDT dans le CCR, car il ne s'agit pas d'une méthode homologuée pour ce type spécifique de cancer. Toutefois, les essais cliniques réalisés ont démontré de manière cohérente l'efficacité de la PDT en application clinique pour le traitement du CCR [40].

Tableau 9. Quelques études précliniques in vitro de la PDT réalisées sur des cellules de CCR.

Lignée cellulaire	PS	Conditions d'irradiation	Année	Références
HT-29	Porfimère sodique, 2,5-10 g/mL	585 nm, 9,2 W/m ² , 2700 J/m ²	2001	[96]
HCT116	Phthalocyanine Pc 4, 0-300 nM	670-675 nm, 200 mJ/cm ²	2005	[97]
HCT116	Nanoparticules de silice basée sur la PpIX, 5 µM	630 nm, 4 mW/cm ²	2010	[98]
C-26	Chlorine e6 (Ce6), 0,5 µg/mL	662 nm, 105 mW/cm ² , 3-12 J/cm ²	2015	[99]
SW-620	5-ALA, 3 mM	630 nm, 60 mW/cm ² , 4,5 J/cm ²	2016	[100]
CT26	Liposomes encapsulant Ce6 avec un inhibiteur de la phosphoinositide 3-kinase gamma (PI3Kγ), IPI-549	660 nm, 0,8 W cm ²	2021	[101]

II.11. La purpurine-18

La chlorophylle (Chl) est le pigment vert le plus connu et qu'on rencontre quotidiennement. La plus commune est la chlorophylle bleu-verte a (Chla), qui absorbe l'énergie lumineuse à des longueurs d'onde maximales de 660-665 nm. Comme le montrent les formules structurales de la **Figure 30**, il est évident que la Chl est une porphyrine avec un noyau tétrapyrrolique cyclique. L'un des produits de dégradation de la Chl est la purpurine-18 (Pp-18), un chlorine photosensible naturellement présent, par exemple, dans les feuilles d'épinard, la cyanobactérie *Spirulina maxima*, le tapis japonais *Ruditapes philippinarum*, ou dans toute une série d'algues comestibles. Cette chlorine particulière contient trois groupes fonctionnels distincts, à savoir le groupe vinyle, l'anneau anhydride fusionné et la chaîne latérale de l'acide propionique, dont la modification peut générer une série de PS tels que les purpurinimides [102].

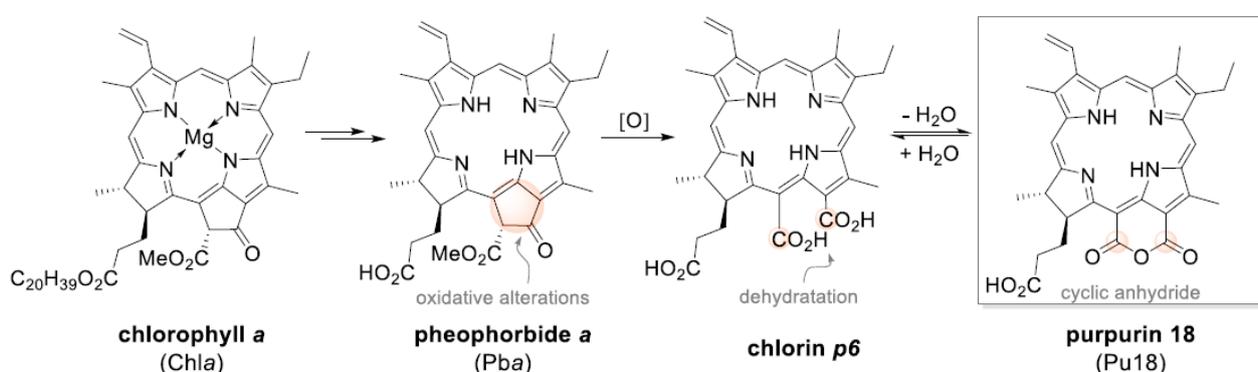


Figure 30. Le processus de dégradation biologique de la chlorophylle peut conduire à la purpurine 18 [102].

En raison de leur forte absorption entre 650 et 700 nm, des longueurs d'onde qui pénètrent efficacement les tissus, les chlorines ont été étudiées en tant que PS pour la PDT des maladies cancéreuses et non cancéreuses (**Figure 31, 32**). Avec sa forte absorption à 700 nm et son bon rendement quantique de l'oxygène singulet (0,7), la Pp-18 a été évaluée comme un inducteur très puissant de la mort cellulaire médiée par la PDT [103]. Néanmoins, dans sa forme naturelle, son hydrophobicité entraîne une agrégation au pH physiologique, ce qui limite son utilisation clinique. C'est pourquoi des efforts considérables ont été faits pour dériver la structure de la Pp-18 afin de surmonter cette limite de la solubilité. La structure chimique de la Pp-18 offre de nombreuses possibilités de modifications structurales. Un exemple parmi d'autres consiste à lier la Pp-18 à un peptide par une réaction entre le groupe carboxyle de l'acide propionique de la Pp-18 et le radical amidogène du peptide. Par exemple, en liant la Pp-18 à des peptides riches en arginine, il est possible de préparer des conjugués plus hydrophiles qui, en outre, présentent des propriétés d'agrégation modifiées (qui augmentent avec le nombre d'unités d'arginine) [104]. Sa nature macrocyclique permet de créer des entités plus grandes par l'assemblage supramoléculaire. Cette propriété pourrait être utilisée dans le traitement et l'imagerie du cancer, car certains dérivés de la Pp-18 conjugués à des peptides peuvent créer des nanofibres *in situ* et, par conséquent, prolonger le temps de rétention dans

les tumeurs, ce qui permet d'améliorer les possibilités d'imagerie et d'obtenir des résultats thérapeutiques plus efficaces [105].

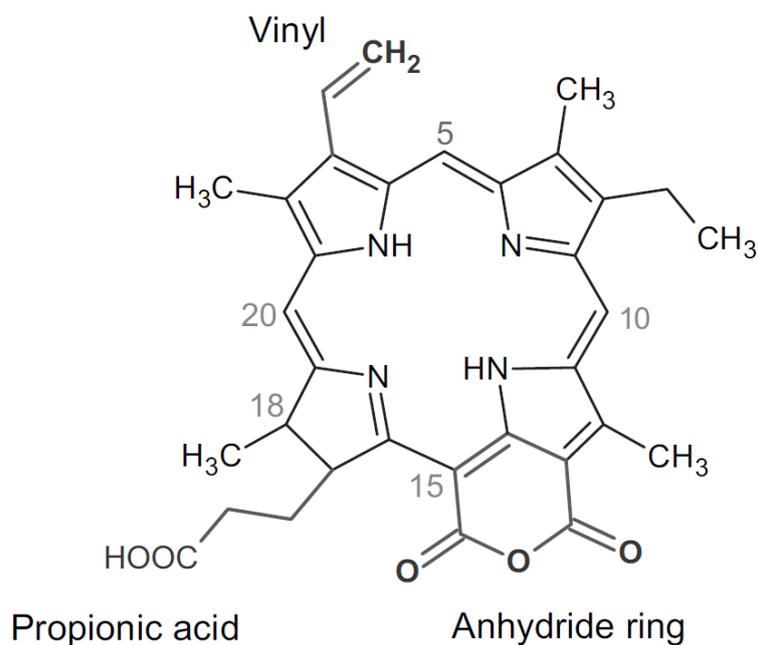


Figure 31. Formule de la Pp-18 [106].

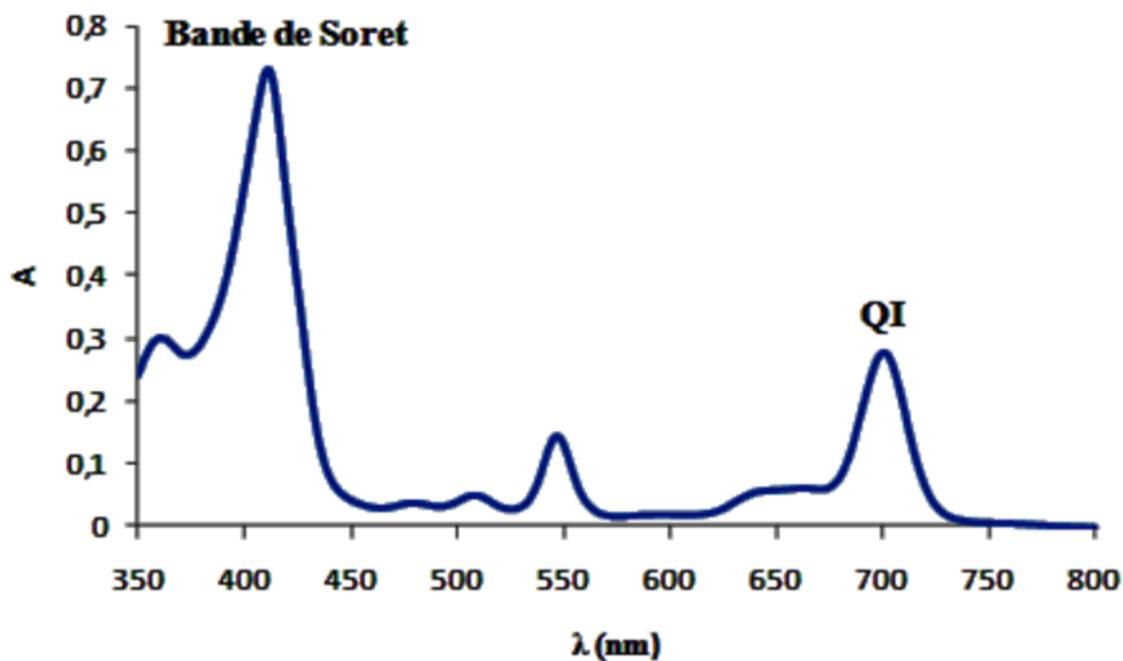


Figure 32. Spectre UV de la Pp-18 dans le chloroforme.

II.12. La Pp-18 dans la PDT anticancéreuse

En PDT, les substances issues de produits naturels sont souvent utilisées comme PS, y compris la Pp-18. Il y a déjà plus de trente ans que Hooper et *al.*, ont montré que la photoactivation de la Pp-18 inhibe la croissance des fibroblastes humains primaires [107]. Plus tard, il a été rapporté que la Pp-18 photoactivée induit l'apoptose et la nécrose également dans les cellules cancéreuses humaines de leucémie, HL-60. Plus récemment, la Pp-18 a été testée en tant que PS efficace pour le traitement par PDT du cancer du sein triple négatif généralement incurable. Dans cette étude, la phototoxicité de la Pp-18 a été déterminée à l'aide d'une lignée cellulaire de tumeur mammaire de souris (4T1), utilisée comme modèle de cancer du sein humain de stade IV. Les cellules 4T1 ont été utilisées sous forme de culture bidimensionnelle (2D), de sphéroïdes tridimensionnels (3D) et, également, *in vivo* dans des souris Balb/c avec des cellules 4T1 implantées par voie sous-cutanée. Il a été démontré que la Pp-18 est efficace pour inhiber la croissance des cellules de cancer du sein triple négatif à la fois *in vitro* et *in vivo* [108]. Sans photoactivation, la Pp-18 n'a présenté aucune toxicité jusqu'à une concentration de 4 μM [108]. De même, la photoactivation de la radachlorine (contenant 0-15 % de Pp-18) présente une toxicité élevée pour les cellules du cancer du sein MCF-7. En outre, cette étude a montré un effet synergique de la PDT et de la radiothérapie sur la lignée cellulaire MCF-7 (cancer du sein humain) [109]. De plus, les résultats ont montré que l'irradiation des cellules tumorales TC-1 en présence de radachlorine induit une inhibition significative de la croissance cellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo* [110]. Ainsi, les résultats obtenus indiquent une grande efficacité de la Pp-18 en tant que PS pour l'utilisation en PDT. Néanmoins, il existe encore des limites, notamment la forte hydrophobie de la Pp-18 (qui conduit à la formation d'agrégats), la faible biodisponibilité (livraison difficile de la Pp-18 dans les tissus tumoraux) et l'élimination rapide du tissu tumoral [108]. Les chercheurs ont essayé de résoudre ces problèmes en dérivant la structure de la Pp-18, par exemple en créant des imides ou des anhydrides, en le conjuguant à une molécule d'un vecteur ou en créant divers types de nanoparticules contenant de la Pp-18 [102]. Une possibilité de réduire l'hydrophobicité de la Pp-18 et d'améliorer sa biodisponibilité est, par exemple, la conjugaison de la Pp-18 avec un espaceur de polyéthylène glycol (PEG). Il a été observé que les conjugués de Pp-18 PEGylés s'accumulaient efficacement dans les cellules cancéreuses humaines de diverses origines (sein-MCF-7, prostate-PC-3 et LNCaP, et pancréas-MiaPaCa-2) *in vitro* avec une localisation préférentielle dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE) [111]. Outre la PEGylation, la conjugaison de la Pp-18 à l'oxyde de graphène biocompatible (GO) a été décrite. Grâce à ses propriétés de surface uniques (groupes carboxyle, charge de surface négative dépendant du pH), l'oxyde de graphène peut lier des PS et contribuer ainsi à leur transport efficace dans les cellules tumorales. Les propriétés du GO en tant que vecteur de PS ont été utilisées dans les travaux de Zhang et *al.*, qui ont préparé des conjugués GO-Pp-18 composés de GO avec de l'ester méthylique de Pp-18 lié de manière non covalente dans le but d'augmenter la solubilité dans l'eau, et d'améliorer la biodisponibilité [112].

Partie III. Les nanoparticules

III.1. Intérêt des nanoparticules

L'utilisation de nombreux médicaments est entravée par leurs propriétés physico-chimiques non adaptées à l'organisme humain, telles qu'une faible solubilité aqueuse, un manque de stabilité, un métabolisme rapide et une distribution non sélective des médicaments. Les nanoparticules ont été développées pour surmonter ces problèmes en améliorant l'administration des médicaments. Elles peuvent délivrer des médicaments d'une manière contrôlée dans l'espace et dans le temps, ce qui peut augmenter l'efficacité thérapeutique des médicaments et réduire leurs effets secondaires systémiques. En général, les NP sont des particules de taille nanométrique, généralement comprise entre 1 et 100 nm, fonctionnalisées avec diverses parties organiques/inorganiques [81].

L'application des nanoparticules dans le traitement PDT présente un grand potentiel pour surmonter plusieurs limites des PS traditionnels et augmenter leur biodisponibilité. Les nanoparticules sont des nanostructures distinctes qui pourraient améliorer l'efficacité de la délivrance des PS aux sites ciblés et minimiser les effets secondaires thérapeutiques, augmentant ainsi l'efficacité de la PDT. Les nanoparticules présentent généralement un rapport surface/volume relativement important, ce qui peut augmenter leur interaction de surface avec les PS, améliorant ainsi la concentration de délivrance et renforçant l'absorption passive ou active dans les cellules cancéreuses. La petite taille contrôlée des NP permet d'imiter avec précision les molécules biologiques, de protéger les PS des barrières du système immunitaire et de prolonger la durée de vie de la circulation systémique des PS et de la délivrance des PS, tout en évitant les effets secondaires indésirables. En outre, les nanoparticules de plus petites tailles peuvent faciliter le transport des PS vers les cellules ciblées en exploitant l'effet EPR [113].

III.2. Les différents types de nanoparticules

Les types de plateformes d'administration qui ont été utilisés comme vecteurs de PS dans la PDT peuvent être classés en nanoparticules organiques telles que les liposomes, les nanoparticules lipidiques et les polymériques, et les nanoparticules inorganiques qui comprennent les nanoparticules d'argent, d'or, les points quantiques et les nanoparticules de silice.

III.2.1. Nanoparticules organiques

Les nanoparticules organiques sont les systèmes les plus utilisés pour encapsuler les PDT. Il existe plusieurs catégories basées sur différents matériaux et leur organisation respective (**Figure 33**).

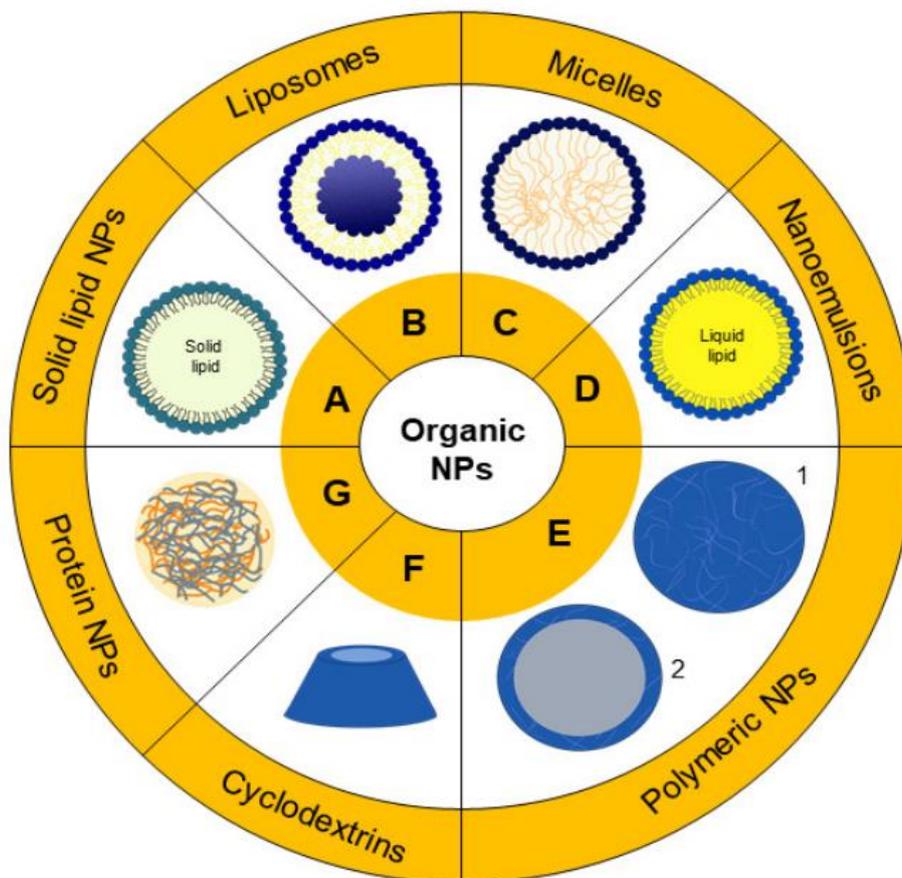


Figure 33. Les différentes nanoparticules organiques utilisées pour la PDT [113].

III.2.1.1. Liposomes

Les liposomes sont formés par l'auto-organisation des phospholipides en bicouches qui, dans un milieu aqueux, ont tendance à se replier sur elles-mêmes, créant ainsi des vésicules. En raison de la nature amphiphile des lipides, les molécules hydrophiles et hydrophobes peuvent être stockées dans différents compartiments des liposomes (**Figure 34**). Sur le plan clinique, les liposomes constituent le système de libération contrôlée de médicaments le plus répandu en raison de leur flexibilité structurelle et de leur capacité à incorporer une variété de médicaments hydrophiles et hydrophobes, tout en étant biocompatibles et biodégradables. Par conséquent, les liposomes peuvent être utilisés pour incorporer des PS lipophiles et hydrophiles utilisés dans la PDT contre le cancer [81] [113] .

Par exemple, Bovis et *al.* ont étudié l'efficacité du m-THPC (meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin) incorporé dans des liposomes après administration intraveineuse à des rats normaux et porteurs de tumeurs. Les résultats ont montré que les liposomes chargés en m-THPC améliorent la sélectivité tumorale par rapport à la formulation commerciale. Cela a été attribué à l'absorption tumorale et aux concentrations plasmatiques sanguines plus élevées, ce qui a été suggéré pour réduire les dommages causés aux cellules saines [114]. Foscan® est une formulation commerciale approuvée en Europe pour les

cancers du cou et de la tête. Le PS actif de Foscan®, connu sous le nom de « temoporfin », est également à l'origine de Foslip® et Fospeg®, qui sont des formulations de liposomes. Des études menées sur des sphéroïdes de cellules HeLa ont montré que l'administration de PS via ces formulations est un moyen de réduire la toxicité du PS en l'absence de lumière, d'augmenter l'internalisation cellulaire et, par conséquent, l'efficacité de la PDT [115].

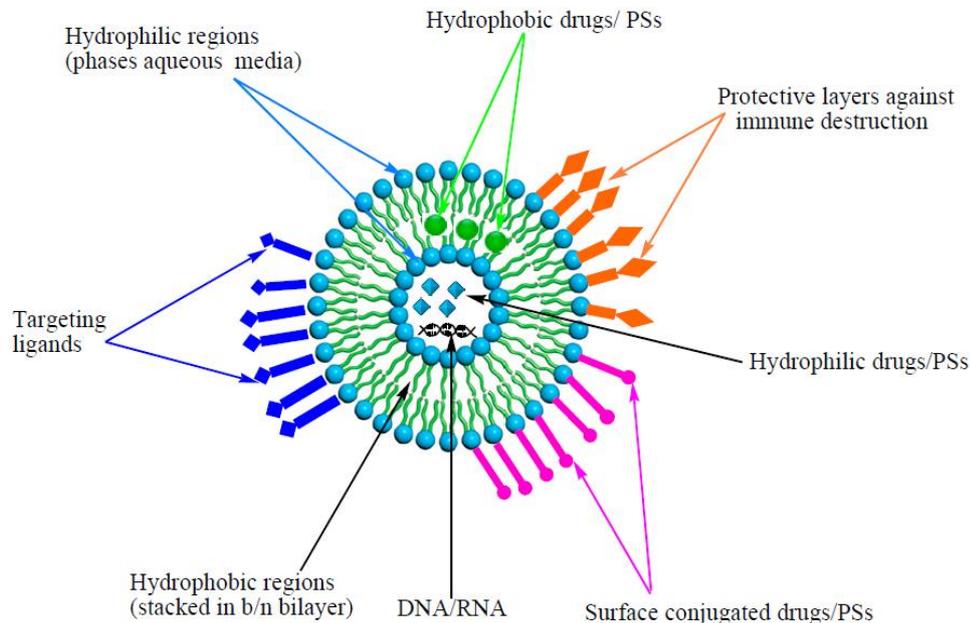


Figure 34. Représentation schématique modifiée d'un liposome, avec un médicament piégé dans la phase aqueuse et à l'intérieur de la bicouche [116].

III.2.1.2. Les nanoparticules polymériques

Sur le plan chronologique des nanotechnologies, les nanoparticules à base de polymères ont été rapportées pour la première fois en 1976 [117]. Le grand intérêt pour ces nanoparticules a entraîné le développement de plusieurs méthodes pour produire des nanoparticules polymères, telles que la nanoprécipitation et l'évaporation de solvant. Les nanoparticules polymériques peuvent être utilisées pour améliorer la solubilité des PS ainsi que pour assurer leur stabilité et leurs libérations prolongées [81]. Plusieurs conjugués polymère-PS ont fait l'objet d'essais cliniques et certains d'entre eux, comme le Zinostatin stimalamer® et l'Oncaspar®, sont approuvés sur le marché. Ils sont particulièrement utiles pour augmenter la solubilité dans l'eau et pour cibler les vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Par exemple, Yu et *al.* ont développé des nanoparticules chargées de photosan à partir d'un dérivé d'alginate de sodium amphiphile conjugué à des résidus de cholestéryle en utilisant une méthode d'auto-assemblage simple dans une solution aqueuse. Ils ont montré que ces nanoparticules améliorent la phototoxicité du photosan contre les cellules cancéreuses du pancréas humain et induisaient la mort cellulaire par apoptose [118]. En outre, Yuan et Liu ont fabriqué des nanoparticules chargées de paclitaxel sur la base d'un polyélectrolyte conjugué greffé sur du poly (éthylène glycol) (PEG), qui sert lui-même de PS. Cette stratégie visant à combiner la chimiothérapie et la PDT contre les cellules U87-MG et MCF-7 a entraîné une toxicité plus élevée que chaque traitement seul. Cela montre que ce nouveau système offre une alternative potentielle pour le traitement du cancer [119].

Cette approche a été également choisie par Liu et *al.*, qui ont préparé trois types de nanoparticules organiques solubles dans l'eau (WSON) contenant des dérivés chlorés dont un ester méthylique de Pp-18 et obtenus par nanopréciipitation. Tous les WSONs préparés ont montré une bonne solubilité et stabilité dans l'eau. Les WSON nouvellement préparés présentent une phototoxicité élevée et une toxicité réduite à l'obscurité contre les cellules tumorales HeLa. En outre, la solubilité élevée des WSONs assure une bonne biodisponibilité par rapport au PS libre [120].

III.2.1.3. Les Cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD), également connues sous le nom de cyclomaltose ou cycloamylose, sont des structures biodégradables et biocompatibles composées d'oligosaccharides obtenus par l'action de l'enzyme cyclodextrine-glycosyl transférase (CGTase), et qui sont capables de former des particules nanométriques par auto-organisation en milieu aqueux. Ils comportent six, sept ou huit unités de glucose reliées par des liaisons α -1,4, appelées respectivement α -, β - et γ -CD (**Figure 35**). Les CD présentent une forme conique présentant une cavité hydrophobe interne et une surface hydrophile externe. Dans les solutions aqueuses, les CD sont chimiquement stables dans des conditions neutres et basiques et ils sont plus résistants à l'hydrolyse enzymatique et non enzymatique que les sucres linéaires [121].

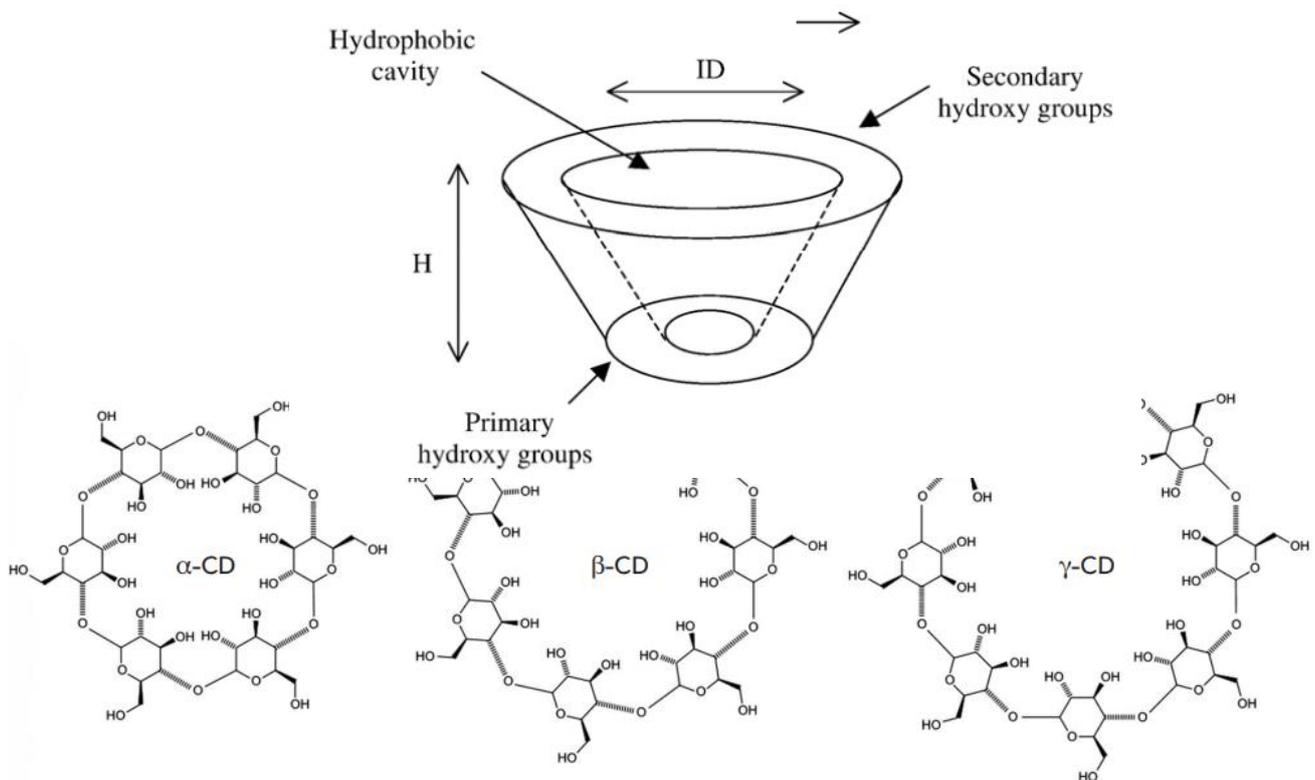


Figure 35. Les différents types de cyclodextrines [122].

Les CDs ont démontré leur capacité à encapsuler de nombreuses molécules pour des applications biomédicales ou pharmaceutiques. Leurs caractéristiques permettent de solubiliser des molécules hydrophobes par la formation de complexes d'inclusion, d'améliorer la stabilité, l'efficacité thérapeutique et la biodisponibilité des molécules invitées [121]. A titre d'exemple, la conjugaison de la phtalocyanine et de la CD a été une stratégie employée pour augmenter la solubilité du PS. Des essais réalisés sur des cellules humaines de cancer de la vessie UM-UC-3 ont montré que ces conjugués, plus solubles dans l'eau, étaient plus phototoxiques pour les cellules [123]. Une stratégie similaire a été adoptée par Semeraro et ses collaborateurs avec un conjugué CD-chlorophylle a, montrant une toxicité photo-induite potentielle sur les cellules HT-29, montrant ainsi l'intérêt des CDs pour les applications de PDT [124]. Conte et *al.* ont mis au point des nanoassemblages biodégradables basés sur les CD et la phtalocyanine de zinc (ZnPc) pour surmonter la faible solubilité des phtalocyanines dans l'eau. Ils ont constaté des effets photodynamiques anticancéreux sur les cellules cancéreuses HeLa, ce qui suggère un système d'administration Zn-Pc prometteur [125]. De même, Lourenço et *al.* ont préparé des conjuguées phtalocyanines avec des α -, β - et λ -CD. Ils ont constaté que le Pc- α -CD et le Pc- λ -CD présentent tous les deux une photoactivité contre les cellules UM-UC-3 [126].

III.2.2. Les nanoparticules inorganiques

III.2.2.1. Les nanoparticules de silice

Les nanoparticules à base de silice présentent plusieurs avantages qui peuvent être utiles pour la conception de nanoparticules pour la PDT, comme la facilité de production, la possibilité de fonctionnalisation et l'obtention de particules de taille contrôlée [113]. Différentes méthodes synthétiques peuvent être utilisées pour produire une variété de nanoparticules à base de silice, comme la silice creuse, le silicate modifié organiquement, la silice mésoporeuse et d'autres nanoparticules fabriquées par des méthodes sol-gel. Un effet antitumoral efficace a été obtenu par Liu et *al.* en explorant la combinaison complexe d'un PS (rose bengale) et du médicament Doxorubicine dans des nanoparticules de silice mésoporeuse. Dans leurs études, les nanoparticules développées avaient une grande capacité de chargement du médicament et les problèmes liés à l'agrégation des PS ont été prévenus. Ce système était également capable de produire une plus grande quantité d'oxygène singulet que le rose bengale PS, et la combinaison avec la doxorubicine a permis une synergie entre la chimiothérapie et la PDT qui s'est traduite par une diminution de 90 % de la viabilité des cellules [127]. Les travaux de Lin et de ses collaborateurs ont mis au point des nanoparticules de silice avec la chlorine e6 encapsulée et un plasmide codant pour le gène pour la caspase-8 à la surface. Ils ont montré dans leur étude que les nanoparticules ont permis la libération du gène, l'activation du PS et donc un effet synergique du gène et de la PDT [128].

Au sein de notre laboratoire LABCiS, Bretin et *al.* ont étudié le potentiel anticancéreux du PS 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (TPPOH) et ont développé des nanoparticules de silice recouvertes du conjugué xylan-TPPOH pour la PDT du CCR. Ils ont ainsi démontré des effets phototoxiques très significatifs des nanoparticules après activation de la lumière, médiées par la génération d'ERO et une absorption cellulaire plus forte dans les lignées cellulaires humaines de CCR par rapport au TPPOH libre [129].

III.2.2.2. Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or ont retenu l'attention en tant qu'agents photothermiques, car elles démontrent un échauffement local efficace après une irradiation lumineuse. En raison de l'excitation et de la relaxation des électrons, cette propriété physicochimique unique produit un échauffement localisé élevé autour de ces nanoparticules, ce qui entraîne la destruction des tissus cancéreux [130]. Les nanoparticules d'or sont faciles à synthétiser et permettent une modification aisée de leurs surfaces. La fixation d'un ligand spécifique à la surface des nanoparticules d'or favorise leur ciblage sur les zones pathologiques et leurs interactions avec les cellules cancéreuses. Cela augmente l'efficacité du traitement et réduit les effets toxiques possibles dans les zones saines du corps. La fonctionnalisation avec du polyéthylène glycol (PEG) est l'une des stratégies les plus efficaces pour optimiser la surface hydrophile et améliorer le temps de circulation sanguine des nanoparticules. Wang et *al.* ont développé des nanoparticules d'or creuses PEGylées pour la radiothérapie combinée aux rayons X et la thérapie photothermique dans les cellules cancéreuses. Les résultats *in vitro* utilisant la combinaison du laser NIR 808 nm et du rayonnement X ont démontré un effet antitumoral synergique [131]. En outre, les nanoparticules d'or sont principalement employées dans les techniques thérapeutiques basées sur l'imagerie en raison de leurs propriétés optiques.

III.3. Voies passives et actives

Pour rappel, deux stratégies sont le plus souvent utilisées pour l'accompagnement ciblé de PS aux tumeurs à l'aide de nanoparticules : les stratégies de ciblage passif et actif (**Figure 36**). Dans les deux cas, les propriétés physico-chimiques, la possibilité de fonctionnaliser la surface des nanoparticules ainsi que les caractéristiques physiopathologiques du microenvironnement tumoral sont les paramètres utilisés pour concevoir les approches de ciblage des médicaments. Les voies de ciblage passif sont les plus courantes. Elles exploitent deux caractéristiques distinctives du microenvironnement tumoral, l'effet EPR et les conditions acides du site tumoral. L'effet EPR peut perturber le microenvironnement à l'intérieur des tumeurs colorectales, permettant la diffusion et l'accumulation de nanoparticules au niveau du site cancéreux. Par conséquent, les nanoparticules-PS administrées par voie intraveineuse auraient tendance à s'accumuler sélectivement dans les tissus cancéreux du CCR, par rapport aux tissus sains [132]. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré les avantages de l'utilisation d'approches nanoparticules-PS ciblées passivement contre le CCR [133].

La stratégie de ciblage actif implique l'utilisation de ligands de haute affinité ou de motifs de ciblage à la surface des nanovecteurs qui se lient à des récepteurs spécifiques surexprimés sur les cellules tumorales cibles, afin d'améliorer l'absorption et la localisation cellulaire globale des PS. En outre, l'utilisation de motifs de ciblage permet éventuellement la délivrance des PS sur le site ciblé, ce qui pourrait augmenter considérablement leur effet cytotoxique et réduire les effets secondaires indésirables [133]. La surface des nanoparticules peut être fonctionnalisée avec des éléments de ciblage tels que des aptamères, des ligands, des anticorps monoclonaux et des fragments d'anticorps qui pourraient identifier des récepteurs spécifiques de cellules cancéreuses afin de promouvoir un ciblage spécifique. Parmi les récepteurs largement étudiés et les cibles possibles de la PDT du CCR figurent le récepteur EGFR, les récepteurs de la transferrine, les récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) et la molécule d'adhésion des cellules épithéliales (EpCAM). Par exemple,

le récepteur de la transferrine (CD71) est généralement exprimé pour réguler l'homéostasie du fer dans les cellules normales. Cependant, les tumeurs malignes expriment des niveaux élevés du récepteur CD71, qui peuvent être ciblés par des anticorps dans le cadre d'une PDT ciblée [134]. Sardoiwala *et al.* ont synthétisé des nano-formulations de transferrine chargées d'hypericine pour le traitement du CCR. La nano-formulation s'est montrée stable lorsqu'elle a été utilisée en PDT, tout en générant efficacement des ERO cytotoxiques. En outre, les nanoparticules de transferrine ont permis d'améliorer la biodisponibilité de l'hypericine et de mieux cibler le site de la tumeur [134]. Dans une autre étude, Wang *et al.* ont proposé un système de nanoparticules de transferrine à utiliser sur des tumeurs CT26 surexprimant la transferrine dans des études *in vitro* et *in vivo* afin de cibler activement les tumeurs. Ce nano-système a montré un meilleur ciblage et des effets antitumoraux importants, suggérant que les PS nano-conjugués ciblent spécifiquement les récepteurs de la transferrine surexprimés dans les cellules CCR [135].

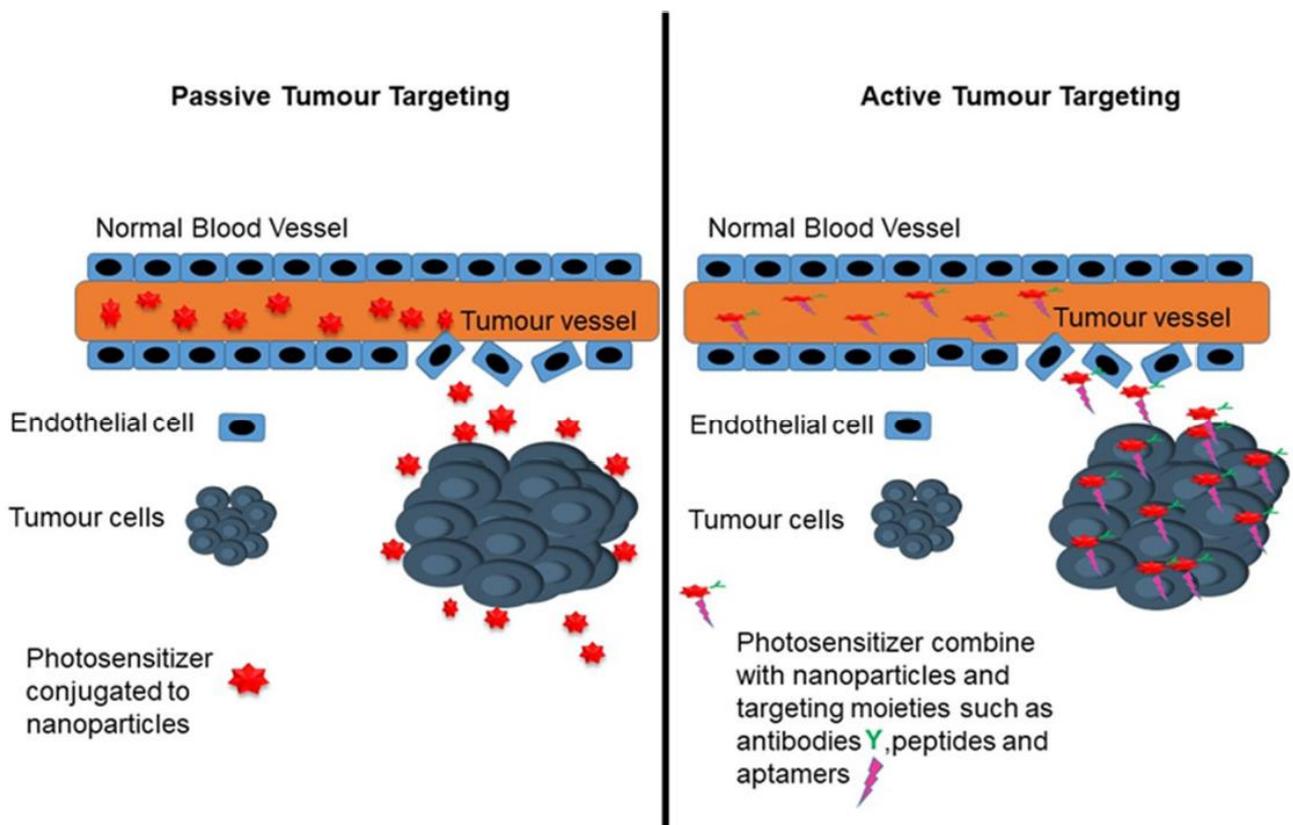


Figure 36. Ciblage passif et actif des tumeurs par les nanoparticules [79].

III.4. Les nanoparticules de première génération

Au cours des 50 dernières années, plusieurs nanoparticules de formes, de tailles et de natures chimiques diverses ont montré une grande efficacité dans l'encapsulation de différents types de molécules anticancéreuses. La première génération de nanoparticules comprend tous les nano-vecteurs qui n'ont pas subi de modification chimique de leur surface. Cette génération de nanoparticules est composée de colloïdes stables dans l'eau, ce qui permet

d'éviter l'élimination et l'excrétion des médicaments par le système rénal. Les nanoparticules anticancéreuses de première génération atteignent le tissu tumoral de manière passive, en profitant de l'effet EPR offert par le drainage vasculaire et lymphatique des tumeurs ; cela permet l'extravasation et l'accumulation des nanoparticules dans les cellules cancéreuses et améliore l'efficacité thérapeutique. L'échec de nombreuses thérapies anticancéreuses en raison de la multirésistance aux médicaments entraîne une progression de la maladie et un mauvais pronostic. La résistance aux médicaments peut être surmontée en grande partie en utilisant les nanotechnologies pour délivrer des médicaments pour le traitement du cancer [136]. Les plateformes à base de liposomes sont les mieux établies et ont été les premières nanoparticules approuvées par la FDA américaine pour une utilisation chez l'Homme [137]. Les protéines sanguines vont se fixer à leur surface et seront rapidement opsonisées par des cellules du foie liées au système réticulo-endothélial (les cellules de Kupffer) [138].

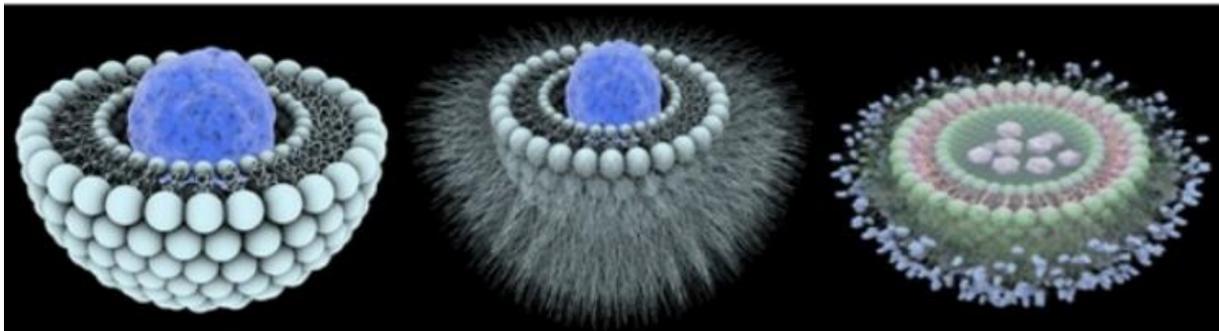


Figure 37. Les trois générations de nanoparticules.

Source : https://www.lemonde.fr/festival/article/2014/06/11/savez-vous-ce-qu'est-un-nanomedicament_4436253_4415198.html

III.5. Les nanoparticules de deuxième génération

La surface des nanoparticules est modifiée afin d'empêcher l'adsorption des protéines sanguines, ce qui évite leur opsonisation par les cellules hépatiques. Cela résulte en une augmentation de leur temps dans la circulation sanguine. Ainsi, la surface des nanoparticules sera donc modifiée par des chaînes de polymères hydrophiles et flexibles. Le polymère le plus couramment employé est le polyéthylène glycol (PEG) en raison de sa grande biocompatibilité (**Figure 38**) [138]. Par rapport à celles de première génération, les nanoparticules de deuxième génération ont la capacité de transporter sélectivement les médicaments vers les tissus cancéreux. Cependant, les nanoparticules sont présentes dans l'espace interstitiel et ne pénètrent pas nécessairement dans les cellules cancéreuses pour permettre l'action anticancéreuse du PS vectorisé. C'est la raison pour laquelle des nanoparticules de troisième génération sont mises en place afin de faciliter l'intégration du médicament dans les cellules.

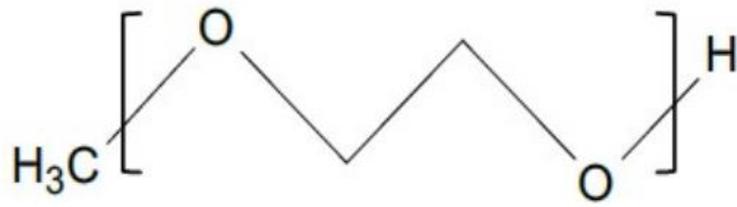
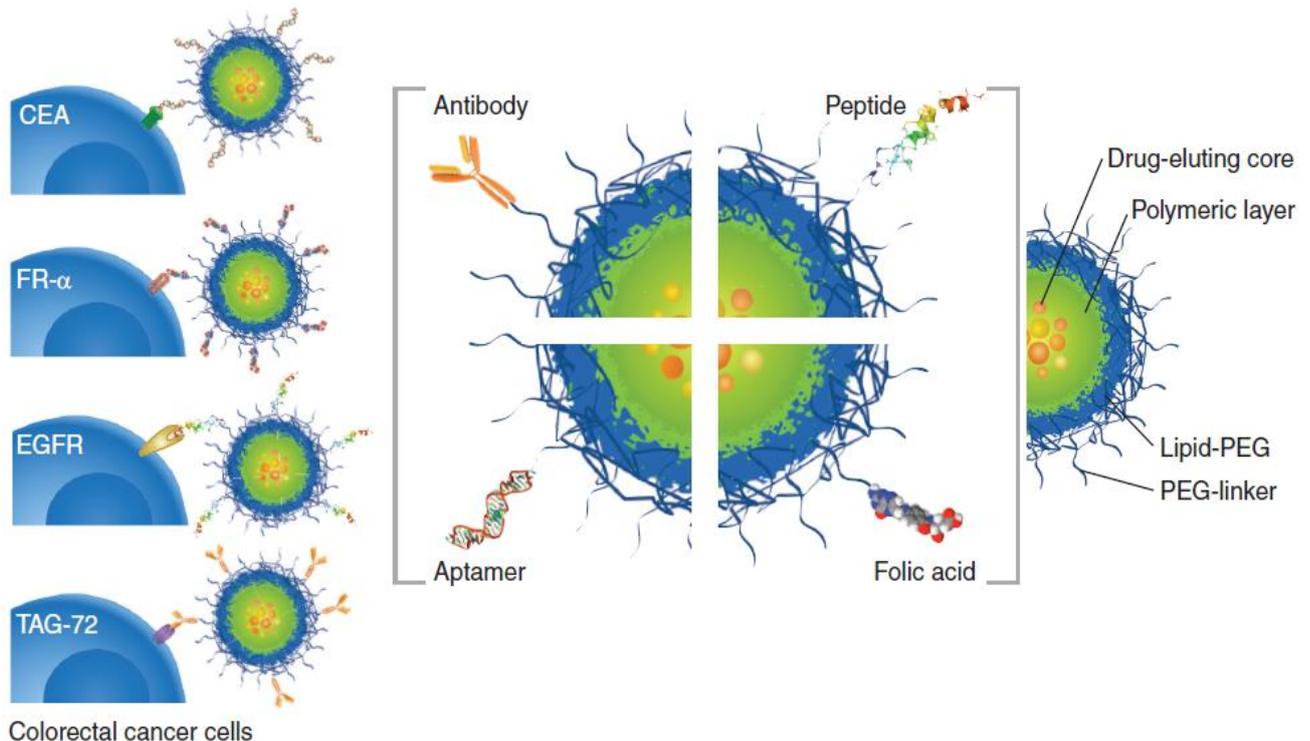


Figure 38. Structure chimique du polyéthylène glycol (PEG).

III.6. Les nanoparticules de troisième génération

La conjugaison de ligands à la surface des nanoparticules à visée de reconnaissance cellulaire a donné naissance à une nouvelle génération de nanoparticules (nanoparticules ciblées). La base de cette nouvelle génération est similaire à celle des PS de troisième génération. Les nanoparticules ciblées peuvent bénéficier des molécules ou récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales, par rapport aux cellules saines. Les nanoparticules de troisième génération sont donc munies de ligands qui permettent, lors de la reconnaissance avec le récepteur particulier, d'internaliser le médicament. On parle donc d'un effet « EPR actif » [137].

Les ligands comprennent des anticorps qui ciblent le récepteur EGFR ou HER2, des sucres, des peptides, des aptamères, des glycosaminoglycanes telles que l'acide hyaluronique ou encore des vitamines telles que l'acide folique. L'incorporation de ces ligands



est généralement réalisée par modification chimique au cours de la synthèse des nanoparticules ou par liaison chimique entre les ligands et les polymères avant la synthèse [139]. A titre d'exemple, une étude a utilisé l'immunohistochimie pour analyser l'expression de quatre biomarqueurs dans les tissus du CCR de 280 patients. L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) était le marqueur le plus régulièrement surexprimé dans le CCR avec 98,8 % de plus que dans les tissus normaux, suivi de la glycoprotéine-72 associée à la tumeur à 79 %, du récepteur des folates- α à 37,1 % et de l'EGFR à 32,8 %. Ces travaux soutiennent l'application de l'ACE en tant que cible cellulaire potentielle pour le développement de nanoparticules ciblées dans le traitement du CCR (**Figure 39**) [140].

Figure 39. Stratégies de nanoparticules ciblées pour le CCR [137].

III.7. Les nanoparticules et la PDT dans le traitement du CCR

Le traitement par PDT s'est révélé être une approche efficace dans les essais cliniques, et plusieurs PS tels que l'ALA, la vertéporfine, le porfimère sodique (Photofrin) et la témoporfine ont été approuvés pour des applications cliniques dans le traitement de divers cancers, notamment le cancer de la peau, la kératose actinique, le cancer de la vessie et les carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou [141]. Actuellement, la majorité des PS utilisés dans l'application clinique de la PDT dans le CCR sont le Photofrin, l'ALA et les HpD. Aucun essai clinique n'est actuellement en cours sur les nano-formulations en PDT pour les CCR.

À ce jour, à notre connaissance, seuls quatre autres traitements PDT basés sur des nano-systèmes font l'objet d'essais cliniques (**Tableau 10**), ce qui montre que malgré le potentiel prometteur de ces systèmes, des obstacles scientifiques importants doivent encore être résolus avant qu'ils ne soient utilisés dans les essais cliniques. Actuellement, des institutions finlandaises, telles que l'université de Tampere et l'université de Jyväskylä, mènent des essais de PDT basés sur une nano-formation d'ALA pour le traitement du cancer de la peau. L'utilisation du gel BF200 ALA (ClinicalTrials.gov : NCT01966120) a démontré que 90,9 % des bénéficiaires ont eu une réponse positive globale, contre 21,9 % des clients qui ont reçu une nano-émulsion placebo (<https://www.clinicaltrials.gov/>). Cependant, des événements indésirables graves ont été révélés, comme l'infarctus aigu du myocarde (1,82 %), la fracture du col du fémur (1,82 %), et les accidents cardiovasculaires (1,82 %), ainsi que des événements indésirables comme la douleur (96,36 %), l'érythème (92,73 %), l'œdème (21,82 %), et l'écoulement (5,45 %) [142][143]. Les chiffres ci-dessus suggèrent que les effets indésirables sont inévitables et que chaque approche thérapeutique doit être soigneusement examinée au niveau de chaque patient avant d'être appliquée, en particulier si le traitement doit affecter la qualité de vie des patients.

Tableau 10 . Essais cliniques de PDT basés sur des nano-systèmes au cours des dix dernières années [142].

Clinical Trials Types	Condition	Intervention/Treatment/Drug	Status	ClinicalTrials.gov Identifier
PDT	Actinic Keratosis	BF-200 ALA gel (nanoemulsion)	Completed: April 2015	NCT01966120
	PDT Microvesicle Particle	Cream containing 4% Imipramine	To be completed: September 2022	NCT03960125
	Neoplasms, Basal Cell Carcinoma, Basal Cell Photochemotherapy Photosensitizing Agents	Hexylaminolevulinate cream, Aminolevulinic Acid Nano Emulsion & Methylaminolevulinate cream	To be completed: December 2025	NCT02367547
	Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Acute Myeloid Leukemia Acute Lymphocytic Leukemia Myeloproliferative Neoplasm	IMGN632 injection (Targeted antibody-drug conjugate)	To be completed: December 2022	NCT03386513

Partie IV. L'apoptose

Le terme « apoptose » a été utilisé pour la première fois dans un article de Kerr *et al.* en 1972 pour décrire une forme morphologiquement distincte de mort cellulaire. Kerr *et al.* ont observé que les cellules apoptotiques se distinguent par de nombreuses caractéristiques morphologiques des cellules nécrotiques. Les cellules en cours d'apoptose présentent une ou plusieurs des caractéristiques suivantes : rétrécissement de la cellule, condensation de la chromatine et fragmentation des nucléosomes, puis formation de corps apoptotiques remplis de débris cellulaires (**Figure 40**). Les caractéristiques biochimiques de l'apoptose comprennent la fragmentation de l'ADN, le clivage des protéines à des endroits spécifiques, l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et l'apparition de phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire. Les corps apoptotiques liés à la membrane sont phagocytés et dégradés par les macrophages. L'apoptose est un événement unicellulaire qui n'induit pas de réaction inflammatoire.

Contrairement à l'apoptose, la nécrose ou mort cellulaire accidentelle est une forme rapide et non régulée de mort cellulaire causée par une agression physique ou chimique aiguë et forte. Ce processus entraîne la rupture des pompes ioniques de la membrane plasmique. Il s'accompagne d'une perméabilité accrue de la membrane, ce qui entraîne un afflux d'eau et d'ions, un gonflement des cellules et des organites, et une agrégation de la chromatine. La nécrose est considérée comme un processus passif car, contrairement aux modalités de mort cellulaire régulée, elle ne nécessite pas de synthèse protéique, d'énergie ou de régulation par des voies de signalisation. La mort cellulaire par nécrose entraîne la libération de molécules de signal d'alarme qui stimulent un ou plusieurs récepteurs de reconnaissance de motifs sur les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK (natural killer cells) [144][145].

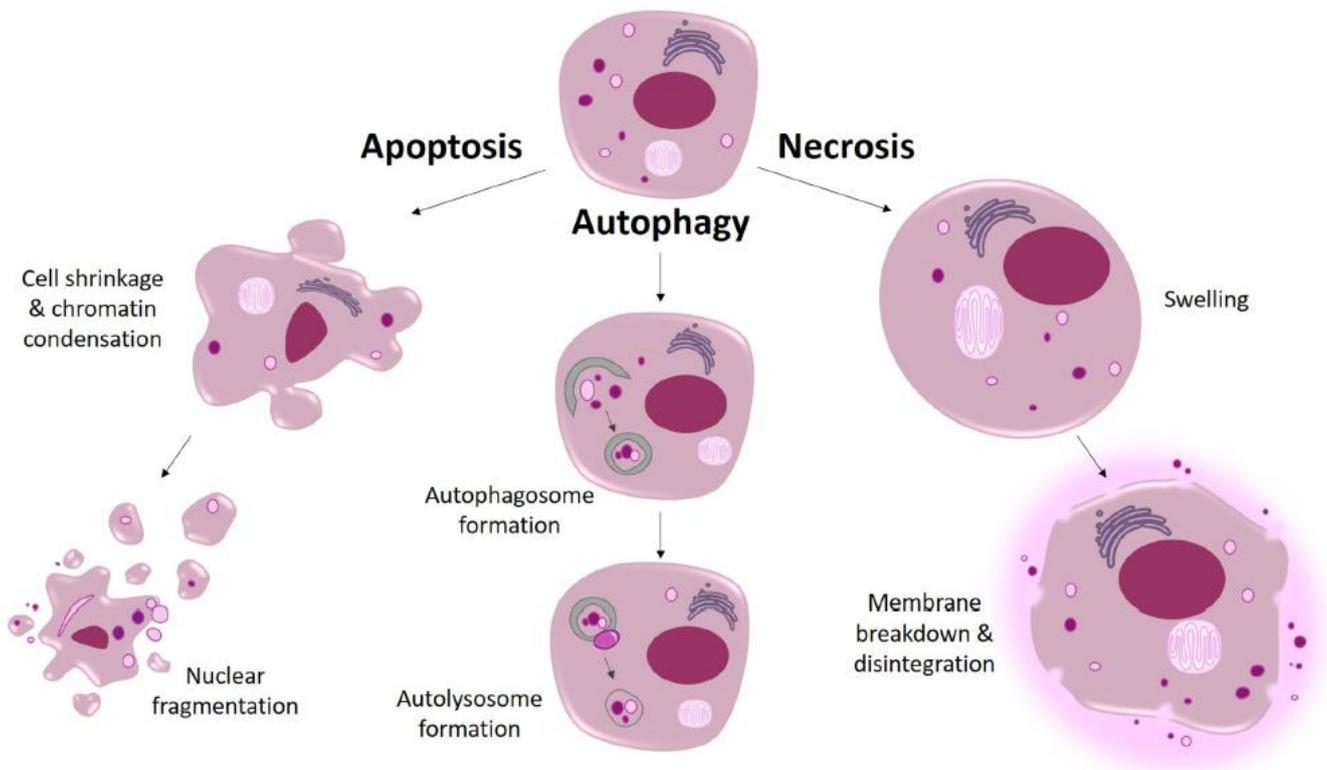


Figure 40. Les trois voies les plus connues de la mort cellulaire [146].

IV.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose

Le rôle de l'apoptose dans la physiologie normale est aussi important que celui de son analogue, la mitose. L'apoptose se produit normalement au cours du développement et du vieillissement en tant que mécanisme homéostatique pour maintenir la population cellulaire dans les tissus. L'apoptose est également un mécanisme de défense, lorsque les cellules sont endommagées par des agents pathogènes. L'apoptose est également nécessaire pour éliminer les cellules immunitaires (lymphocytes B et T), soit pendant la maturation dans les organes lymphoïdes centraux (moelle osseuse et thymus) lors de la création du répertoire à l'antigène, soit dans les tissus périphériques lors de la maturation de ce même répertoire. En outre, l'apoptose joue un rôle central dans le remodelage chez l'adulte, comme l'atrésie folliculaire du follicule post ovulatoire et l'involution de la glande mammaire après le sevrage [144]. Au début de l'embryogenèse, l'apoptose est impliquée dans la morphogenèse des doigts, où elle provoque la mort des cellules de l'espace interdigital. Si l'apoptose est défectueuse, cela induit une absence de différenciation des doigts (**Figure 41**).

Le stress oxydatif joue un rôle primordial dans la physiopathologie de l'apoptose induite par l'âge, par le biais de l'accumulation des dommages causés par les radicaux libres à l'ADN mitochondrial. Il est clair que l'apoptose est étroitement régulée, car son dérèglement peut entraîner des pathologies, notamment des défauts de développement, des maladies auto-immunes, une neurodégénérescence ou un cancer. En fait, on considère que la suppression de l'apoptose au cours de la cancérogenèse joue un rôle central dans le développement et la progression de certains cancers [147].

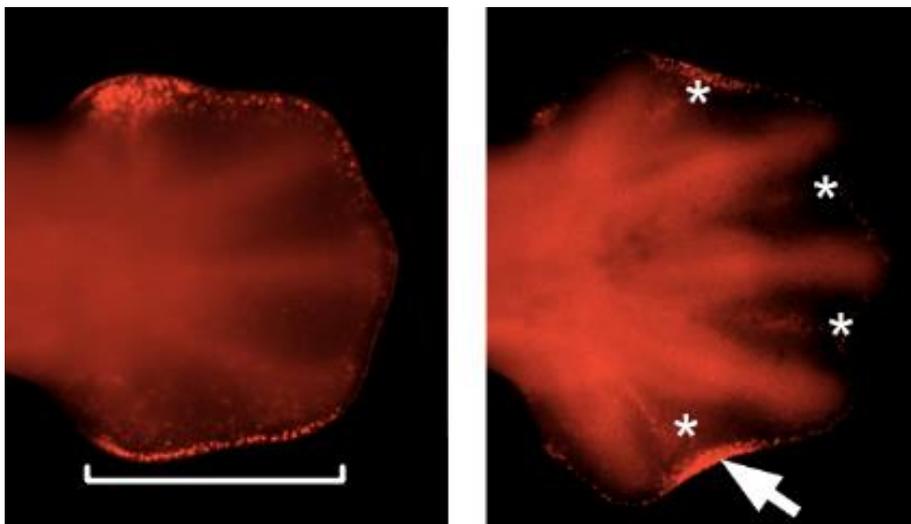


Figure 41. Défaut d'activité apoptotique au cours de la différenciation des membres chez la souris [148].

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

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire contrôlé qui dépend de différents facteurs. Il peut se produire en réponse à des stimuli cellulaires ou externes. Selon la nature du signal,

on distingue deux voies principales, la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort). Le processus d'apoptose est divisé en 3 étapes :

- Phase d'initiation (réversible) : au cours de cette phase, la cellule reçoit divers signaux intra et intercellulaires via les voies intrinsèques et extrinsèques, ce qui entraîne une séquence de mort apoptotique. Les inducteurs apoptotiques peuvent être physiologiques (hormones, cytokines, etc.), biologiques (bactéries, virus, parasites, etc.), chimiques (médicaments) ou physiques (radiations, toxines, etc.). En outre, un même stimulus peut produire des effets différents, voire opposés, dans différents types de cellules et à différents stades de développement d'un même type de cellule.
- Phase d'exécution (non réversible) : une fois que la cellule a reçu le signal d'induction de l'apoptose, elle perd le contact avec les cellules voisines et subit des altérations morphologiques et biochimiques caractéristiques.
- Phase d'élimination ou de dégradation : dans cette phase, les restes de cellules en cours d'apoptose sont rapidement et efficacement éliminés par des phagocytes, et donc non associés à une inflammation [147].

IV.3. Les caspases : les éléments clés de l'apoptose

Le clivage des protéines se produit principalement par l'activation d'une famille de protéases à cystéine appelée caspases (Cysteine Aspartate-Specific Proteases). Les caspases jouent un rôle clé dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose. La famille des caspases est composée de plusieurs membres, qui sont principalement exprimées dans l'ensemble de l'organisme, à l'exception de la caspase 14 présente dans l'épiderme et impliquée dans la différenciation des kératinocytes [149]. Douze gènes codant pour les caspases (caspase 1 à 10, caspase 12 et caspase 14) sont présents dans le génome humain et sont généralement divisés en trois grands groupes.

IV.3.1. Structure des caspases

Les caspases sont des zymogènes (précurseurs d'enzymes inactifs, qui nécessitent une modification biochimique pour devenir une enzyme active) qui se composent d'un prodomaine N-terminal suivi d'une grande sous-unité d'environ 20 kDa, nommée p20, et d'une petite sous-unité d'environ 10 kDa, nommée p10. Dans un certain nombre de procaspases, les sous-unités p20 et p10 sont séparées par une petite séquence de liaison ou « linker ». Selon la structure du prodomaine et leur fonction, les caspases sont typiquement divisées en 3 groupes principaux (**Figure 42**). Les caspases à long prodomaine sont appelées caspases inflammatoires (groupe I) et caspases initiatrices de l'apoptose (groupe II) comprenant les caspases humaines 8, 9 et 10, tandis que les caspases à prodomaine court de 20 à 30 acides aminés sont appelées caspases effectrices (groupe III), formé par les caspases 3, 6 et 7 [145][150].

Les caspases initiatrices contiennent un domaine de mort (DD) tel qu'un domaine d'activation et de recrutement des caspases (CARD) (par exemple les caspases 1, 2, 4 et 9)

ou un domaine effecteur de mort (DED) (par exemple les caspases 8 et 10) qui permet aux caspases d'agir avec d'autres molécules qui dirigent leur activation.

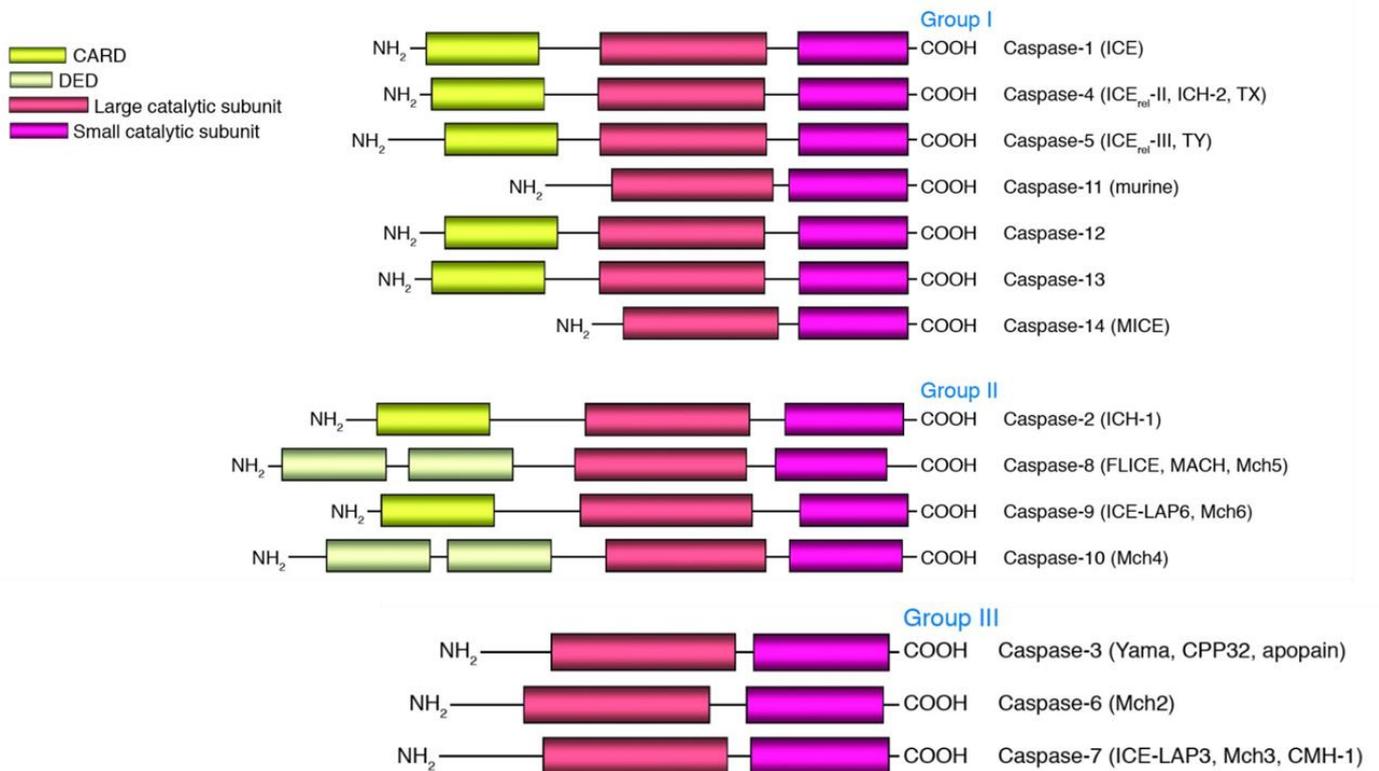


Figure 42. Structure des caspases [150].

IV.3.2. L'activation des caspases

Les caspases sont activées par protéolyse au niveau de résidus asparagine spécifiques situés dans le prodomaine, les sous-unités p20 et p10. Leur protéolyse (par d'autres caspases ou par elles-mêmes via leur activité auto-catalytique) entraîne la dimérisation des formes zymogènes, ce qui entraîne leur clivage. Il en résulte la génération de caspases actives matures constituées de l'hétérotétramère p20₂-p10₂ et la libération du prodomaine (contenant le site catalytique) (**Figure 43**). Ainsi, la forme de l'enzyme active est constituée de deux hétérodimères qui sont chacun constitués de l'association des deux sous-unités (et contenant donc deux sites catalytiques) [151].

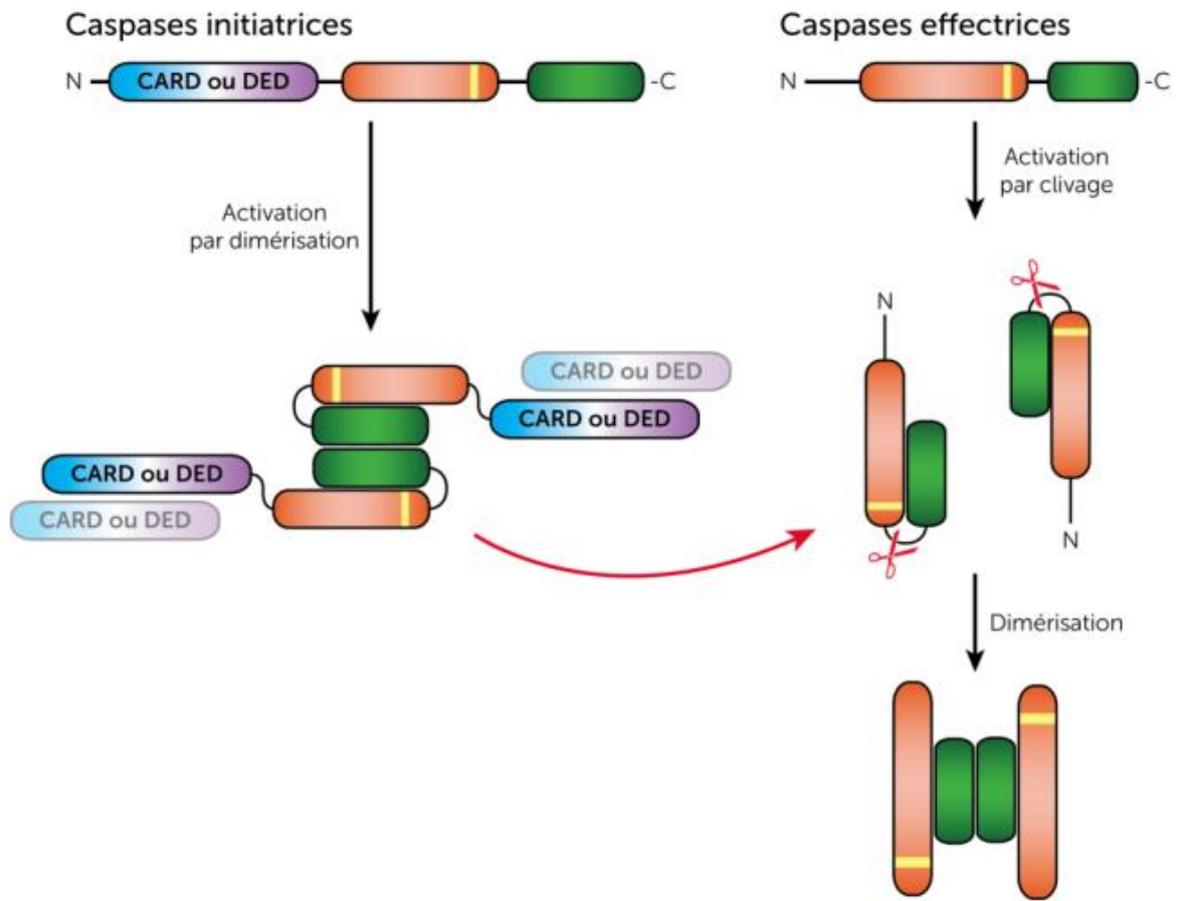


Figure 43. Activation des caspases [151].

Le recrutement des caspases initiatrices se fait par des interactions homotypiques à travers leurs domaines CARD ou DED au sein de complexes activateurs (domaines CARD/DED), ce qui facilite leur homodimérisation. Les caspases effectrices s'activent par clivage via les caspases initiatrices matures et se dimérisent.

IV.3.3. Les cibles cellulaires des caspases

Lorsqu'elles sont activées, les caspases effectrices clivent sélectivement un ensemble de protéines cibles qui suivent un résidu aspartate et qui jouent un rôle indispensable dans l'intégrité des cellules. Les caspases sont responsables du clivage des lamines nucléaires conduisant à la condensation de la chromatine. Le clivage des protéines du cytosquelette comme l'actine va induire la condensation du cytoplasme. Les protéines responsables de la transcription ou de la réparation de l'ADN, telles que la poly (ADP-ribose) -polymérase (PARP), jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Lorsque la PARP est clivée, elle ne peut plus agir sur la réparation des dommages à l'ADN [152] (**Figure 44**).

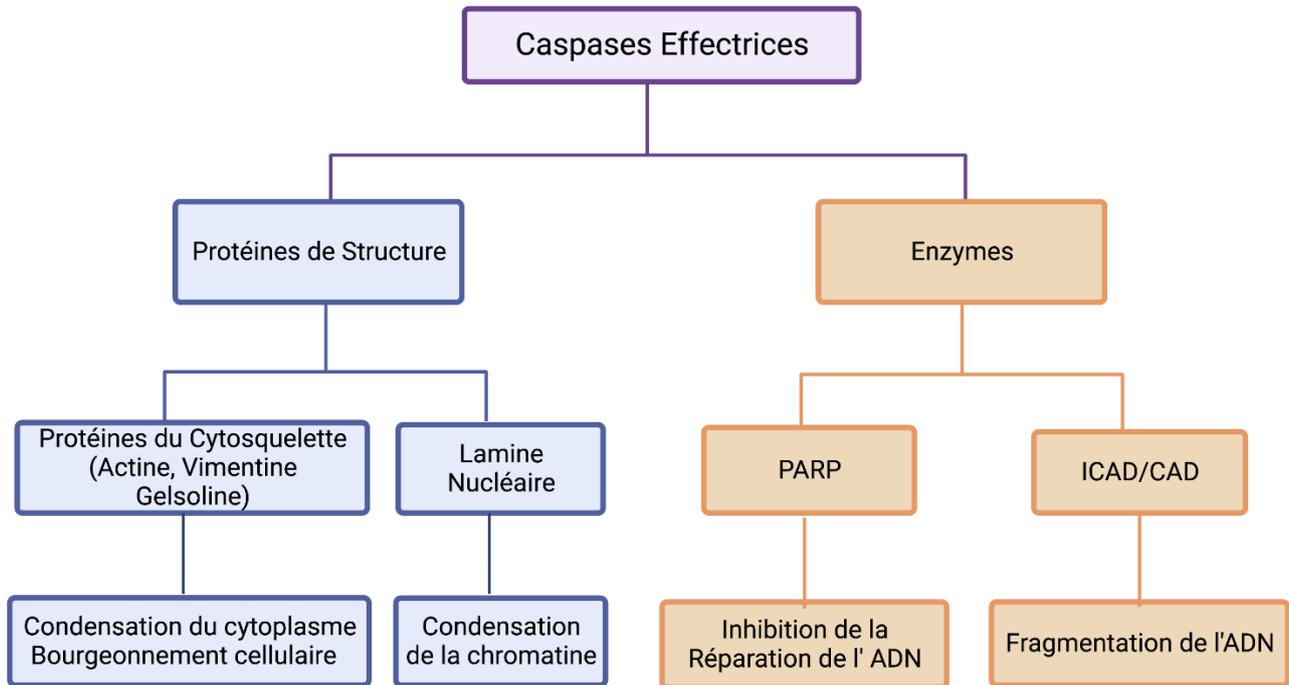


Figure 44. Les cibles cellulaires des caspases [153].

IV.4. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale

Les voies de signalisation intrinsèques qui déclenchent l'apoptose impliquent un ensemble de stimuli non médiés par des récepteurs, qui produisent des signaux intracellulaires agissant directement sur des cibles à l'intérieur de la cellule et initiés par les mitochondries. Ces stimulus peuvent être un stress génotoxique, une privation en facteurs de croissance ou même un stress oxydant.

Tous ces stimuli provoquent des modifications de la membrane mitochondriale interne qui entraînent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération de deux groupes principaux de protéines pro-apoptotiques normalement séquestrées dans l'espace intermembranaire vers l'espace intermembranaire. Le premier groupe se compose du cytochrome c et de Smac/DIABLO. Ces protéines activent la voie mitochondriale dépendante des caspases. Le cytochrome c lie et active l'Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1) ainsi que la procaspase-9, formant un « apoptosome » (**Figure 45**). À son extrémité N-terminale, Apaf-1 présente un domaine CARD qui lui permet de recruter la pro-caspase-9, un domaine central NOD (Nucleotidebinding Oligomerization Domain) qui lui permet de s'oligomériser, et un domaine WD40 répété en C-terminal. Grâce à l'interaction du cytochrome c avec le domaine WD40, Apaf-1 est heptamérisé en présence d'ATP via son domaine NOD, puis la pro-caspase-9 est recrutée via leurs domaines CARD respectifs [154]. Le regroupement de la procaspase-9 de cette manière conduit à l'activation de la caspase-9 et à sa libération par Smac/DIABLO de son interaction avec l'inhibiteur IAP (inhibitors of apoptosis proteins). Une fois activée, la caspase-9 active les caspases effectrices 3, 6 et 7 par clivage et déclenche ainsi l'apoptose (**Figure 46**) [144].

Le deuxième groupe de protéines pro-apoptotiques est constitué de facteurs d'induction de l'apoptose AIF et de l'endonucléase G. Ils sont capables de se transloquer au niveau du noyau et provoquent la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine nucléaire périphérique. L'AIF et l'endonucléase G fonctionnent toutes deux de manière indépendante de la caspase [155].

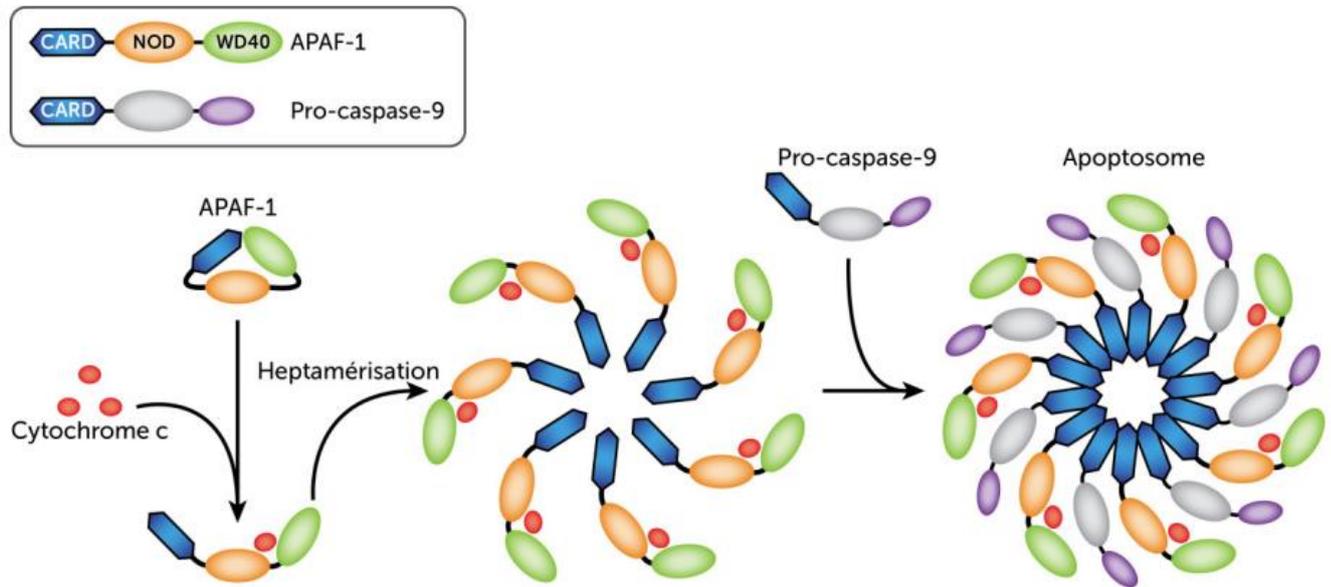


Figure 45. Formation de l'apoptosome [156].

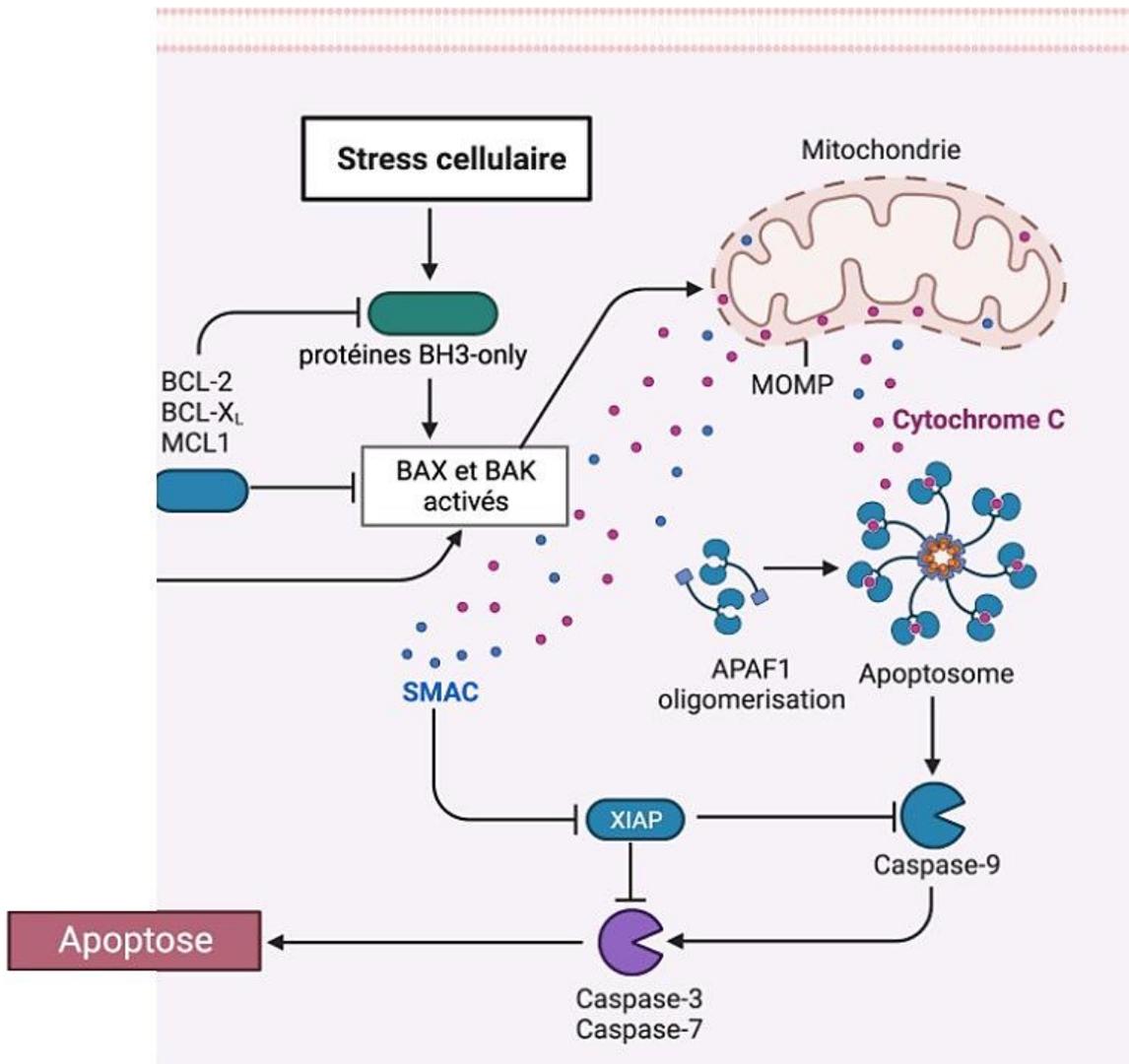


Figure 46. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale [157].

IV.4.1. Les protéines de la famille Bcl-2

Le mécanisme d'induction de l'apoptose dépend de l'équilibre de l'activité entre les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la superfamille des protéines B-cell lymphoma-2 (Bcl-2). Tous les membres de la famille Bcl-2 sont présents sur les membranes mitochondriales externes en tant que dimères où ils contrôlent la perméabilité de la membrane via des canaux ioniques ou par la création de pores. Cette famille de protéines Bcl-2 est subdivisée en trois groupes sur la base de similitudes structurelles et de critères fonctionnels. Le groupe I possède une activité anti-apoptotique tandis que les groupes II et III favorisent la mort cellulaire.

- Les protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2, BCL-XL ou MCL-1, qui ont un domaine transmembranaire et de deux à quatre domaines BH.
- Les effecteurs de l'apoptose tels que BAX et BAK, qui ont un domaine transmembranaire et trois domaines BH (BH1, 2 et 3).
- Les protéines connues sous le nom de « BH3-only » telles que PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) ou NOXA, qui ne possèdent qu'un seul domaine BH3, sont responsables de la médiation des signaux pro-apoptotiques et peuvent avoir un domaine transmembranaire. Dans cette catégorie, on retrouve également les protéines Bid, Bad, Bim et Bik (**Figure 47**) [158].

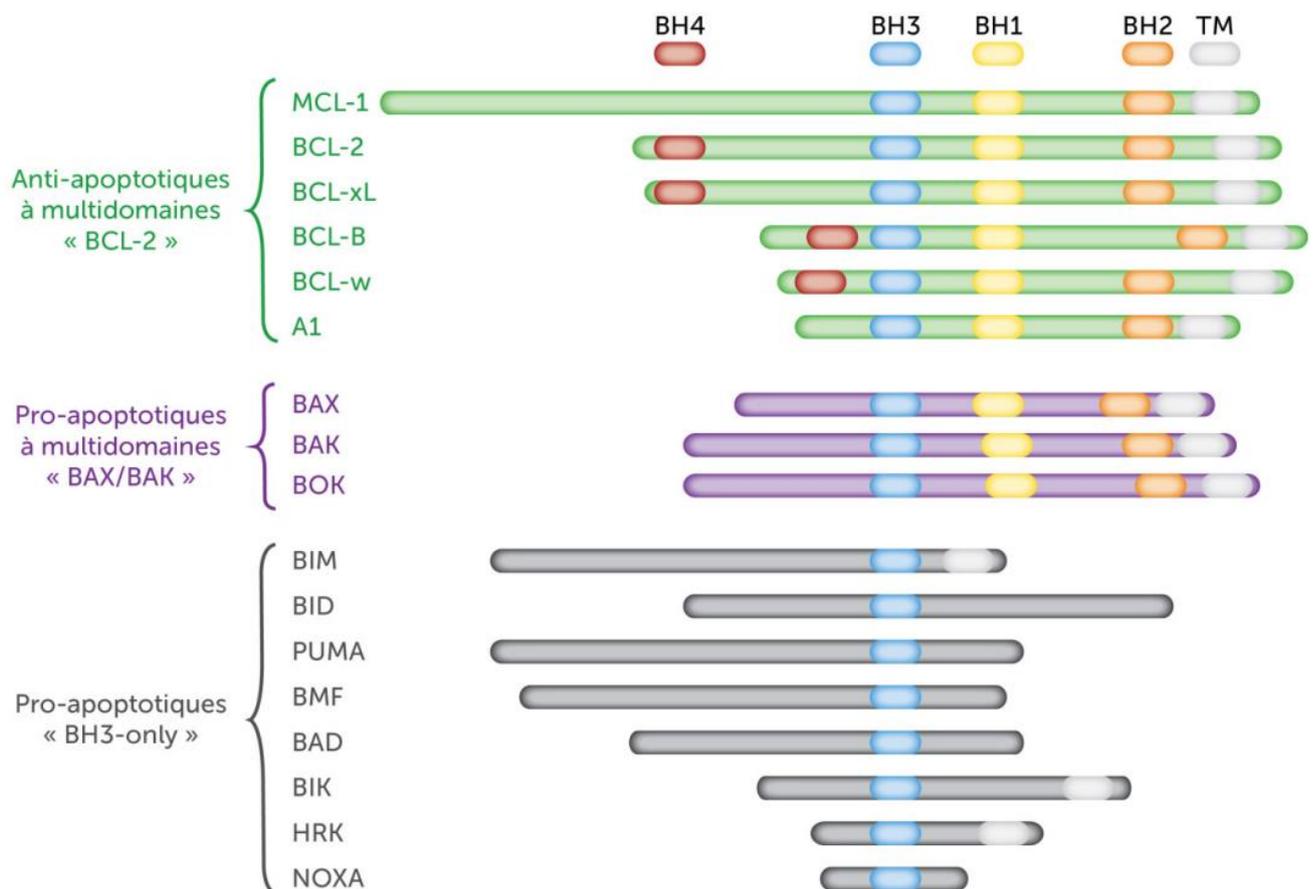


Figure 47. Les protéines de la famille Bcl-2 [156].

IV.5. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

Les voies extrinsèques apoptotiques impliquent des interactions médiées par des récepteurs transmembranaires. On trouve dans cette famille de nombreux récepteurs tels que le récepteur Fas, les récepteurs TNF et les récepteurs TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). Les membres de la famille des récepteurs du TNF partagent des domaines extracellulaires similaires riches en cystéine et possèdent un domaine cytoplasmique d'environ 80 acides aminés appelé « domaine de mort » ou DD (pour death domain). Ce domaine de mort joue un rôle critique dans la transmission du signal de mort de la surface cellulaire aux voies de signalisation intracellulaires. Dans ces modèles, il y a regroupement des récepteurs et liaison avec le ligand trimérique homologue. Lors de la liaison du ligand, des protéines adaptatrices sont recrutées et présentent des domaines de mort correspondants qui se lient aux récepteurs. La liaison du ligand FasL au récepteur Fas entraîne la liaison de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain Factor) et la liaison du ligand TNF α au récepteur TNF entraîne la liaison de la protéine adaptatrice TRADD (TNF-RAssociated Death Domain Protein) avec le recrutement de FADD et RIP (Receptor-Interacting Protein). La FADD s'associe ensuite à la procaspase-8 via la dimérisation du domaine effecteur de mort (DED). À ce stade, un complexe de signalisation induisant la mort (DISC) est formé, entraînant l'activation autocatalytique de la procaspase-8. Une fois la caspase-8 activée, la phase d'exécution de l'apoptose est déclenchée. L'apoptose médiée par les récepteurs de mort peut être inhibée par une protéine appelée FLIP (FLICE-inhibitory protein) qui se lie à FADD et à la caspase-8, les rendant inefficaces (Figure 48) [144][159].

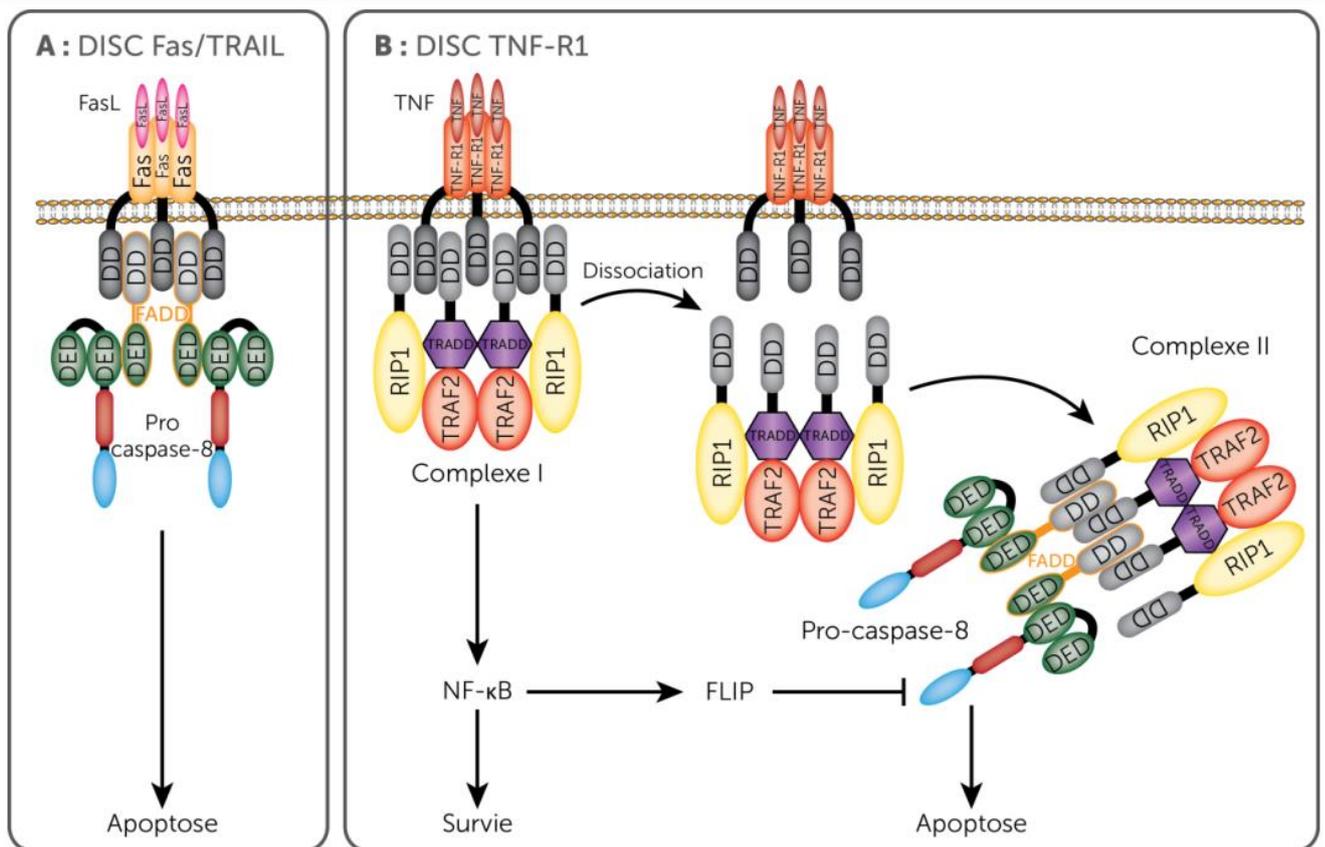


Figure 48. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

A : la liaison du ligand FasL au récepteur Fas entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice FADD dans le domaine de mort du récepteur Fas. La caspase-8 est recrutée et activée par FADD à travers son domaine DED. B : la liaison du TNF à son récepteur TNF-R1 entraîne rapidement le recrutement des protéines TRADD, RIP1 et TRAF2 qui forment le complexe I. En activant la voie NF- κ B, le complexe I peut favoriser la survie. Le TNF-R1 peut se dissocier du complexe I, et le domaine DD de TRADD et/ou RIP1 est libéré et lie FADD, qui recrute la caspase-8 et forme le complexe II. C'est ainsi que l'apoptose est induite.

La caspase-8 activée, pouvant cliver la protéine BID, pourra ainsi influencer les deux voies. C'est la voie intrinsèque qui est alors activée (**Figure 49**). En revanche, la caspase-3 peut cliver la caspase-8 grâce à une boucle de rétroaction, ce qui amplifie le signal apoptotique [160].

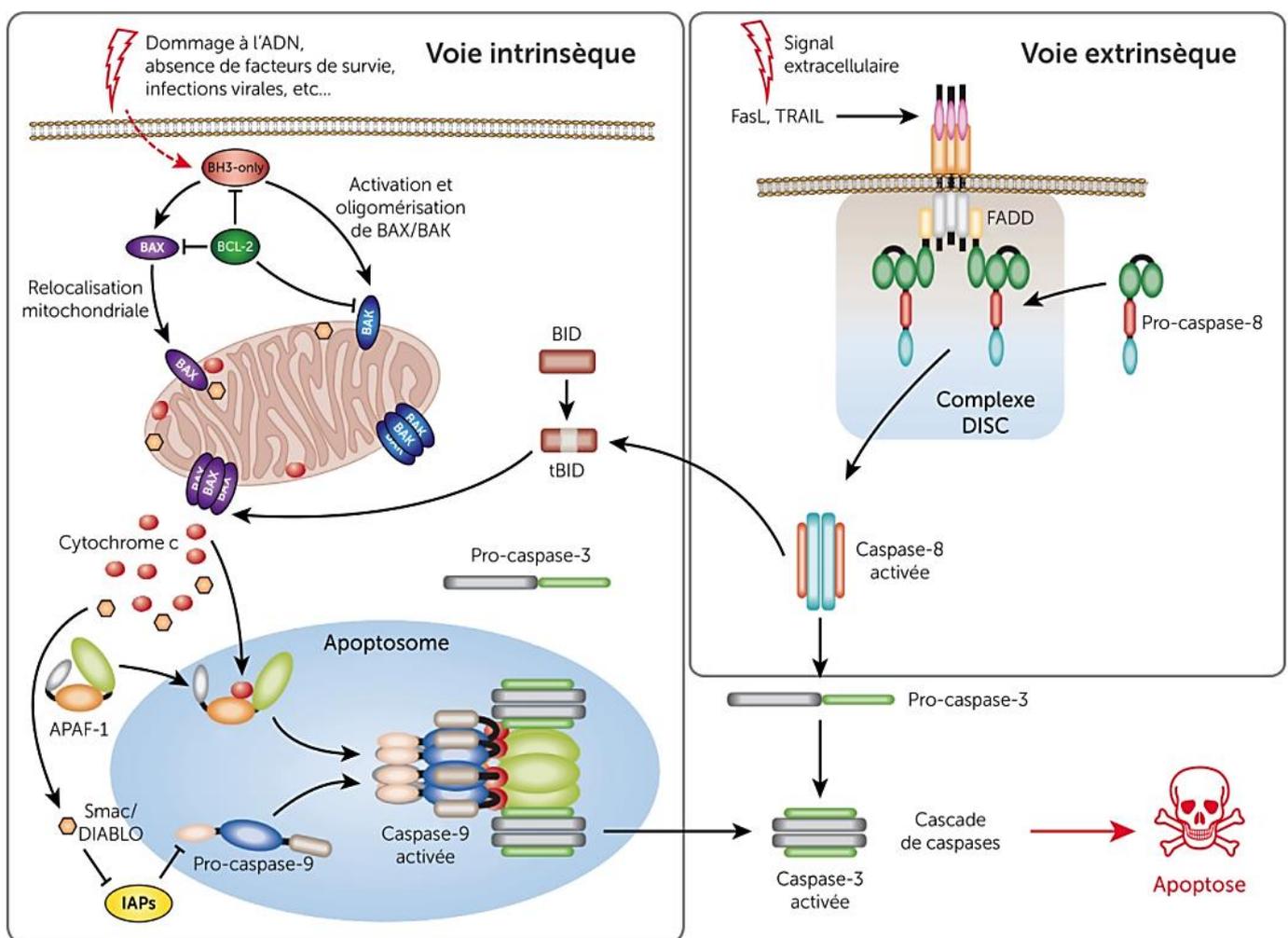


Figure 49. Interaction entre les deux voies apoptotiques [156].

IV.6. L'apoptose et la PDT anticancéreuse

Les ERO qui sont activées par le PS lors de l'excitation lumineuse peuvent causer des dommages cellulaires aux organites intracellulaires des cellules cancéreuses et, par conséquent, déclencher la mort des cellules cancéreuses par PDT. Normalement, les PS peuvent se localiser dans divers organites cellulaires, tels que les mitochondries, le RE, l'appareil de Golgi, les lysosomes et la membrane plasmique. Les mitochondries sont les organites centraux qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose et du métabolisme énergétique des cellules ; leur ciblage est hautement souhaitable pour améliorer l'efficacité de la PDT. En général, la voie de la mort cellulaire dans les cellules ciblées après la PDT dépend de la localisation subcellulaire des PS, de la biodisponibilité des PS, de la concentration d'oxygène, des propriétés physicochimiques des PS, du type de cellule et de la longueur d'onde utilisée. Les PS qui ciblent les mitochondries ou le RE peuvent causer des photodommages à la membrane externe des mitochondries qui est liée aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL [161].

Une induction d'apoptose avec une localisation mitochondriale a été rapportée dans le traitement PDT de cellules d'adénocarcinome du côlon (DLD-1 et Caco-2) par PS à base de phtalocyanine de zinc. Plusieurs études ont rapporté un déclenchement des voies apoptotiques en réponse à la PDT et les mécanismes clés associés à la voie mitochondriale de l'apoptose [62]. Outre les expériences *in vitro*, plusieurs études ont démontré les implications apoptotiques de la PDT *in vivo* [162]. L'un des premiers événements observés dans l'apoptose médiée par la PDT est la perturbation du potentiel transmembranaire mitochondrial. Kowaltowski *et al.* ont montré la perturbation du potentiel de la membrane mitochondriale après la PDT, résultant des effets du PS sur la perméabilité de la membrane mitochondriale [163]. Des mécanismes comprenant la libération de cytochrome c ainsi que l'activation de caspases telles que la caspase-9 et la caspase-3 ont été également signalés lors de traitements par PDT [164]. Parallèlement à ces résultats, le rôle de la caspase-3 dans l'apoptose médiée par la PDT a été examiné dans de nombreuses études avec divers PS [65].

Les traitements par PDT ont induit une augmentation de la perméabilisation mitochondriale induite par Bax. Il a été prouvé que la photoactivation de la Pc 4 dans des cellules de cancer du sein MCF-7 induit la migration de Bax du cytosol vers la mitochondrie et la libération du cytochrome c. Ainsi, l'inhibition de l'expression de Bax provoque une réduction significative de l'apoptose causée par la Pc 4, ce qui met en évidence l'importance primordiale de Bax dans l'induction de l'apoptose [165]. Le ratio Bax/Bcl-2 joue un rôle crucial dans le destin des cellules en termes d'apoptose médiée par la PDT. Lors de la PDT, une augmentation de l'expression de Bax avec une diminution de l'expression de Bcl-2 a été rapportée (**Figure 50**), entraînant l'augmentation du ratio Bax/Bcl-2. En effet, il a été démontré que la photoactivation de l'hypéricine inhibe l'expression de Bcl-2 ou Bcl-XL et augmente l'expression de Bax dans des lignées de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231 [166]. Plus récemment, une étude a montré que l'hypéricine induit la génération des ERO intracellulaires et l'apoptose par la voie mitochondriale dans les cellules de CCR HCT116 et SW620. De plus, une augmentation de l'expression de Bax, une diminution de l'expression de Bcl-2, une augmentation de l'expression de la caspase-9 clivée, de la caspase-3 clivée et de la PARP clivée ont été validées après traitement par PDT [167].

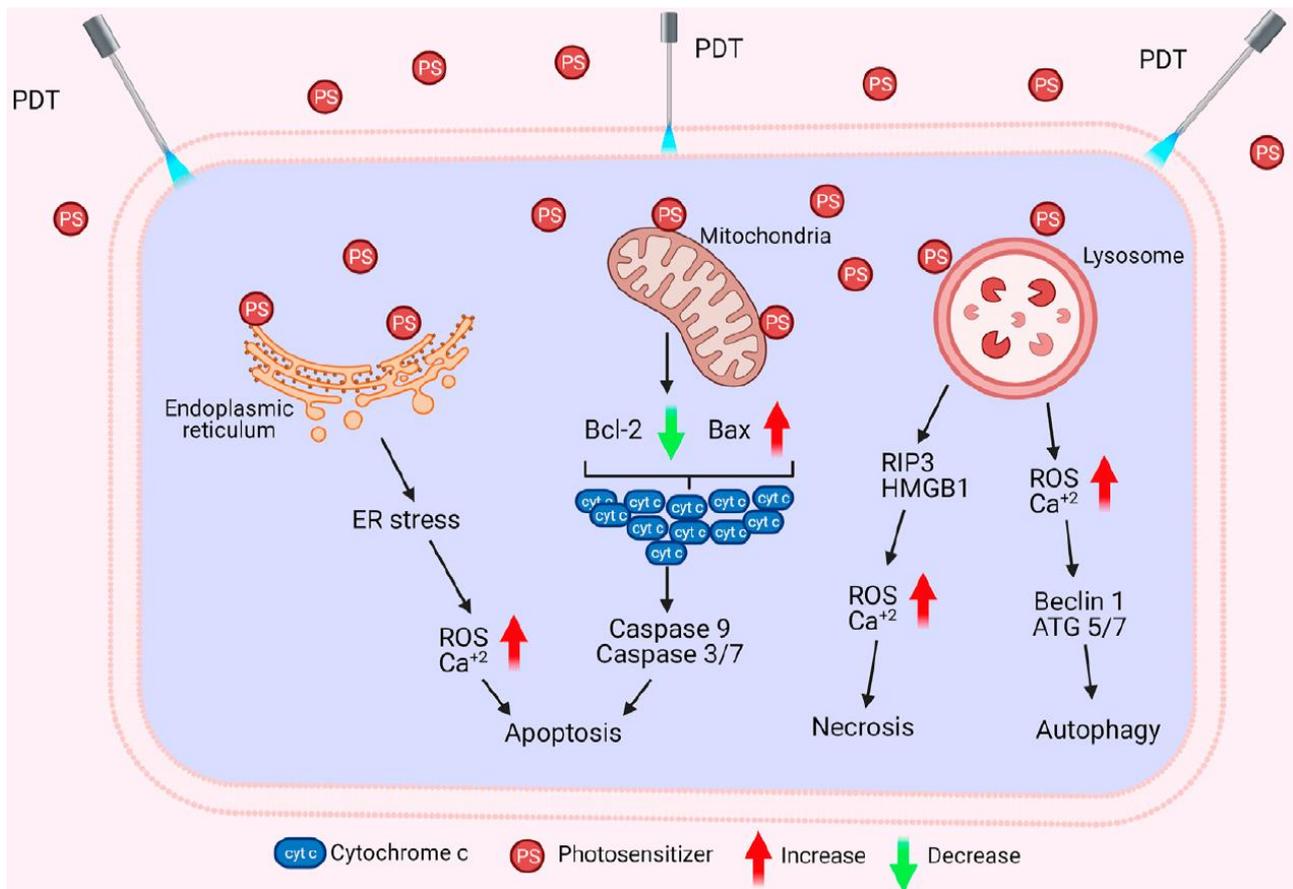


Figure 50. Les différentes voies de mort cellulaire induites par la PDT [65].

Partie V. L'autophagie

L'autophagie est un terme général désignant le processus physiologique naturel par lequel les cellules dirigent certains de leurs composants vers le lysosome via les autophagosomes en vue de leur dégradation. Dans les années 1950, avec le développement de la microscopie électronique, Christian de Duve a signalé l'existence de diverses hydrolases, ce qui a conduit à la découverte des lysosomes en tant qu'organites cellulaires. En 1963, de Duve a décrit l'autophagie comme un phénomène au cours duquel les cellules fusionnent des vésicules contenant des protéines avec des lysosomes, ce qui entraîne la décomposition des protéines cellulaires. Les vésicules ont été appelées autophagosomes. Il s'agit d'un mécanisme essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire, qui élimine les substances toxiques et fournit de l'énergie en période de stress ou de manque de nutriments [168].

Il existe différentes formes d'autophagie, elle est généralement divisée en macro-autophagie, autophagie médiée par les protéines chaperonnes et micro-autophagie. Le terme autophagie fait souvent référence à la macro-autophagie (**Figure 51**).

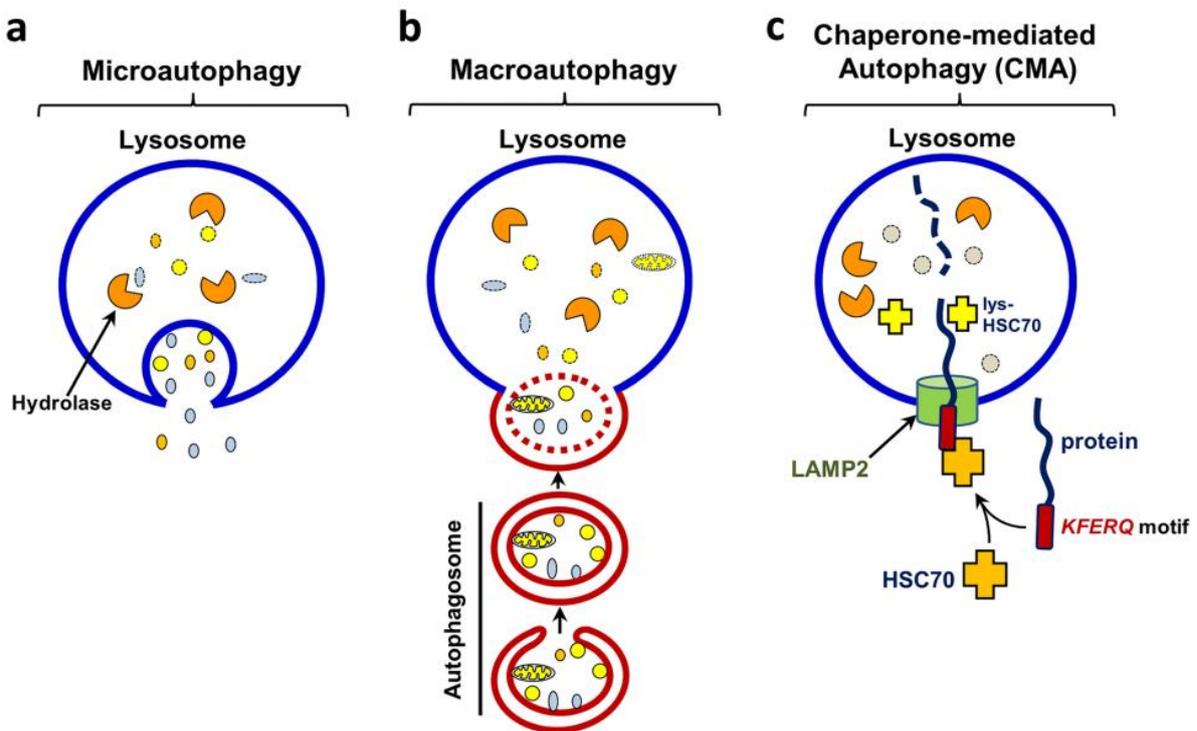


Figure 51 . Les différents types d'autophagie dans la cellule [169].

A) micro-autophagie : le lysosome englobe directement le contenu cytosolique, b) macro-autophagie : les autophagosomes à double membrane internalisent le contenu cytosolique, qui fusionne avec les lysosomes en vue de leur dégradation finale, c) autophagie médiée par les protéines chaperonnes : les protéines contenant des séquences spécifiques, par exemple le motif KFERQ, sont ciblées sur le contenu cytosolique, et sont dirigées vers les lysosomes pour y être dégradées par la machinerie HSC70/LAMP2.

V.1. La micro-autophagie

De Duve et Wattiaux ont décrit les phénomènes de macro-autophagie et de micro-autophagie dans le foie de rat en 1966, mais le nom propre de « micro-autophagie » n'a été créé qu'en 1983. La micro-autophagie est un processus de dégradation lysosomale non sélectif caractérisé par la membrane lysosomale/vacuolaire qui s'invagine de façon aléatoire et se différencie dans le tube autophagique pour enfermer des parties du cytosol (**Figure 52**). Des vésicules se forment au sommet du tube, fusionnent de manière homotypique [170].

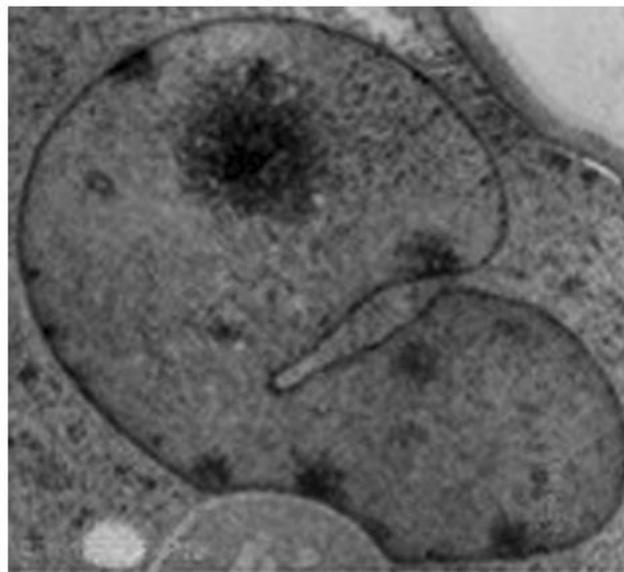


Figure 52. Le tube autophagique caractérisant la micro-autophagie [170].

V.2. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes

L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes est une forme sélective d'autophagie, qui cible exclusivement les protéines pour la dégradation lysosomale. Dans cette autophagie médiée par les protéines chaperonnes, les protéines substrat traversent la membrane lysosomale par l'intermédiaire d'un complexe de translocation des protéines et non par une invagination. Tous les substrats de cette voie contiennent dans leur séquence d'acides aminés un motif pentapeptidique KFERQ (Lysine-Phénylalanine-Acide Glutamique-Arginine-Glutamine) qui, lorsqu'il est reconnu par Hsc70 (heat shock cognate 70 protein), les dirige vers la surface lysosomale. Là, le complexe formé se lie avec la protéine LAMP-2A (lysosomal-associated membrane protein 2A), ce qui favorise la multimérisation de LAMP-2A en un complexe de translocation (**Figure 51**) [171].

Le rôle principal de cette voie dans le métabolisme cellulaire a été prédit comme étant l'approvisionnement en acides aminés libres générés par la dégradation des protéines. Grâce à ce mécanisme unique d'accès aux lysosomes, seules les protéines peuvent être ciblées pour la dégradation lysosomale, contrairement à la macro-autophagie et à la micro-autophagie qui peuvent délivrer n'importe quel type de macromolécules (protéines, lipides, glycogène), d'organites et même de pathogènes.

V.3. La macro-autophagie

La macro-autophagie, souvent nommée autophagie, est un système de dégradation intracellulaire de la majorité des protéines et de certains organites. La macro-autophagie décompose un nombre important de substrats, ce qui permet le recyclage des macromolécules qui en résultent. Les substrats cytoplasmiques de la macro-autophagie sont confinés dans un organite transitoire à double membrane appelé autophagosome, qui fusionne ensuite avec les lysosomes et les vacuoles. Le mécanisme moléculaire de l'autophagie a été largement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ces études ont suggéré que la machinerie moléculaire de la formation des autophagosomes est bien conservée de la levure aux eucaryotes supérieurs [172].

L'autophagie existe naturellement, mais elle est seulement activée en réponse à un stress cellulaire tel que des carences en facteurs de croissance, l'hypoxie, un stress oxydatif, la diminution des niveaux d'ATP et lors d'infections. Elle est étroitement contrôlée par une trentaine de gènes connus sous le nom de gènes ATG (autophagy related genes). Les différentes étapes de l'autophagie sont contrôlées par ces derniers, à savoir l'initiation, puis l'élongation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome [172].

V.4. Les étapes de l'autophagie

L'autophagie peut généralement être divisée en trois étapes principales : l'initiation, l'élongation et la maturation.

V.4.1. L'initiation

La première étape de l'autophagie est marquée par la formation d'une structure membranaire connue sous le nom de phagophore. Des membranes dérivées de sources multiples telles que le RE, les corps de Golgi, les mitochondries, la membrane plasmique et les sites de contact entre le RE et les mitochondries ont été signalées comme contribuant à la formation des membranes du phagophore. Pour commencer l'autophagie, il est nécessaire d'avoir un grand nombre d'acteurs qui interagissent entre eux pour former le phagophore. Deux complexes protéiques majeurs, le complexe ULK1 (Unc-51-like kinase 1) et le complexe PI3K (phosphoinositide 3-kinase) de classe III, jouent un rôle central dans le processus d'initiation. Le complexe ULK1 impliqué dans l'initiation de l'autophagie est régulé par mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1). Les conditions de stress cellulaire entraînent l'inactivation de mTORC1, ce qui provoque l'induction de l'autophagie. La formation du phagophore commence par l'assemblage du complexe ULK1, composé de ULK1, Atg13, FIP200 et Atg101 (**Figure 53**), et la désactivation de l'un des membres du complexe ULK1 inhibe l'induction de l'autophagie. Dans des conditions de stress, l'Atg13 est partiellement déphosphorylé et peut faciliter l'interaction entre ULK1 phosphorylé et FIP200. Le complexe ternaire ULK1-Atg13-FIP200, ainsi que l'Atg101, initie alors la formation de la membrane d'isolation et induit le recrutement d'autres protéines autophagiques clés. L'Atg101 interagit directement avec l'Atg13 et l'empêche d'être dégradé par les protéasomes, ce qui maintient la stabilité de l'Atg13 et de l'ULK1 dans la cellule. Le complexe ULK1 activé recrute ensuite le complexe PI3K générant du PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate) vers la membrane du phagophore. En outre, ULK1 peut directement phosphoryler Bécline-1 pour augmenter son activité. Bécline-1 pourra ensuite phosphoryler VPS34 pour stimuler la production de PI3P sur

la membrane du phagophore. L'autophagosome est contrôlé par PI3P, une molécule lipidique qui recrute des protéines indispensables à l'élongation du phagophore [168] [169].

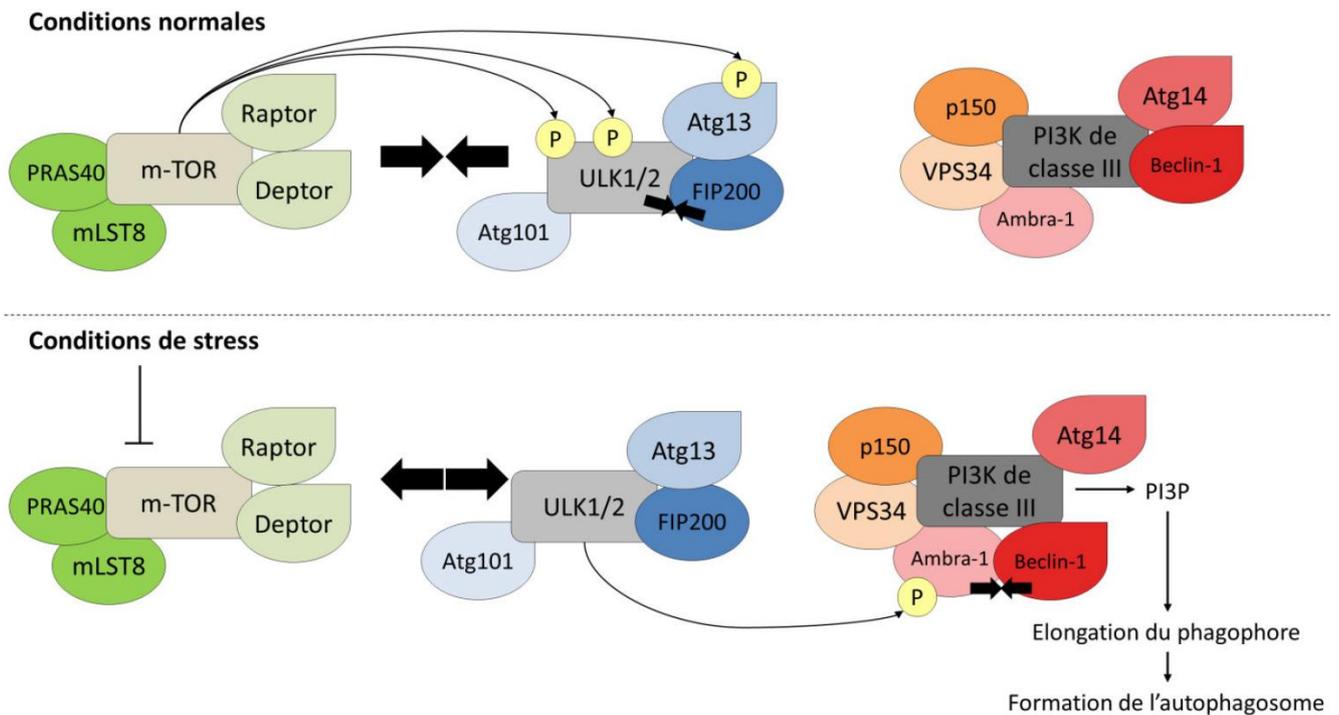


Figure 53 . L'initiation de l'autophagie [173].

mTORC1 interagit normalement avec ULK en phosphorylant ULK1/2 et Atg13. La phosphorylation de Atg13 favorise l'interaction entre FIP200 et ULK1/2. Dans des situations de stress, l'inhibition de mTORC1 permet à ULK1/2 de phosphoryler Ambra1, ce qui facilite l'interaction entre Ambra1 et Bécline-1. Le complexe PI3K de classe III favorise la production de PI3P, ce qui facilite la formation de l'autophagosome.

V.4.2. L'élongation

L'élongation et la maturation des autophagosomes impliquent deux systèmes de conjugaison de type ubiquitine appelés « ubiquitin-like conjugaison system » : le système LC3 (microtubule-associated protein light-chain 3) et le système Atg12. Ces systèmes sont composés de trois catégories de protéines : les enzymes activatrices E1, de conjugaison E2 et d'ubiquitine ligases E3. La phosphatidyléthanolamine (PE) est conjuguée à LC3I par Atg7 (enzyme E1) et Atg3 (enzyme E2). La LC3 conjuguée à la PE se transforme en une forme non soluble (LC3-II) qui s'insère de manière stable dans la membrane autophagosomale. Ainsi, l'élongation est régulée par un complexe hétéro-trimère composé d'Atg12-Atg5-Atg16L1 et d'un deuxième complexe impliquant la protéine LC3-PE (light chain 3 - phosphatidyléthanolamine).

Dans ce premier système d'élongation, Atg12 est une protéine de 186 acides aminés qui est conjuguée à Atg5. Le résidu glycine en C-terminal de l'Atg12 est activé par l'Atg7 de type

E1 par le biais d'une liaison thioester à haute énergie, de manière dépendante de l'ATP. L'Atg12 est ensuite transféré à l'Atg10 de type E2 et finalement attaché à la lysine 149 de l'Atg5 par une liaison isopeptidique. Le conjugué Atg12-Atg5 interagit ensuite avec Atg16L1 pour former un complexe protéique multimérique Atg12-Atg5-Atg16 d'environ 350 kDa par homo-oligomérisation d'Atg16L1. La membrane externe du phagophore en élongation contient ce complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 (**Figure 54,55**).

Le deuxième système d'élongation est basé sur la protéine LC3 qui est normalement présente sous forme immature appelée pro-LC3. Au niveau de la glycine présente en C-terminal, la pro-LC3 sera clivée par la protéinase Atg4, ce qui provoque la formation de sa forme cytosolique active LC3-I. Un résidu de glycine 116 est exposé en C-terminal de LC3-I lors de ce clivage, ce qui permet son activation par Atg7. L'activation, qui est ATP-dépendante, provoque le transfert de LC3-I vers la protéine Atg3, ce qui entraîne la libération de l'Atg7. Par la suite, la C-terminale de la glycine 116 va se fixer à un phospholipide membranaire, la PE, créant ainsi le conjugué LC3-PE ou LC3-II. En contraste avec le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1, LC3-II se trouve à la fois dans les membranes externes et internes du phagophore. LC3-II reste sur les autophagosomes matures jusqu'à sa fusion avec les lysosomes. La conversion de LC3 en LC3-II est donc bien connue comme marqueur de l'induction de l'autophagie [174].

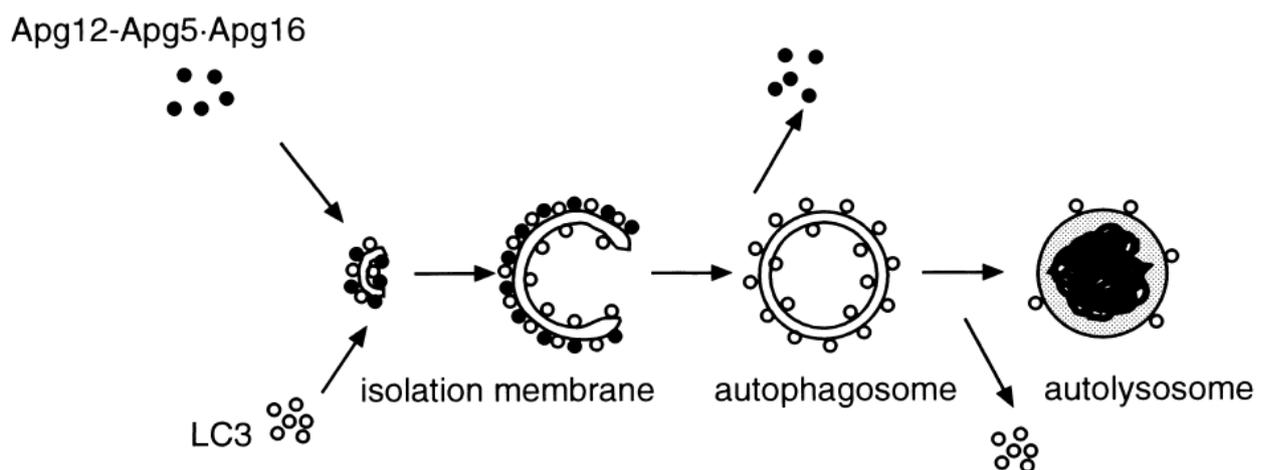


Figure 54. Modèle simplifié de la formation des autophagosomes [172].

V.4.3. La maturation

L'autophagosome se dirige finalement vers les lysosomes, cette colocalisation permet donc la fusion de ces deux structures pour former l'autophagolysosome (ou autolysosome). Toutefois, les autophagosomes peuvent d'abord se combiner avec les endosomes afin de créer des amphisomes, grâce aux protéines du complexe ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). La fusion des amphisomes avec les lysosomes se produit ensuite, ce qui requiert l'intervention de la machinerie Rab-SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), qui est fréquemment utilisée pour la fusion vésicule-vésicule. Au stade final, les cargaisons sont dégradées par l'hydrolase lysosomale dans les

autolysosomes, et les produits de dégradation seront transportés vers le cytosol par les transporteurs lysosomaux (tels que la perméase lysosomale) [168] [174][175].

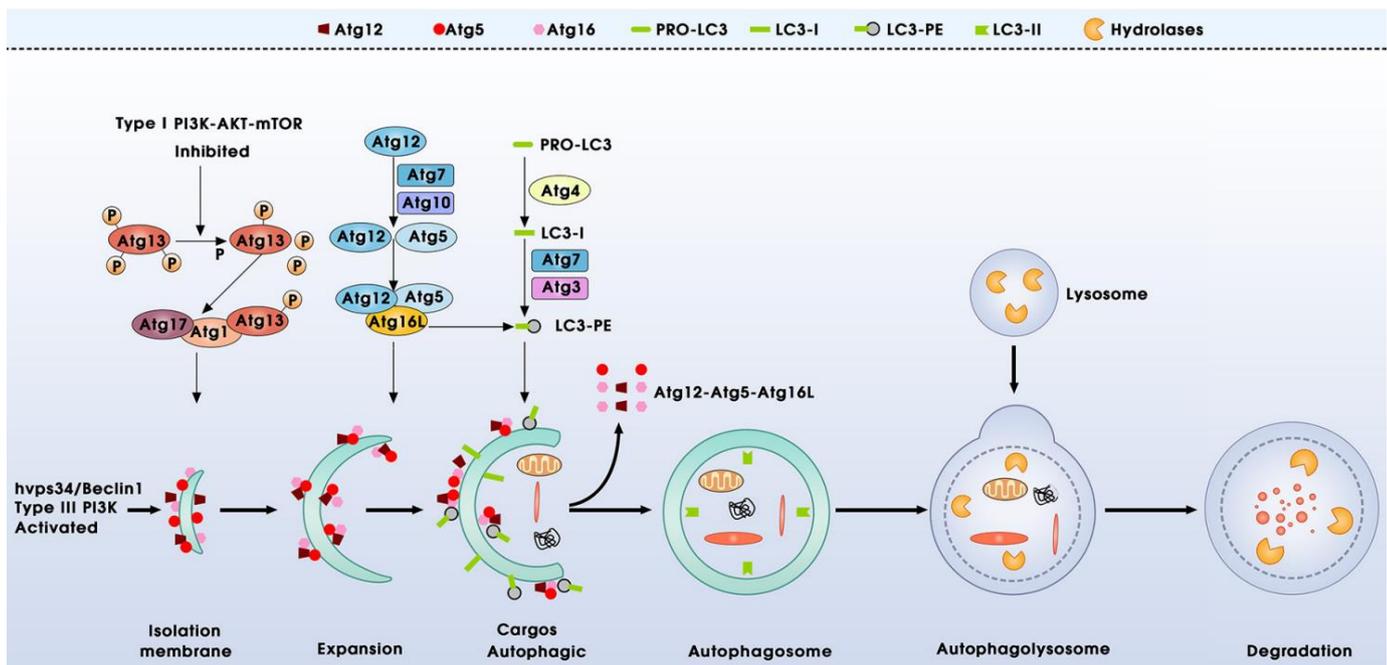


Figure 55. Modèle schématique du processus d'autophagie [175].

V.5. Paradoxe de l'autophagie dans les cancers

Les dérégulations de l'autophagie sont impliquées dans différentes pathologies telles que les maladies neurodégénératives, maladies inflammatoires chroniques, maladies cardiaques ou encore les cancers.

Dans le cadre du cancer, l'autophagie a un double rôle en fonction du type de tumeur et du stade d'avancement de la maladie. Elle peut favoriser la suppression de la tumeur (au stade précoce de la tumorigenèse) ou favoriser la progression de la tumeur (aux stades avancés de la tumeur) [176]. L'autophagie pourrait favoriser la suppression du cancer en supprimant le stress oxydatif, en inhibant la transformation cellulaire, en empêchant l'accumulation de composants cellulaires endommagés et en maintenant l'homéostasie cellulaire [177]. Le mécanisme de suppression des tumeurs est souvent lié à l'activation constitutive des protéines de la voie de la PI3K de classe I dans les cellules cancéreuses et peut correspondre à la fonction de Bécline-1, dont la délétion est relativement fréquente dans les cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate [178]. Il est également possible que l'autophagie aide à ralentir la progression des tumeurs. En effet, le stress hypoxique et métabolique lors de la tumorigenèse peut entraîner l'émergence de signaux nécrotiques, ce qui provoque une inflammation au niveau de la tumeur. La présence d'une inflammation favorise le recrutement de macrophages qui produisent des cytokines qui stimulent la croissance cellulaire afin de remplacer les tissus

détruits. En réponse à ces stimulus, l'autophagie est activée pour réduire la nécrose et l'inflammation, ce qui réduit la prolifération des cellules cancéreuses [179].

Il est également possible que l'autophagie joue un rôle pro-tumoral en répondant aux besoins métaboliques élevés des cellules cancéreuses en prolifération continue. En effet, l'activation significative de l'autophagie dans certains cancers permet la dégradation et le recyclage de divers composés, ce qui augmente les ressources métaboliques disponibles pour les cellules cancéreuses [180]. En outre, une forte activation de l'autophagie lors du détachement des cellules de la matrice extracellulaire soutient également la viabilité cellulaire dans les cellules métastasées. Ainsi, l'inhibition des gènes essentiels de l'autophagie dans les cellules tumorales peut potentialiser l'induction de la mort cellulaire [181].

Dans le cadre du CCR, la protéine LC3-II, marqueur de l'autophagosome, est surexprimée dans les CCR avancés par rapport aux tissus environnants normaux, montrant l'implication de l'autophagie dans ce cancer [168]. Cho et *al.* ont constaté que le niveau d'expression d'Atg5 dans le CCR est diminué. L'analyse immunohistochimique de l'expression de l'Atg5 chez les patients atteints de CCR a montré une corrélation entre l'infiltration des ganglions lymphatiques et l'expression de l'Atg5 [182]. Dans les tumeurs solides, une diminution de l'expression de Bécline-1 est souvent observée et corrélée au développement de métastases. En revanche, dans les CCR et les carcinomes gastriques, l'expression de la protéine Bécline-1 est élevée, ce qui entraîne une augmentation de l'autophagie. Cette observation a conduit à suggérer que la protéine Bécline-1 favorise la prolifération cellulaire et la tumorigenèse dans des conditions de stress telles que l'hypoxie [183]. Cette forte expression de Bécline-1 a été associée à une réduction de la survie des patients atteints de CCR et traités avec le 5-FU. Cette étude suggère que l'augmentation de l'autophagie joue un rôle dans l'initiation du CCR ainsi que dans la résistance à la chimiothérapie du CCR. Les données de cette étude indiquent que l'autophagie peut protéger les cellules cancéreuses du côlon contre le 5-FU et soutiennent le ciblage de l'autophagie comme avantage thérapeutique dans ce cancer [184]. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie augmente la sensibilité des cellules cancéreuses aux médicaments chimiothérapeutiques et aux traitements qui induisent l'apoptose. La chloroquine (CQ) et l'hydroxychloroquine (HCQ), médicaments approuvés par la FDA, comptent parmi les principaux inhibiteurs de l'autophagie explorés dans les thérapies anticancéreuses. L'ajout de l'HCQ à la chimiothérapie par gemcitabine et nab-paclitaxel chez des patients atteints d'un adénocarcinome pancréatique a entraîné une plus grande réponse antitumorale, et une amélioration de la réponse des biomarqueurs sériques [185].

Toutes ces données mettent en évidence le rôle paradoxal de l'autophagie dans les cancers. L'utilisation des molécules activateurs ou inhibiteurs, dans les traitements anticancéreux met également en évidence ce rôle paradoxal.

V.6. L'autophagie et la PDT anticancéreuse

À l'origine, l'autophagie a été définie comme un mécanisme de survie cellulaire qui se produit dans des conditions de privation de nutriments ou de stress oxydatif (hypoxie, ou production des ERO). Dans le contexte de la PDT, la production d'ERO provoque généralement l'activation de l'autophagie. L'activité de l'autophagie est associée à l'apoptose causée par la PDT, mais son activité varie en fonction du type cellulaire, de la localisation du PS et de la quantité d'ERO produite. En effet, la contribution mutuelle des différents types de mort cellulaire dépend de la localisation intracellulaire du PS, de sorte que les altérations des lysosomes ou du RE peuvent provoquer l'autophagie [186].

En ce qui concerne la PDT, on ne sait toujours pas si l'autophagie peut faciliter ou entraver la mort cellulaire induite par le photodommage. L'autophagie peut être un mécanisme de défense contre la PDT, où elle peut lyser les organites photo-dégradés, et les biomolécules oxydées, en essayant ainsi de préserver la viabilité cellulaire [187]. La PDT peut inactiver les régulateurs négatifs de l'autophagie (comme Bcl-2 et mTOR) au lieu d'activer les protéines pro-autophagiques [188]. Une étude a révélé que le « knock-down » des gènes essentiels de l'autophagie (comme Atg7 et Atg5) dans les cellules cancéreuses pourrait améliorer le bénéfice thérapeutique de la PDT [189]. L'autophagie est activée à de faibles doses de PDT, tout comme l'apoptose, et les deux peuvent donc être déclenchées simultanément (**Figure 56**). Cependant, le destin de l'autophagie est décidé en fonction des organites photo-dégradés. Les PS ciblant les mitochondries et le RE génèrent souvent une autophagie inductrice de survie cellulaire, tandis que les PS ciblant les lysosomes inhibent l'autophagie en raison de la perte d'activité de l'organite clé de l'autophagie [189][190]. De plus, l'autophagie peut jouer un rôle pro-mortel en l'absence de capacités apoptotiques et donc induire une mort cellulaire autophagique [188].

En fait, l'autophagie semble jouer un double rôle dans le contexte de la PDT. Plusieurs études ont démontré que l'application d'un inhibiteur de l'autophagie (comme le 3-méthyladénine 3-MA ou la CQ) peut renforcer la mort cellulaire induite par la PDT des cellules de CCR SW620 et HCTT16 [191][192]. Cependant, d'autres études ont montré que l'inhibition de l'autophagie réduit de manière significative la mort cellulaire induite par la PDT dans les cellules de cancer du sein [193].

L'ensemble de ces études suggèrent que la PDT peut induire l'autophagie et l'apoptose et que l'autophagie peut jouer des rôles contradictoires en fonction des types de cellules et des types de PS. L'autophagie est une cible intéressante dans le cadre de la PDT anticancéreuse. Concernant son rôle de résistance à l'apoptose, la combinaison des molécules pro-apoptotiques et anti-autophagiques, pourrait constituer une piste de recherche très prometteuse pour l'élaboration de futures thérapies anticancéreuses.

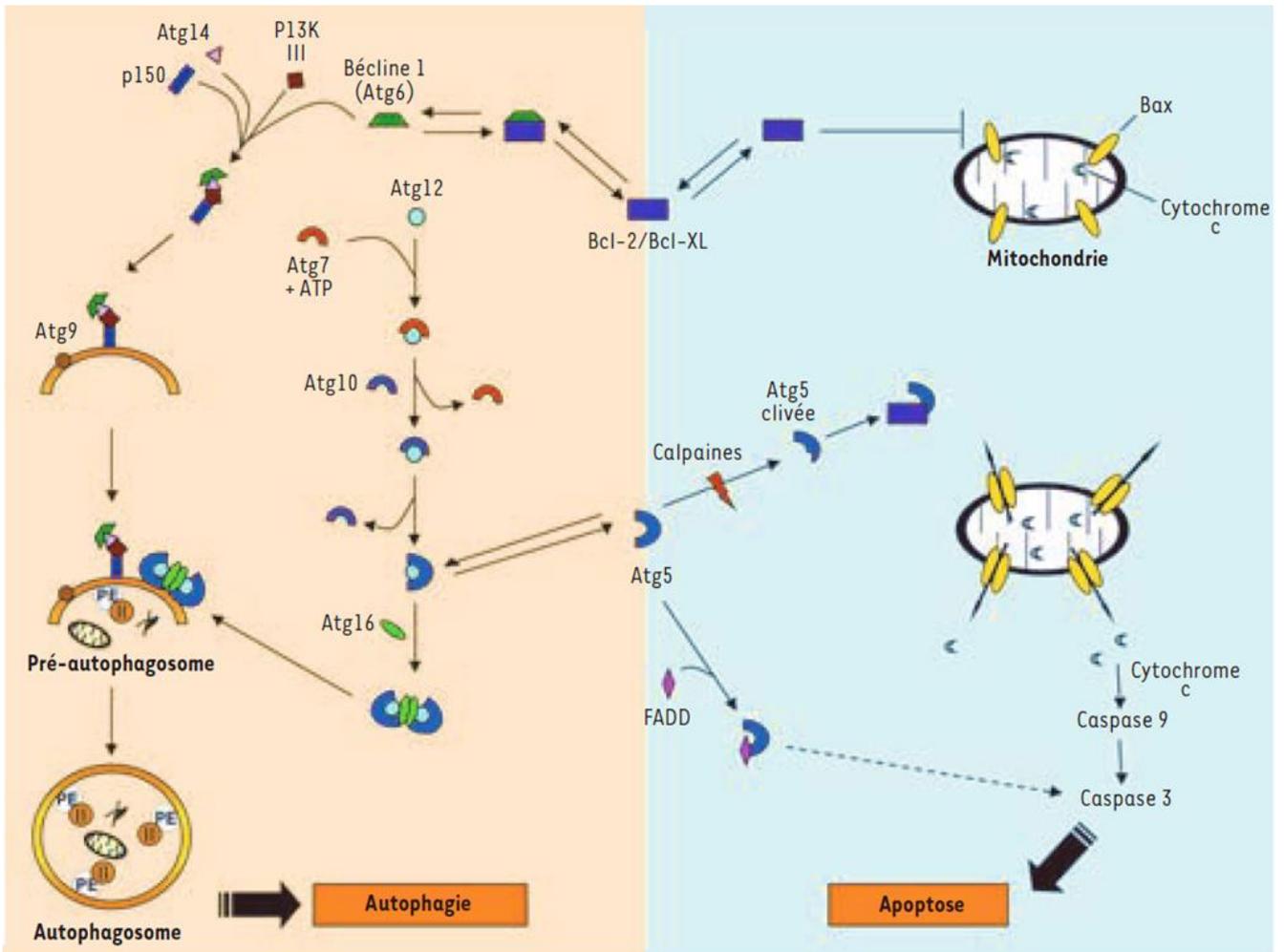


Figure 56. Relation entre l'autophagie et l'apoptose [194].

L'autophagie et l'apoptose ont des facteurs de régulation communs. Bcl-2/Bcl-XL sont régulateurs à la fois de l'apoptose et de l'autophagie. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-XL inhibent l'apoptose en bloquant l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par l'interaction avec des protéines pro-apoptotiques (comme le Bax). L'interaction entre Bcl-2/Bcl-XL et le domaine BH3 de Bécline-1 peut également entraîner une inhibition de l'autophagie. Dans certains cas, Atg5 peut jouer un rôle dans la cascade de l'apoptose, après avoir été clivé par les calpaines. Cette forme clivée sera transportée vers la mitochondrie et interagit avec Bcl-XL afin de libérer son inhibition sur Bax. L'activation de Bax favorise la perméabilité de la membrane mitochondriale, ce qui permet la libération du cytochrome C dans le cytoplasme et l'induction de l'apoptose en activant la caspase 9, puis la caspase 3. En outre, Atg5 a également la capacité d'interagir avec FADD et d'induire la mort cellulaire dépendante de la caspase.

Le CCR est un problème de santé publique majeur représentant le troisième cancer le plus fréquent et le deuxième en termes de mortalité. Malgré des avancées prometteuses dans les approches thérapeutiques conventionnelles, notamment avec la chimiothérapie, la radiothérapie et les thérapies ciblées en parallèle à la chirurgie, le taux de mortalité reste élevé. Ces thérapies sont très efficaces dans les stades précoces de la maladie, mais leur efficacité devient très limitée dans les stades avancés. De plus, les traitements conventionnels sont souvent associés à des effets secondaires sévères, à des récives et à une résistance. Il est donc devenu vital de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui ciblent sélectivement les sites tumoraux tout en améliorant la qualité de vie des patients. Dans les nouvelles thérapies en complément des traitements conventionnels du CCR, la thérapie photodynamique (PDT) est présentée comme une alternative innovante et adjuvante dans le traitement anticancéreux du CCR. Elle repose sur l'absorption sélective d'une molécule photosensibilisante appelée photosensibilisateur (PS), suivie de l'activation du PS par une illumination à une longueur d'onde appropriée, ce qui entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui, à leur tour, conduisent à la mort cellulaire. Les PS n'étant que dans la zone illuminée par la lumière, cela permet un ciblage plus spécifique de la zone tumorale par rapport à une approche chimiothérapeutique systémique. Bien que les applications de la PDT suscitent un intérêt croissant dans le domaine de la recherche anticancéreuse, cette nouvelle thérapie présente encore des limites, telles que l'hydrophobicité de la plupart des PS traditionnels utilisés et retrouvés dans la littérature, l'agrégation des PS dans les environnements biologiques et le manque d'absorption cellulaire sélective. Ces facteurs réduisent l'efficacité clinique de la PDT et limitent son potentiel thérapeutique global. Pour améliorer l'efficacité globale de la PDT, il est donc essentiel de délivrer les PS aux cellules cancéreuses et de réduire les effets secondaires indésirables dans les tissus normaux. La nanomédecine, par l'utilisation de nanoparticules, présente un grand intérêt pour le monde scientifique et médical en raison des propriétés uniques des nanoparticules qui facilitent l'administration et l'accumulation optimales du PS au niveau des cellules tumorales, que ce soit par un ciblage passif (grâce à l'effet EPR) ou actif. Dans cette approche, la vectorisation des PS sur les nanoparticules va permettre d'améliorer leur solubilité dans l'eau, et les liquides biologiques et ainsi leur biodistribution. Dans notre étude, le PS utilisé est la Purpurine-18 (Pp-18), l'un des PS hydrophobes les plus couramment utilisés dans la littérature [195]. La Pp-18 et son dérivé, la chlorine p6 (Cp6), ont été conjuguées avec des nanoparticules hydrophiles biocompatibles nommés « soft fluorescent organic nanoparticles » (FONPs) de 12,9 nm, ci-après appelées FONP[Cp6].

Le but de ces travaux de thèse est d'évaluer l'efficacité antitumorale *in vitro* de ces nouveaux PS nano-vectorisés à base de Pp-18 dans le traitement du CCR. Tout d'abord, la cytotoxicité de ces PS vectorisés après la PDT a été déterminée sur deux lignées humaines de CCR de deux stades d'avancement différents : HCT116 (stade I) et HT-29 (stade II). Ensuite, par des études de microscopie confocale, nous avons confirmé la pénétration dans les cellules et nous avons cherché à déterminer la localisation intracellulaire des FONP[Cp6] dans les lignées cellulaires du CCR. Par la suite, les processus de mort cellulaire induite par la PDT et à l'origine de l'effet anticancéreux des FONP[Cp6] ont été étudiés. Enfin, l'activité anticancéreuse des FONP[Cp6] contre les modèles sphéroïdes 3D de CCR après traitement par PDT a été analysée.

Partie VI. Matériels et méthodes

VI.1. Matériels

Les milieux RPMI 1640 avec ou sans rouge de phénol, le sérum de veau fœtal (SVF), la L-glutamine, la solution de pénicilline/streptomycine et le collagène de type I ont été obtenus de Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). Le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT), le kit 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFDA), le kit « cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay^{PLUS} » (ELISA), les anticorps anti- β -actine humaine ont été acquis chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les anticorps de la PARP, de la caspase-9, de Bcl-2 et de Bax, ainsi que les anticorps contre l'autophagie, les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (HRP), anti-lapin IgG H&L et le LysoTracker Green DND-26 ont été obtenus auprès de Cell Signaling Technology-Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Le MitoTracker, le ER-Tracker, le kit « Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis » et l'iodure de propidium (IP) et les anticorps secondaires anti-souris IgG-IgM H&L couplés à l'HRP, les membranes PVDF (polyvinylidène difluorure) ont été obtenus auprès d'Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Le réactif caspase-3/7 est obtenu auprès de Sartorius (Göttingen, Allemagne).

VI.2. Synthèse de la Pp-18 et des nanoparticules FONP[Cp6]

La Pp-18 a été préparée à partir de la cyanobactérie *Spirulina maxima*, comme décrit précédemment [106]. Après extraction à l'acétone, la chlorophylle a a été traitée avec une solution de NaOH en présence d'oxygène pour permettre la saponification des groupes esters et la formation de l'anhydride cyclique. Le traitement acide a ensuite permis d'obtenir la Pp-18 (Figure 57).

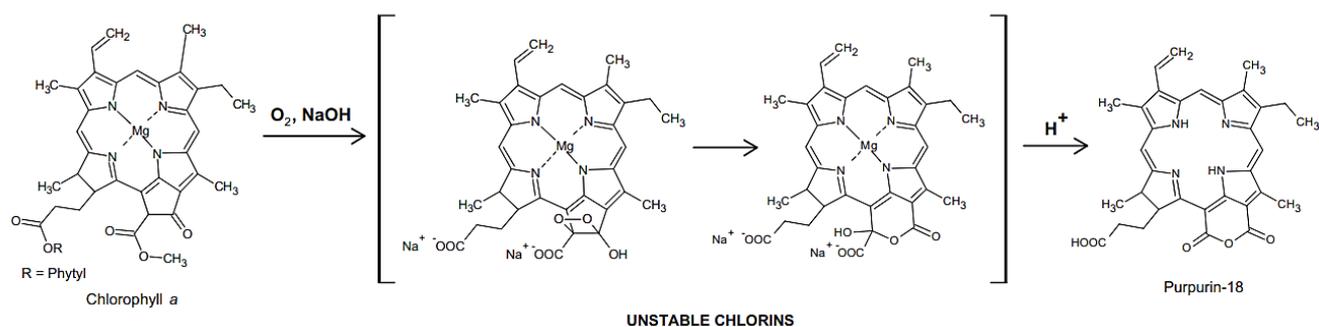


Figure 57. Synthèse de la Pp-18 à partir de la chlorophylle.

La synthèse des FONPs [Cp6] a été réalisée en trois étapes (Figure 58). Les FONPs ont été obtenues par polycondensation contrôlée de l'acide citrique avec la diéthylènetriamine (DETA) (étape 1). Le sel de citrate d'ammonium a d'abord été préparé en mélangeant des quantités équimolaires de DETA et de triacide citrique dans de l'eau pure, puis en évaporant l'eau sous vide pour obtenir un solide sec (le citrate de diéthylènetriammonium). Le sel a ensuite été chauffé à 200°C pendant 30 min, ce qui a permis d'obtenir une matière brute brunâtre-jaunâtre. Cette matière brute a été lavée avec de l'éthanol, puis séchée sous vide pour obtenir

un solide jaunâtre (FONPs nues). Les FONPs nues ont ensuite été enrichies en groupes de surface NH₂ en les chauffant dans de l'éthylène diamine à 120°C pendant 16 h (étape 2), ce qui a permis d'obtenir des FONPs^{NH₂}. Enfin, les FONPs^{NH₂} vont réagir avec la Pp-18 (étape 3) dans un milieu biphasique (H₂O/toluène) sous agitation vigoureuse et chauffage à 100°C. Au cours de cette étape, les groupes NH₂ de la surface des FONPs^{NH₂} peuvent réagir avec l'anhydride exocyclique de la Pp-18, ce qui entraîne le greffage covalent de Cp6 par une liaison amide. Parallèlement, la Pp18 peut s'hydrolyser lentement pour aboutir au Cp6. Les Cp6 et Pp-18 ont tous les deux des fonctions carboxyliques qui peuvent également être extraites dans la phase aqueuse par interaction avec les FONPsNH polyaminés. Les solutions stock de FONPs[Cp6] et de la plateforme FONPs ont été préparées dans de l'eau ultrapure et diluées dans du milieu de culture pour préparer les concentrations de traitement.

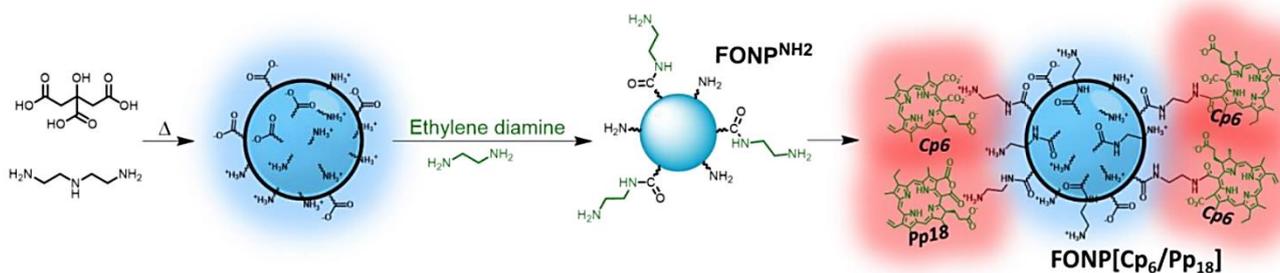


Figure 58. La synthèse des FONPs[Cp6] se fait en plusieurs étapes.

1^{ère} étape : synthèse des nanoparticules organiques fluorescentes FONPs par polycondensation d'acide citrique et de diéthylènetriamine. 2^{ème} étape : enrichissement en groupes de surface NH₂ pour obtenir des FONPs^{NH₂}. 3^{ème} étape : préparation de la nano-formulation FONPs[Cp6] par réaction avec Pp18 [196].

VI.3. Lignées et cultures cellulaires en 2D

Les lignées cellulaires humaines CCR HCT116 et HT-29 adhérentes, et les cellules non cancéreuses HEK-293 (cellules embryonnaires humaines du rein-293) ont été achetées auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC-LGC Standards, Molsheim, France). Nous avons choisi ces lignées cellulaires humaines de CCR parce qu'elles sont à des stades différents, ce qui nous permet d'évaluer la résistance éventuelle à nos traitements : la lignée HCT116 provient d'un d'un carcinome colorectal de stade I d'un homme adulte. La lignée HT-29 CRC a été dérivée d'un adénocarcinome colorectal de stade II d'une femme de 44 ans. Ces trois lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu de culture RPMI complété par 10 % du FBS, 1 % de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cultures ont été placées à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5 % de CO₂. Le comptage des cellules a été réalisé par le test d'exclusion au bleu trypan sur lame de Malassez.

Pour toutes les expérimentations ci-après, les lignées cellulaires ont étéensemencées à 1,2x10⁴ ; 2,1x10⁴ et 2x10⁴ cellules/cm² pour les cellules HCT116, HT-29 et HEK-293 respectivement.

VI.4. Protocole du traitement par PDT

Après 24 h d'adhérence, les cellules ont été exposées ou non à la Pp-18, aux FONPs, ou aux FONP[Cp6]. La solution mère de Pp-18 a été préparée dans du DMSO, alors que les solutions mères des FONPs[Cp6] et de la plateforme FONPs ont été préparées dans de l'eau ultrapure. Les solutions mères ont été diluées avant l'utilisation dans le milieu de culture afin d'obtenir les concentrations finales. Après 24 h, le milieu a été remplacé par un milieu sans rouge de phénol et les cellules sont ensuite illuminées dans la fenêtre photothérapeutique avec une lampe de 650 nm (lumière rouge) (PhotoCure ASA, Oslo, Norvège) à 38 mW/cm². 24 ou 48 h après l'illumination, les cellules ont été récupérées pour les différentes analyses.

VI.5. Analyse de la cytotoxicité *in vitro*

La viabilité cellulaire après PDT a été déterminée à l'aide du test MTT. Ce test colorimétrique est basé sur la réduction de l'anneau de tétrazolium du MTT en cristaux de formazan violet (insolubles dans les milieux de culture) par la succinate déshydrogénase dans les cellules métaboliquement actives. Les cristaux vont ensuite être dissous dans du DMSO, puis la lecture de la densité optique est réalisée à 550 nm par spectrophotométrie.

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de culture à 96 puits selon la densité citée avant pendant 24 h dans 100 µL de milieu de culture. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été exposées ou non aux composés pendant 24 h. Après 24 h, le milieu a été remplacé par 100 µL du milieu sans rouge de phénol et les cellules ont été illuminées ou non. 24 et 48 h après illumination, 10 µL de MTT (5 mg/mL) sont ajoutés dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à 37°C, 100 µL de DMSO ont été ajoutés pour lyser les cellules et par conséquent libérer les cristaux. Le blanc choisi est 100 µL de DMSO, qui est un solvant polaire capable de dissoudre des composés polaires comme apolaires. L'absorbance est ensuite détectée à une longueur d'onde de 550 nm par un spectrophotomètre (Thermoscientific MULTISKAN FC). Les valeurs d'absorbance [A] correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes (n=3) ± SEM. Le pourcentage de viabilité a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire en (\%)} = \frac{[A]_{\text{moyenne des cellules traitées}}}{[A]_{\text{moyenne des cellules témoins}}} \times 100$$

Les IC₅₀, calculées pour chaque lignée cellulaire, correspondent à la concentration pour laquelle 50 % de ces cellules sont vivantes par rapport aux contrôles. L'IC₅₀ a été calculée en utilisant les deux valeurs de viabilité les plus proches de 50 % et les valeurs de concentration correspondantes, suivant la formule suivante :

$$\text{IC}_{50} = \exp(\ln(C1) - ((V1-50) / (V1-V2)) \times \ln(C1/C2))$$

Avec V1 la valeur de viabilité en dessous de 50 %, V2 la valeur de viabilité en dessous de 50 %, et C1 et C2 les valeurs de concentration correspondantes à V1 et V2 respectivement.

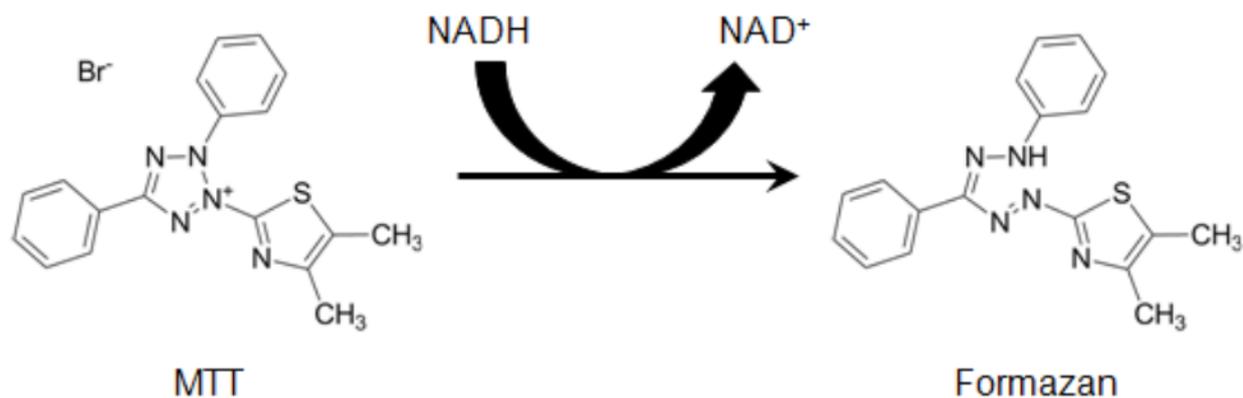


Figure 59. Principe du test MTT [197].

VI.6. Production des espèces réactives d'oxygène

La génération intracellulaire d'ERO a été quantifiée à l'aide d'une sonde fluorescente perméable aux cellules, le « 2',7'-dichloro fluorescein diacetate » (DCFDA), afin de déterminer le stress oxydatif intracellulaire. Une fois que le DCFDA est diffusé dans la cellule, elle sera désacétylée par les estérases cellulaires en un composé non fluorescent. Ensuite, il sera possible de l'oxyder grâce aux ERO cellulaires produites, ce qui entraîne la formation de la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF), un composé fluorescent mesurable par cytométrie en flux (excitation 485 nm ; émission 535 nm). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé comme témoin positif (800 μM).

À cette fin, les cellules (HCT116 et HT-29) ont étéensemencées dans des flasques de culture tissulaire de 25 cm² pendant 24 h avant d'être traitées ou non avec les FONPs[Cp6] aux IC₅₀ calculées. Après 24 h, les cellules ont été marquées avec du DCFDA (20 μM). Après 30 min d'incubation à 37 °C, les cellules ont été illuminées ou non. La génération d'ERO a été évaluée par cytométrie en flux (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) directement après la PDT.

Ces travaux ont été confirmés par microscopie confocale, en utilisant le DCFDA comme indicateur des ERO. Pour cela, les cellules ont été cultivées pendant 24 h dans des chambres d'incubation (ibidi μ-Slide, 8 puits) et recouvertes d'un gel de collagène de type I (3 mg/mL) et d'acide acétique (20 mM). Ensuite, les cellules ont été traitées avec les FONP[Cp6] aux IC₅₀ déterminées. Puis, après 24 h, les cellules ont été incubées avec le DCFDA (20 μM) pendant 30 min, et les images de fluorescence ont été prises sous excitation de 488 nm à un grossissement de 40X par microscopie confocale (microscope confocal Zeiss LSM880).

VI.7. Etude de l'internalisation et de la localisation cellulaire

Les cellules ont étéensemencées pendant 24 h avant d'être exposées aux FONPs[Cp6] aux concentrations IC₅₀. Après 24 h, les cellules ont été fixées avec du méthanol (à -20 °C). Après 10 min, le méthanol a été enlevé et 200 μL de solution de DAPI marquant les noyaux en bleu (Sigma-Aldrich) à 1 μg/mL (dans du PBS stérile) ont été ajoutés pendant 15 min à

37°C. Le complexe DAPI-ADN fluorescent a ensuite été évalué par microscopie confocale (excitation = 364 nm, émission = 458 nm).

La localisation cellulaire a été également analysée par microscopie confocale. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées selon la densité déterminée pendant 24 h avant le traitement avec les FONPs[Cp6] aux concentrations IC_{50} dans des chambres d'incubation recouvertes comme mentionné ci-dessus pour déterminer la localisation cellulaire. Ensuite, après 24 h, les cellules ont été co-traitées avec MitoTracker Green FM (50 nM), ER-Tracker™ Green (500 nM) et LysoTracker Green DND-26 (50 nM) pendant 45 min, 30 min, et extemporanément à 37°C, respectivement. La localisation des FONPs[Cp6] a été examinée par microscopie confocale, en utilisant la fluorescence naturelle des FONPs[Cp6] (excitation/émission : 520/665 nm) avec la fluorescence du MitoTracker (490/516 nm), du LysoTracker (504/511 nm) et du RE-Tracker (504/511 nm). La colocalisation a été analysée à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.52p).

VI.8. Etude de la mort cellulaire induite par la PDT

VI.8.1. Cytométrie en flux par double marquage à l'annexine V et l'iodure de propidium

La cytométrie en flux est une technique permettant une analyse multiparamétrique rapide de cellules individualisées en solution. Elle est composée d'un système d'entraînement des cellules et de lasers comme sources de lumière afin de produire des signaux lumineux diffusés et fluorescents qui sont lus par des détecteurs. Ces signaux lumineux sont par la suite transformés en signaux électriques et forment alors un ensemble de données, intégrées par un logiciel informatique. L'annexine V est une protéine ayant une forte affinité pour les phosphatidylsérines. Une fois couplée à un fluorochrome comme la FITC, elle permet de détecter les cellules au stade précoce d'apoptose. En effet, l'un des premiers événements lors de l'apoptose est l'exposition des phosphatidylsérines au milieu extracellulaire, phénomène de « flip-flop ». Dans des conditions normales, ces phospholipides présents dans la membrane plasmique ne sont exposés qu'au milieu intracellulaire, mais ils se retrouvent exposés à l'extérieur durant l'apoptose.

L'iodure de propidium IP marque l'ADN ou l'ARN dans les cellules où la membrane plasmique est altérée (cellules en apoptose tardive ou nécrotiques). Il s'agit d'un agent intercalant hydrophile des acides nucléiques sans spécificité de base, il peut réagir avec l'ADN ou l'ARN et une fois excité, il produit une fluorescence (fluor à 670 nm) s'il est fixé à un acide nucléique.

Le couplage de l'annexine V à l'IP permet de discerner les cellules en apoptose précoce de celles en apoptose tardive. En effet, comme dit précédemment, l'IP ne peut entrer que dans les cellules ayant une membrane perméable, c'est-à-dire celles en apoptose tardive ou nécrotique.

Ainsi, le double marquage Annexin V-FITC/IP a été réalisé pour évaluer l'induction de l'apoptose. Les cellules ont été traitées avec les FONP[Cp6] pour chaque lignée cellulaire aux IC_{50} déterminées et ont été illuminées ou non. Après 24 et 48 h de la PDT, un total de $2,5 \times 10^5$ cellules/condition ont été collectées, puis lavées avec du PBS, centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min, et incubées avec 100 μ L de tampon de liaison (1X), 5 μ L d'annexine V-FITC et 1 μ L de PI à 100 μ g/mL pendant 15 min à l'obscurité. Ensuite, 200 μ L du tampon de liaison

ont été ajoutés aux échantillons, et le pourcentage de cellules apoptotiques a été analysé par cytométrie en flux. Nos résultats sont représentés dans un diagramme « scatter plot » sous la forme de quatre quadrants : les cellules vivantes (annexine V- /IP-), les cellules en apoptose précoce (annexine V+/IP-), les cellules en apoptose tardive (annexine V+/IP+), et les cellules nécrotiques ou les débris (annexine V- /IP+).

VI.8.2. Quantification de l'activité des caspases-3/7

Les quantités de caspases-3/7 activées ont été analysées à l'aide d'un système IncucyteS3 (Sartorius), il s'agit d'un système d'imagerie de cellules vivantes qui permet un suivi de marqueurs fluorescents au cours du temps. Le réactif vert caspase-3/7 pour l'apoptose combine un motif de reconnaissance de la caspase-3/7 activée (DEVD) à un agent intercalant de l'ADN et convient parfaitement à la quantification en temps réel. L'ajout du réactif caspase-3/7 à des cellules saines normales ne perturbe pas la croissance et la morphologie des cellules, et aucune fluorescence n'est détectée dans ce cas. Lorsqu'il est ajouté au milieu de culture, ce substrat inerte et non fluorescent traverse la membrane cellulaire où il sera clivé par la caspase-3/7 activée, ce qui conduit à la libération de l'agent intercalant de l'ADN et une fluorescence verte de l'ADN nucléaire est donc détectée. Le logiciel d'analyse intégré permet ainsi de quantifier les objets fluorescents et de minimiser la fluorescence de fond.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits pendant 24 h avant d'être traitées ou non avec les FONP[Cp6] aux IC₅₀ et illuminées. Ensuite, les cellules ont été marquées avec le réactif vert caspases-3/7 à 5 µM. Les photos ont été prises toutes les 2 h à un grossissement 20X en contraste de phase/ fluorescence verte. Le rapport nombre d'objets verts/nombre d'objets en phase a été quantifié à l'aide du logiciel Incucyte (version 2023 A Rev1) pour déterminer le pourcentage de cellules fluorescentes vertes apoptotiques.

VI.8.3. Analyse de la fragmentation de l'ADN

Une analyse supplémentaire de la mort cellulaire aux stades tardifs a été réalisée à l'aide d'un kit « cell death detection enzyme linked immunosorbent assay^{PLUS} » pour détecter la fragmentation de l'ADN. Pour ce faire, les cellules ont été traitées ou non avec les FONP[Cp6] aux IC₅₀ pendant 24 h, puis illuminées ou non. 24 et 48 h après la PDT, des culots cellulaires de 2×10^5 cellules/condition ont été préparés. Chaque culot cellulaire a été repris dans 400 µL de tampon de lyse, incubés à une température ambiante pendant 30 min puis centrifugés pendant 10 min à 200 g. Après, 20 µL de surnageant du lysat cellulaire ont été ajoutés dans des puits recouverts de la streptavidine, auxquels sont ajoutés extemporanément 80µL d'une solution contenant des anticorps anti-histones biotinylés et des anticorps anti-ADN conjugués à la peroxydase. Après 2 h d'incubation à l'obscurité sous agitation lente à 300 rpm à température ambiante, plusieurs lavages ont été réalisés avec le tampon d'incubation avant d'ajouter 100 µL par puits d'une solution d'acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) ABTS, substrat de la peroxydase. Ensuite, les échantillons sont incubés à l'obscurité 10 à 20 min à température ambiante sous une agitation lente à 250 rpm. La réaction est alors arrêtée par l'ajout de 100 µL d'ABTS stop. La quantité d'ABTS oxydée est relative à la quantité d'ADN fragmentée pour chaque condition. La densité optique est mesurée par un lecteur de plaque ELISA à 405 nm et à 492 nm (longueur de référence). Les valeurs moyennes des DO (405 nm – 492 nm) ont été déterminées pour chaque condition traitée et par

comparaison des valeurs obtenues pour les conditions non traitées. Les résultats sont exprimés en n-fold (enrichissement) par rapport au contrôle.

VI.8.4. Analyse de l'expression protéique par Western Blot

Les cellules (HCTT16 et HT-29) ont étéensemencées dans des flasques cellulaires de 25 cm² et incubées pendant 24 h, puis traitées aux concentrations IC₅₀ et ensuite illuminées. Après 24 et 48 h de la PDT, les culots cellulaires pour chaque condition a été préparés.

➤ Extraction des protéines totales

Pour extraire et purifier les protéines à partir de ces culots, les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (HEPES 50 mM pH = 7,5 ; Déoxycholate 1 % ; Nonidet P-40 1 % ; SDS 0,1 % ; NaCl 150 mM ; Aprotinine 20 µg/mL) contenant 40 µL/mL d'une solution d'inhibiteur de protéases (Complete®, Roche Diagnostics). Une sonication a ensuite été effectuée 3 fois 5 secondes avec des intervalles de 5 secondes. Les culots ont été ensuite centrifugés à 4°C pendant 20 min à 12 000 rpm, le surnageant a été récupéré.

➤ Dosage protéique par la méthode de Bradford

Un dosage de Bradford a été effectué pour déterminer la concentration protéique. Ce dosage repose sur l'action du bleu de Coomassie, qui est un colorant se fixant aux résidus d'acides aminés basiques. Cette liaison entraîne la coloration bleue, donc plus l'échantillon est bleu, plus la concentration en protéines est conséquente. Afin de déterminer cette dernière, une gamme étalon de BSA (Albumine Sérique Bovine) est réalisée et passée au spectrophotomètre. La gamme est réalisée à différentes concentrations (0 à 2 mg/mL) et la mesure d'absorbance est visualisée à 595 nm.

➤ Western Blot

Pour analyser l'expression protéique, les protéines (60-80 µg) ont été séparées par électrophorèse sur des gels SDS-PAGE (12 à 15 % selon les protéines). La SDS-PAGE est une électrophorèse particulière réalisée dans des conditions dénaturantes dues à la présence de SDS, qui est un détergent fort interagissant avec les protéines et empêchant leur repliement et leur conférant une charge négative. Lors de la SDS-PAGE, les protéines ne migreront donc qu'en fonction de leur taille. Les protéines sont déposées au niveau des gels ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) qui permettra par la suite de déterminer le poids moléculaire des bandes révélées, puis la migration est effectuée à 90 V pendant 2 h dans le tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, pH = 8,5, Glycine 250 mM, SDS 0,1 %). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidène Difluoride) dans du tampon de transfert (Tris 48 mM ; Glycine 39 mM ; Méthanol 20 % ; SDS 0,03 % ; pH= 8,1-8,5). Le transfert est effectué pendant 90min à 100V (100mA). Ensuite, la membrane est lavée dans un tampon TBS (Tris Buffered Salin) 1X-Tween 0,1 %, puis incubée 1 h sous agitation lente avec du tampon de blocage (TBST-lait 5%) pour saturer les sites aspécifiques. Elle est consécutivement réincubée une nuit sous agitation lente à 4°C avec les anticorps primaires de nos protéines d'intérêt dilués dans le TBS-lait 5%.

Les membranes sont lavées 5 fois puis sont réincubées avec des anticorps secondaires couplés à une peroxydase, sous agitation douce pendant 1 h à température ambiante. Ces anticorps sont dirigés contre les Ig de lapin ou bien de souris (dilution 1/2000 et 1/5000 dans le TBS-lait 5% pour les anti-lapin et anti-souris respectivement). Finalement, pour révéler les bandes, une réaction de chimiluminescence est utilisée grâce au système Immobilon et au système G-BOX (Syngene, Oxyme, Saint Quentin en Yveline, France). La β -actine a été considérée comme une protéine de référence. L'intensité des bandes ainsi révélée est déterminée via le logiciel ImageJ.

Tableau 11. Dilution des anticorps primaires.

Anticorps	Source	Dilution
PARP	Lapin	1/1000
Caspase-9	Souris	1/1000
Bax	Lapin	1/1000
Bcl-2	Lapin	1/1000
LC3	Lapin	1/1000
Bécline-1	Lapin	1/1000
Atg3	Lapin	1/1000
Atg5	Lapin	1/1000
Atg7	Lapin	1/1000
Atg12	Lapin	1/1000
β -actine	Souris	1/5000

VI.9. Culture cellulaire 3D des sphéroïdes

Pour la formation de sphéroïdes HT-29, un nombre fixe de cellules : 5000 cellules/puits a été ensemencé dans 200 μ L de milieu de culture complet (RPMI) d'une microplaque de 96 puits transparente, à fond rond et à fixation ultra-faible (Corning, NY, USA). La plaque a ensuite été centrifugée pendant 2 minutes à 300 g pour accélérer la sédimentation des cellules, puis incubée à 37 °C pendant 3-4 jours. Les sphéroïdes ont été surveillés quotidiennement et le milieu de culture a été renouvelé tous les 2 jours, en retirant 100 μ L et en ajoutant à nouveau le même volume de milieu de culture frais.

VI.9.1. Viabilité cellulaire des sphéroïdes

Le test « CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega », se base sur le même principe du MTT, est composé de solutions d'un nouveau composé de tétrazolium : le MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) et d'un réactif de couplage d'électrons PMS (méthosulfate de phénazine). Le MTS étant un composé chargé négativement, il est utilisé avec un accepteur d'électrons intermédiaire (PMS) pour faciliter la réduction du tétrazolium en un produit formazan coloré soluble dans le milieu de culture, et qui peut être quantifié en mesurant l'absorbance à 492 nm. La conversion du MTS en formazan aqueux est réalisée par des enzymes déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives. Ainsi, la quantité de formazan est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans la culture.

Pour ce faire, les cellules de la lignée HT-29 ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond et à fixation ultra-faible dans 200 μ L de milieu de culture sans rouge de phénol pendant 3-4 jours pour former les sphéroïdes. Ensuite, les sphéroïdes ont été traités à différentes concentrations de FONPs[Cp6]. Après 24 h d'incubation, les sphéroïdes ont été illuminés ou non. 48 h après l'illumination, 20 μ L de la solution MTS/PMS (333 μ g/mL MTS et 25 μ M de PMS, dans du PBS) sont ajoutés dans chaque puits contenant 100 μ L de milieu de culture. Après 3 h d'incubation à 37°C, L'absorbance est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 492 nm par un spectrophotomètre. La viabilité cellulaire de chaque condition est exprimée en pourcentage en comparaison à la condition témoin, comme expliqué précédemment. Les expériences ont été répétées indépendamment au moins trois fois (n= 3).

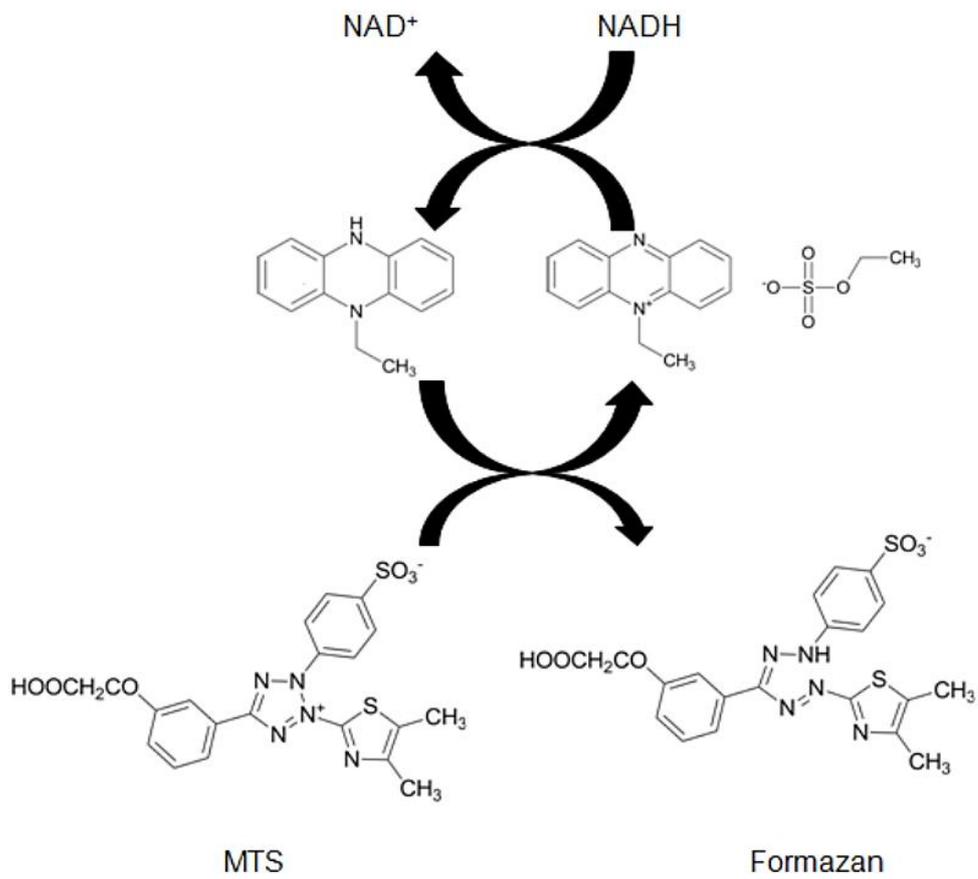


Figure 60. Concept du test au tétrazolium MTS [197].

Un accepteur d'électrons intermédiaire, le sulfate d'éthyle de phéazine (PES), transfère des électrons du NADH dans le cytoplasme pour réduire le MTS dans le milieu de culture en un formazan soluble dans l'eau.

VI.10. Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées comme la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (SEM) de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 9.0 par des tests T de Student non appariés bilatéraux. Les valeurs p de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, et *** $p < 0,001$ ou # $p < 0,05$ et ## $p < 0,01$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Partie VII. Résultats

VII.1. Application des FONPs[Cp6] dans le traitement du CCR

VII.1.1. Article 1

Hydrophilic Biocompatible Fluorescent Organic Nanoparticles as Nanocarriers for Biosourced Photosensitizers for Photodynamic Therapy

Isabelle Sasaki, Frédérique Brégier, Guillaume Chemin, Jonathan Daniel, Justine Couvez, **Rayan Chkair**, Michel Vaultier, Vincent Sol, and Mireille Blanchard-Desce

Nanomaterials 2024, 14, 216. <https://doi.org/10.3390/nano14020216>

La plupart des PS utilisés dans la PDT anticancéreuse, en particulier les chlorines, sont hydrophobes et ils s'agrègent dans les milieux biologiques et ne conviennent pas à une utilisation intraveineuse. Par conséquent, plusieurs méthodes ont été développées pour contourner cette limite et améliorer la biodisponibilité des PS. L'une d'entre elles est l'utilisation des nanovecteurs [196]. Grâce au développement de la nanomédecine, une large gamme de nanoparticules organiques ou inorganiques a été utilisée pour la vectorisation des PS. Dans ce contexte, nous avons décidé d'utiliser des nanovecteurs spécifiques, des nanoparticules organiques fluorescentes (FONPs) qui combinent une très grande hydrosolubilité et une biocompatibilité. Il a été démontré précédemment que ces nanoparticules s'accumulent préférentiellement dans les cellules cancéreuses [198]. En outre, les FONPs présentent de nombreux groupes de surface carboxylés et aminés permettant une conjugaison ultérieure avec des composés hydrophobes. Par exemple, un composé cytotoxique hydrophobe (paclitaxel : PTX) a été greffé sur les FONPs par l'intermédiaire d'une liaison ester, ce qui a permis d'obtenir des nano-systèmes biodisponibles qui conservent leur solubilité dans l'eau [198].

En raison de leur forte absorption entre 650 et 700 nm, des longueurs d'onde qui pénètrent efficacement les tissus, les chlorines ont été étudiées en tant que PS pour la PDT des maladies cancéreuses et non cancéreuses. Parmi eux, la Purpurine-18 (Pp-18) a été évaluée comme un inducteur très puissant de la mort cellulaire médiée par la PDT, avec une forte absorption à 700 nm et un bon rendement quantique de l'oxygène singulet (0,7) [102]. Néanmoins, dans sa forme naturelle, son hydrophobicité entraîne une agrégation au pH physiologique, ce qui limite son utilisation clinique. C'est pourquoi des efforts considérables ont été faits pour surmonter cette limitation de la solubilité.

L'objectif de notre **article 1** a été d'utiliser les propriétés des FONP en tant que nanovecteurs pour produire des nanoparticules fluorescentes entièrement organiques et biocompatibles fonctionnalisées avec la Pp-18 et son dérivé, la chlorine p6 (Cp6) en tant que nouveaux agents de PDT. Cette nouvelle nano-formulation sera ci-après appelée FONPs[Cp6], bien qu'elle comprenne à la fois Pp1-8 et Cp6 en tant que PS. Les FONPs[Cp6] ont été évaluées par microscopie électronique. Les propriétés spectrophotométriques et de fluorescence ont été étudiées dans l'eau et dans une solution PBS. L'effet pharmacologique a été déterminé en mesurant (i) la génération des ERO lors de l'illumination lumineuse en utilisant le « Singlet Oxygen Sensor Green » (SOSG) comme sonde chimique et (ii) la phototoxicité *in vitro* contre deux lignées cellulaires de CCR (HCT116 et HT-29).

Les résultats de l'**article 1** (que vous trouvez ci-dessus) montrent que ces nanoparticules fonctionnalisées combinent la solubilité et la stabilité dans l'eau, un rendement quantique élevé de génération d'oxygène singulet en milieu aqueux (0,72) et une fluorescence dans le rouge profond ou NIR lorsqu'elles sont excitées dans les bandes d'absorption visibles des PS. Une distribution de taille allant de 10 nm à 20 nm a été observée, donnant un diamètre moyen de 12,9 nm pour ces nanoparticules. En outre, ces nanoparticules se comportent comme des PS efficaces induisant la mort des cellules de CCR (HCT116 et HT-29) lors de l'illumination à 650 nm, sans aucune cytotoxicité aux concentrations utilisées à l'obscurité. Ces nanoparticules organiques fonctionnelles sont donc prometteuses pour le traitement PDT du CCR.

Article

Hydrophilic Biocompatible Fluorescent Organic Nanoparticles as Nanocarriers for Biosourced Photosensitizers for Photodynamic Therapy

Isabelle Sasaki ¹, Frédérique Brégier ², Guillaume Chemin ², Jonathan Daniel ¹, Justine Couvez ¹,
Rayan Chkair ², Michel Vaultier ¹, Vincent Sol ^{2,*} and Mireille Blanchard-Desce ^{1,*}

¹ Institut des Sciences Moléculaires (ISM, UMR5255), University of Bordeaux, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Polytechnique de Bordeaux, Bat A12, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France; justine.couvez@u-bordeaux.fr (J.C.)

² Laboratoire des Agroressources, Biomolécules et Chimie pour l'Innovation en Santé (LABCiS, UR22722), University of Limoges, 87000 Limoges, France; frederique.bregier@unilim.fr (F.B.); guillaume.chemin@unilim.fr (G.C.)

* Correspondence: vincent.sol@unilim.fr (V.S.); mireille.blanchard-desce@u-bordeaux.fr (M.B.-D.)

Abstract: Most photosensitizers of interest for photodynamic therapy—especially porphyrinoids and chlorins—are hydrophobic. To circumvent this difficulty, the use of nanocarriers is an attractive strategy. In this perspective, we have developed highly water-soluble and biocompatible fluorescent organic nanoparticles (FONPs) made from citric acid and diethyltri-amine which are then activated by ethylene diamine as nanoplat- forms for efficient photosensitizers (PSs). Purpurin 18 (Pp18) was selected as a biosourced chlorin photosensitizer combining the efficient single oxygen generation ability and suitable absorption in the biological spectral window. The simple reaction of activated FONPs with Pp18, which contains a reactive anhydride ring, yielded nanoparticles containing both Pp18 and Cp6 derivatives. These functionalized nanoparticles combine solubility in water, high singlet oxygen generation quantum yield in aqueous media (0.72) and absorption both in the near UV region (FONPS) and in the visible region (Soret band approximately 420 nm as well as Q bands at 500 nm, 560 nm, 660 nm and 710 nm). The functionalized nanoparticles retain the blue fluorescence of FONPs when excited in the near UV region but also show deep-red or NIR fluorescence when excited in the visible absorption bands of the PSs (typically at 520 nm, 660 nm or 710 nm). Moreover, these nanoparticles behave as efficient photosensitizers inducing colorectal cancer cell (HCT116 and HT-29 cell lines) death upon illumination at 650 nm. Half maximal inhibitory concentration (IC50) values down to, respectively, 0.04 and 0.13 nmol/mL were observed showing the potential of FONPs[Cp6] for the PDT treatment of cancer. In conclusion, we have shown that these novel biocompatible nanoparticles, which can be elaborated from biosourced components, both show deep-red emission upon excitation in the red region and are able to produce singlet oxygen with high efficiency in aqueous environments. Moreover, they show high PDT efficiency on colorectal cancer cells upon excitation in the deep red region. As such, these functional organic nanoparticles hold promise both for PDT treatment and theranostics.

Keywords: PDT; chlorins; purpurin Pp18; nanocarrier; fluorescence; cell viability; colorectal cancer cell lines



Citation: Sasaki, I.; Brégier, F.; Chemin, G.; Daniel, J.; Couvez, J.; Chkair, R.; Vaultier, M.; Sol, V.; Blanchard-Desce, M. Hydrophilic Biocompatible Fluorescent Organic Nanoparticles as Nanocarriers for Biosourced Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Nanomaterials* **2024**, *14*, 216. <https://doi.org/10.3390/nano14020216>

Academic Editors: Virginia Martínez Martínez and Ruth Prieto-Montero

Received: 8 December 2023

Revised: 11 January 2024

Accepted: 15 January 2024

Published: 19 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) using combinations of natural [1] or synthetic photosensitizers [2] (PSs), light and molecular oxygen has been used successfully for the clinical treatments of cancers [3–5] or other non-malignant diseases such as age-related macular degeneration (AMD) [6], psoriasis [7] or antibacterial chemotherapy [8] as well as for waste water treatment [9]. Because PDT allows more localized treatment with possibly lower

side effects and low invasiveness, PDT represents an interesting therapeutic option to or in addition to chemotherapy. Upon excitation of the PSs at appropriate wavelengths [10], the PSs singlet excited state may deactivate to the triplet state by intersystem crossing. Effective PSs used in PDT usually have high intersystem crossing quantum yield. The PS triplet state is then able to generate reactive oxygen species (ROS) from O₂ by two distinct mechanisms: the type I mechanism which involves electron transfer (producing superoxide anion radical O₂^{-•}, hydroxyl radical OH• and H₂O . . .), or the type II mechanism which involves energy transfer (producing singlet oxygen ¹O₂ via triple-triplet energy transfer). Both type I and type II reactions can take place simultaneously. However, in most cases, the PDT occurs via the type II pathway [11]. Interestingly, PDT limits the cytotoxic effect to the proximate area of the PSs' excitation since ¹O₂ has a very short half-life [12] in biological systems (<200 ns).

Various PSs have been used for PDT, as reviewed in the literature [3,4,13–16]. Among them, porphyrinoids [17,18] hold a peculiar place, as Photofrin[®] and Foscan[®] [19] were the very first compounds to be used in clinical protocols. However, most PSs are hydrophobic and tend to self-aggregate [20], which may induce a decrease of the therapeutic effect. Consequently, various methods have been developed to circumvent this limitation and increase PS bioavailability. One way is to conjugate the PSs with hydrophilic moieties. Among them, some can also target the cancer cells, including sugars [21–23], peptides [24–26] or even antibodies [27]. Another option is to modify the structure of the porphyrinic PS by adding bulky substituents or to graft the PS on nanocarriers in order to avoid aggregation [28–30]. Thanks to the development of nanomedicine [31], a wide range of organic or inorganic nanocarriers were used for PS delivery [32,33]. Some of them may be prepared from natural compounds [34] such as peptides [35], polysaccharides [36] or lipids [37], improving their biocompatibility.

In this context, we have decided to use specific nanocarriers, i.e., soft fluorescent organic nanoparticles (FONPs) which combine very high water-solubility, biocompatibility bright blue fluorescence properties in aqueous media and a large two-photon absorption response in the biological spectral window [38]. These nanoparticles were previously shown to internalize preferentially into cancer cells [38]. Moreover, FONPs present numerous carboxylate and amino surface groups allowing further conjugation with bioactive compounds. For instance, a highly hydrophobic cytotoxic compound (i.e., paclitaxel: PTX) was grafted onto FONPs via an ester bond yielding bioavailable prodrug systems which retain water solubility. The FONPs[PTX] nanoparticles were found to internalize into glioblastoma cells, releasing PTX within the cancer cells thanks to enzymatic processes, and subsequently inducing cell death [38]. We also showed previously that FONPs could be functionalized with the potent PS tetrakisphenylporphyrin (TPP), yielding FONPs[TPP] that internalize into cancer cells and can be imaged by two-color two-photon imaging [39]. TPP displays a high quantum yield of ¹O₂ generation (0.66) in organic solvents such as toluene or chloroform [40]. Yet, TPP shows poor absorption in the biological spectral window (650–900 nm) and tends to self-assemble when confined into close proximity, which is deleterious to its optical properties.

We thus decided to use a different PS and we selected chlorin derivatives. These PSs show much more intense Q bands in the red region. Among them, Chlorin p6 (Cp6) and Purpurin 18 (Pp18) are biosourced chlorin photosensitizers which have attracted a lot of interest as PSs for the PDT treatment of cancers [41–48]. Thanks to its absorption maximum located at 700 nm and its large singlet oxygen quantum yield in organic solvents, Pp18 is a very attractive PS for PDT. Yet, Pp18 is a very hydrophobic compound and its structure contains a sensitive fused anhydride. Interestingly, Cp6 which shows an absorption maximum at 665 nm can easily be obtained by opening the fused anhydride of Pp18 with a nucleophile such as an amine [49]. Along this line, previous studies have shown that polyaminated Cp6 conjugated with cellulose nanocrystals or silica nanoparticle exhibited high in vitro phototoxicity against human keratinocyte and colorectal (Colo-205) and oral (Nt8e) cancer cell lines, respectively [49,50].

As previously mentioned, Pp18 and its derivatives are hydrophobic. This is a limitation for their therapeutic use in PDT. Several teams have worked on different approaches to formulate Pp18 using water-dispersible entities as nanocarriers [48–51]. The goal of the present work was to take advantage of the properties of FONPs as nanocarriers to produce fully organic and biocompatible fluorescent nanoparticles functionalized with Pp18 and its derivative (including Cp6) as novel PDT agents. This new nano-formulation will hereafter be called FONPs[Cp6], though it includes both Pp18 and Cp6 as PSs.

FONPs[Cp6] were evaluated by electronic microscopy. The spectrophotometric and fluorescence properties were investigated in water and phosphate buffered saline solution (PBS). The pharmacological effect was determined by measuring (i) the ROS generation upon light irradiation by using Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) as a chemical probe and (ii) the *in vitro* phototoxicity against two colorectal cancer cell lines (HCT116 and HT-29).

2. Results and Discussion

2.1. Characterization of the FONPs[Cp6]

The FONPs[Cp6] were characterized by transmission electron microscopy (TEM). As shown in Figure 1, a size distribution ranging between 10 nm and 20 nm was observed, giving a mean diameter of 12.9 nm. Small amounts of larger nanoparticles (of approximately 25 and 35 nm in diameter) are also noted (Figure 1B).

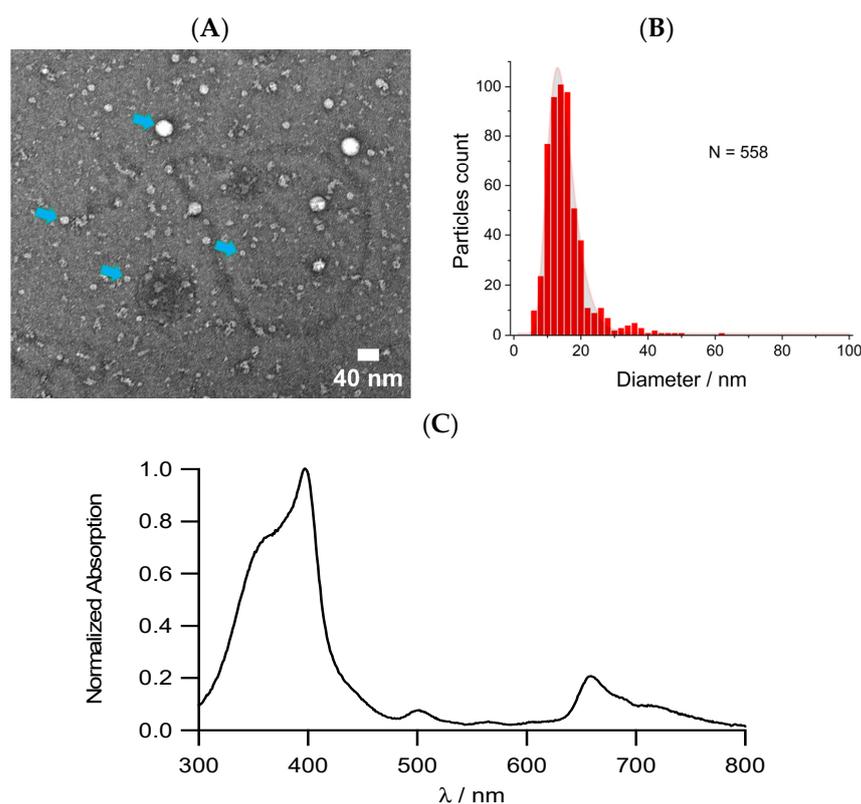
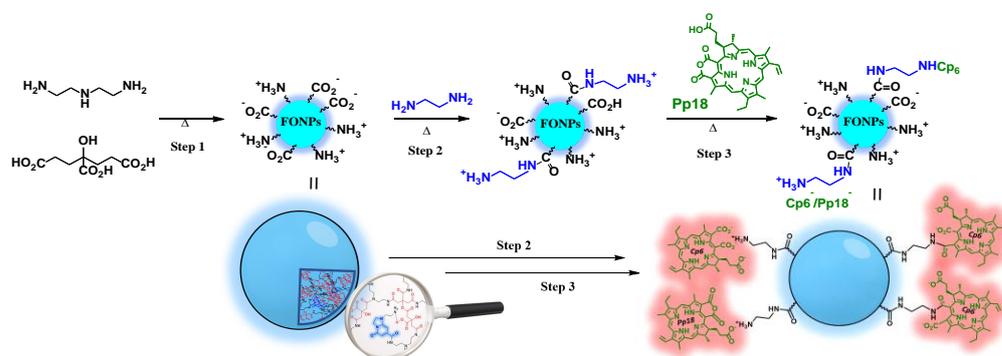


Figure 1. (A) TEM images of FONPs[Cp6], blue arrows show specific FONPs of different sizes; (B) size distribution of FONPs[Cp6] (TEM) fitted with a log normal; (C) UV-Vis absorption spectrum of FONPs[Cp6] in H₂O.

Importantly, FONPs[Cp6] are hygroscopic and retain good solubility in aqueous media, thus allowing the investigation of their photophysical and photochemical properties in aqueous environments. The UV-visible absorption spectrum of the FONPs[Cp6] in water (Figure 1C) shows the presence of the endogenous chromophores of FONPs [52] (absorption maximum approximately 360 nm) and the characteristic bands of both Cp6

derivatives and Pp18 and, i.e., the intense Soret band at 400 nm and the Q bands noticeable at approximately 500 nm, 560 nm, 660 nm and 710 nm. The absorption spectra indicate that Pp18 has been grafted to FONPs^{NH₂} both (i) via covalent bonds resulting from the opening of the fused anhydride of Pp18, (leading to two isomers NH-Cp6) and (ii) via ionic interaction (NH₃⁺-CO₂⁻) thanks to the pendant acidic function of Pp18. Indeed, both the characteristic Q band of Pp18 at approximately 700 nm and characteristic Q bands of Cp6 and Pp18 are observed, with some overlaps. A broadening is also observed due to the presence of the two isomers resulting from the reaction of the amino surface function of the FONPs on the fused anhydride cycle on the two different positions (see Section 3.1 and Scheme 1). From the Q bands' absorbance of stock solutions of FONPs[Cp6], we derived estimated values of the loading of Cp6 (~30 μmol·g⁻¹) and Pp18 (~6 μmol·g⁻¹) for the dry nanoparticles (hereafter, represented as FONPs[Cp6]). Keeping in mind that Pp18 units are expected to slowly hydrolyze to Cp6 derivatives in aqueous environments; the amount of total loading of PSs is evaluated to approximately 35 μmol·g⁻¹.



Scheme 1. Synthetic pathway for the preparation of FONPs[Cp6]. Step 1: synthesis of the fluorescent organic nanoparticles (FONPs); step 2: activation to (FONPs^{NH₂}); step 3: conjugation with Pp18. The inner structure of the nanoparticle (FONPs platform) is pictured in the bottom left, showing the endogenous chromophores that are responsible for the blue fluorescence generated upon excitation in the near UV region.

2.2. Fluorescence Properties

Thanks to their high water-solubility, the fluorescence properties of the FONPs[Cp6] could also be investigated in aqueous media (distilled water and PBS). The fluorescence emission spectra recorded in PBS are shown in Figure 2.

As observed from Figure 2, the FONPs[Cp6] retain both the blue emission (maximum at 448 nm) of the FONPs' endogenous chromophores when excited in the UV region (330 nm where the endogenous chromophores are more selectively excited) and the deep-red emission (665 nm, 720 nm) upon excitation in the green visible (520 nm), originating from the immobilized Cp6 derivatives. In addition, a very weak NIR emission is observed in between 820 nm and 950 nm (peaking at 880 nm) upon excitation at 710 nm. This originates from Pp18 and thus expected to be quite low due to the low amount of remaining (non-hydrolyzed) Pp18 and the very low fluorescence quantum yield of NIR emission, especially in water. In contrast, the emission quantum yield of the blue emission remains significant (20%), though lower than that of non-conjugated FONPs^{NH₂} (30%), indicating that competing deactivation processes occur in the excited state of the endogenous chromophores in the presence of the PSs. These could be due to either energy transfer (the blue emission of the endogenous overlapping with the intense Soret band of Cp6 and Pp18 derivatives) or to fast photoinduced electron transfer followed by charge recombination, thereby bypassing fluorescence emission. Three-dimensional fluorescence experiments show that Förster resonance energy transfer (FRET) may indeed be involved (Figure 2, bottom right: green spot corresponding to $\lambda_{exc} = 300$ nm and $\lambda_{em} = 665$ nm). Yet, this transfer is not quantitative as two-thirds of the blue emission is retained upon excitation at 330 nm (Table 1).

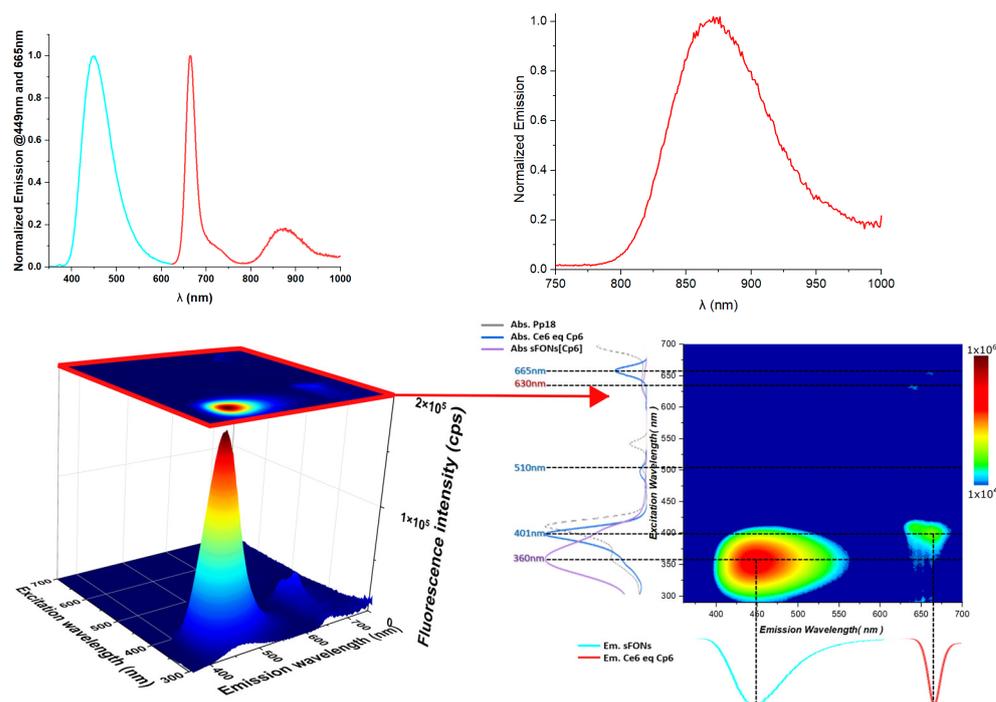


Figure 2. (Top) Emission spectra of FONPs[Cp6] in PBS under excitation at 330 nm (blue) and 520 nm (red) (left). Emission spectra of FONPs[Cp6] in PBS under excitation at 710 nm (right). (Bottom) Two-dimensional fluorescence projection (right) from 3D fluorescence experiment (left).

Table 1. Fluorescence properties of FONPs^{NH2} and FONPs[Cp6] in water.

Compound	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	λ_{exc} (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Φ_f^a
FONPs ^{NH2}	360	360	450	0.30 ^b
FONPs[Cp6]	360, 400, 500 (sh), 550 (sh), 665, 710	330	448	0.20 ^b
		710	665, 720	0.04 ^c , 0.09 ^d
			880	n.d.

^a Experimental fluorescence quantum yield values determined using; ^b quinine bisulfate in 1N_{H2}SO₄ ($\Phi_f = 0.546$); ^c 4-(dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (DCM) in ethanol ($\Phi_f = 0.437$) and ^d indocyanine green in dimethylsulfoxide ($\Phi_f = 0.11$) as standards.

The deep-red emission fluorescence quantum yield of Cp6 (excitation at 520 nm) is comparatively much lower (4–9%), in agreement with the band gap law, but remains acceptable, especially in water and aqueous environments. These fluorescence properties are of particular interest for monitoring the internalization of these nanocarriers loaded with PSs into cells while the NIR emission of Pp18 could be of interest for in vivo imaging.

2.3. Singlet Oxygen Generation

To investigate the PDT performance of FONPs[Cp6], we first measured its ROS generation upon excitation by using Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) as a chemical probe. SOSG has been used in a range of biological systems that are known to generate singlet oxygen [53]. The excitation was carried out with a 405 nm LED (Soret band of the PSs). Fluorescence spectra of the solution were recorded regularly to monitor the variation of the fluorescence intensity. As shown in Figure 3, the fluorescence intensity of SOSG at 534 nm increased significantly over time after incorporating 4 μ L of SOSG (0.5 mM in MeOH) into 2.8 mL of an aqueous solution of FONPs[Cp6] upon excitation at 405 nm. In a control experiment involving SOSG without FONPs[Cp6], only a faint change was observed. These results indicate a fast generation of ¹O₂ from FONPs[Cp6].

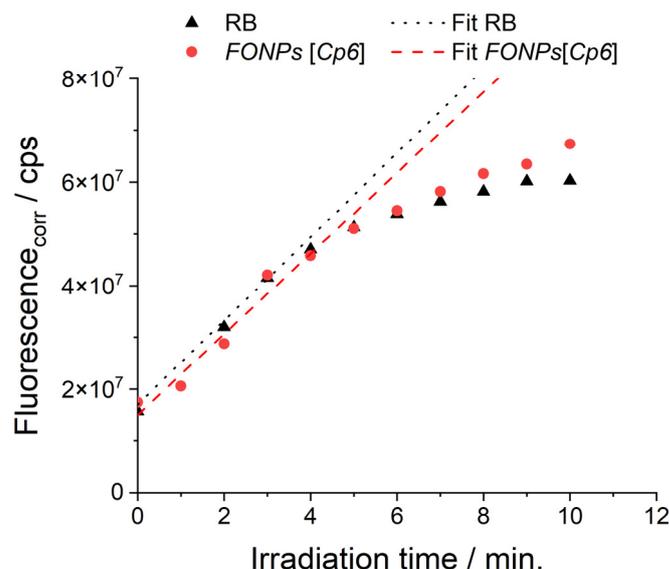


Figure 3. Kinetic of oxidation of SOSG probe in PBS in the presence of Rose Bengal with 530 nm (25 mW) or FONPs[Cp6] upon 405 nm (25 mW) illumination.

The singlet oxygen generation quantum yield (ϕ^{Δ}) of FONPs[Cp6] was determined in PBS using a standard rose bengal (RB) whose ϕ^{Δ}_{Ref} value is 0.76 in PBS [54]. The 1O_2 generation during the illumination of FONPs[Cp6] or RB was monitored by the fluorescence of the oxidized form of the SOSG probe. As the absorption coefficient values of SOSG in its oxidized and reduced form are slightly different, for each time point (t), fluorescence intensity ($\int fluorescence$) was corrected by the measured absorbance at 504 nm using Equation (1):

$$Fluorescence_{corr}(t) = \frac{\int fluorescence}{1 - 10^{Abs_{504nm}(t)}} \quad (1)$$

Then, 1O_2 quantum yield (ϕ^{Δ}) can be estimated using Equation (2):

$$\phi^{\Delta} = \phi^{\Delta}_{Ref} \cdot \frac{k^{SOSG}}{k^{SOSG}_{Ref}} \quad (2)$$

where k^{SOSG} and k^{SOSG}_{Ref} are the first order reaction rate constants of generation of the oxidized form of SOSG in the presence of FONPs[Cp6] or RB, respectively, ($\phi^{\Delta}_{Ref} = 0.76$).

From the measurements in the linear part of the curve (Figure 3), we derived the slope values $k^{SOSG} = 7.8 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ and $k^{SOSG}_{Ref} = 8.1 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$, from which we could derive a ϕ^{Δ} value of 0.72 for FONPs[Cp6] in PBS. Hence, the FONPs nanoparticles behave as smart nanocarriers, providing water solubility to the hydrophobic photosensitizers as well as excellent singlet oxygen generation quantum yield in aqueous environments.

2.4. In Vitro Photoirradiation Studies of FONPs[Cp6] on Colorectal Cancer Cells

The phototoxic effect of FONPs[Cp6] in vitro was examined on two human colorectal cancer cell lines: HT-29 and HCT116. For this purpose, we treated these two cell lines with increasing concentrations of FONPs[Cp6], then cells were irradiated (IR) or not (NIR) with red illumination (650 nm). The cytotoxic effects were investigated by MTT assay. Our results revealed that FONPs[Cp6] did not induce any significant toxicity in the dark on either HCT116 or HT-29 cell lines. In contrast, after PDT irradiation, the cell viability decreases rapidly in a dose-dependent manner in both cell lines (Figure 4).

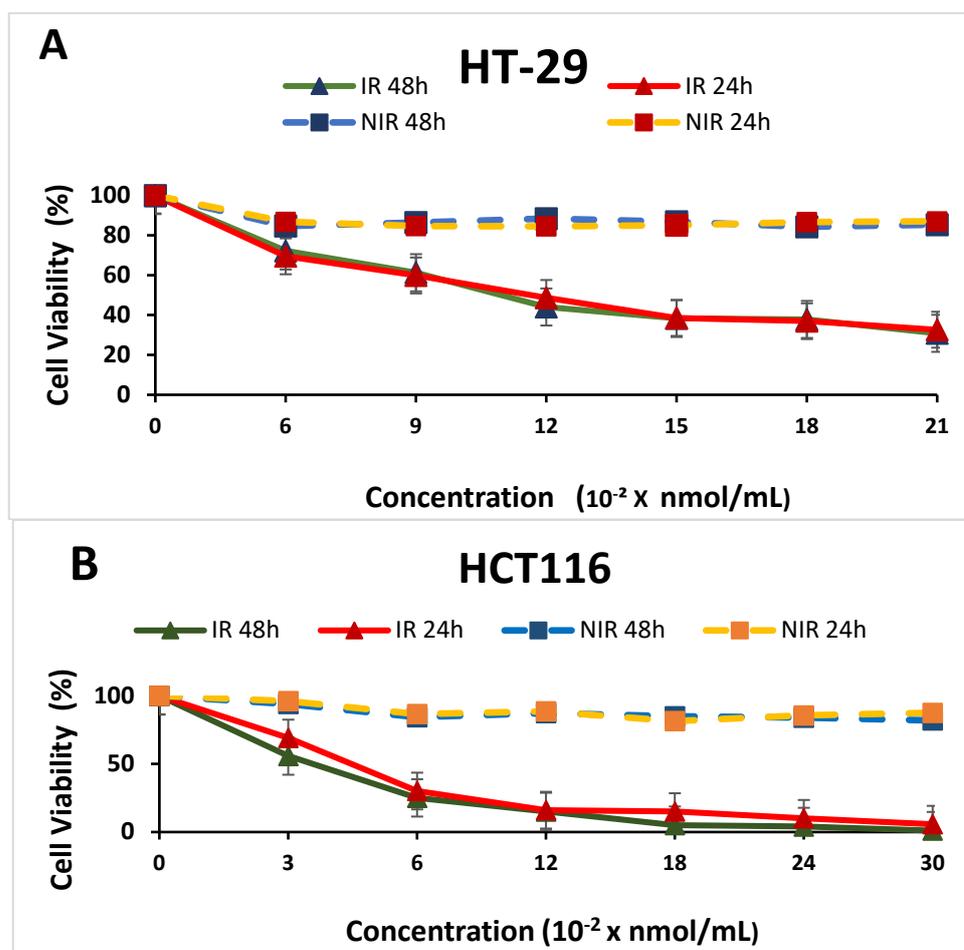


Figure 4. In vitro phototoxic effect of FONPs[Cp6] on HT-29 (A) and HCT116 (B) cell lines. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 3$). Illumination conditions: 38 mW/cm² during 32 min.

HT-29 cells were or were not seeded in 96-well culture plates for 24 h in DMEM medium before treatment with different concentrations of FONPs[Cp6]. After 24 h incubation, these cells were or were not irradiated with a 650 nm lamp (75 J/cm²). Cell viability was monitored by MTT assay 24 h and 48 h after irradiation, as a percentage of each condition compared to untreated ones. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 3$).

HCT116 cells were or were not seeded in 96-well culture plates for 24 h in RPMI medium before treatment with different concentrations of FONPs[Cp6]. After 24 h incubation, these cells were or were not irradiated with a 650 nm lamp (75 J/cm²). Cell viability was determined by MTT assay 24 h and 48 h after irradiation, as a percentage of each condition compared to untreated ones. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 3$).

Our results showed that 48 h after irradiation, the HCT116 cells are more sensitive to treatment with FONPs[Cp6] than the HT-29 cells with IC₅₀s of 0.04 nmole/mL (corresponding to 1.14 μ g of Cp6/mL) and 0.13 nmole/mL (corresponding to 3.62 μ g of Cp6/mL) respectively, (Table 2). The higher efficacy of photosensitizers after illumination against HT116 versus HT-29 colorectal cancer cell lines is well known and is in agreement with the literature [47].

These results demonstrate that FONPs[Cp6] are potentially active PSs for PDT. In comparison with the literature, FONPs[Cp6] showed a better efficacy than nanoparticles functionalized with porphyrinic PSs. As an example, in the same conditions and after PDT treatment of the same colorectal cancer cell lines, Bouramtane et al. showed that silica-xylan nanoparticles bearing porphyrin (TTPOH) as a photosensitizer display cytotoxic activity, with IC₅₀ values of 0.0726 and 0.550 nmol/mL after 48 h against HCT116 and HT-29 cancer cell lines, respectively [55]. With pheophorbide-a covalent linked to xylan

nanoparticles, in vitro phototoxicity (IC₅₀ values) was 810 nmol/mL after 48 h against the HT-29 cell line [56]. Hence, the FONPs[Cp6] represent promising biosourced and bioinspired material for the PDT treatment of colorectal cancer. In that perspective, in vivo tests will be conducted in the near future.

Table 2. IC₅₀ (for FONPs[Cp6] in µg/mL and for active PSs in nmole/mL) values determined with MTT assays on HCT116 and HT-29 cell lines.

FONPs[Cp6]	IC ₅₀ /IR 24 h		IC ₅₀ /IR 48 h	
HCT116	1.40 µg/mL	0.05 nmol/mL	1.14 µg/mL	0.04 nmol/mL
HT-29	3.86 µg/mL	0.15 nmol/mL	3.62 µg/mL	0.13 nmol/mL

3. Materials and Methods

3.1. Synthesis

The starting materials were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (Saint Quentin Fallavier, France), TCI EUROPE N.V. (Haven, Belgium) and Thermo Scientific Chemicals (Karlsruhe, Germany). *Spirulina maxima* was purchased from the Claudine Vallée EURL (Chanzeux, France).

The synthesis of FONPs[Cp6] was achieved in three steps (Scheme 1). FONPs were obtained from the controlled polycondensation of citric acid with diethylenetriamine (DETA): step 1. A different protocol was elaborated in comparison to the standard protocol reported earlier [38,39]. Our motivation was to implement a more robust and easily scalable protocol. The ammonium citrate salt was first prepared by mixing equimolar amounts of DETA and citric triacid in pure water, then evaporating the water under vacuum to obtain a dry solid (i.e., diethylenetriammonium citrate). The salt was subsequently heated at 200 °C for 30 min leading to a brownish-yellowish crude material. This crude material was washed with ethanol then dried under vacuum leading to a yellowish solid (bare FONPs). Bare FONPs were then enriched in NH₂ surface groups by heating them in ethylene diamine at 120 °C for 16 h (Scheme 1, step 2), leading to FONPs^{NH₂} [39].

In parallel, Pp18 was prepared from cyanobacterium *Spirulina maxima* as previously described [57]. After acetone extraction, the chlorophyll *a* was treated with a NaOH solution in the presence of oxygen to enable the saponification of the ester groups and the formation of the six-membered cyclic anhydride. The subsequent acidic treatment furnished Pp18.

Experimental protocol: Pigments are extracted twice from *Spirulina maxima* in dry powder form (50 g) with acetone (2 × 1 L) by stirring at 60 °C (reflux) for 2 × 1 h. The dark green extract is filtered and the filtrate (2 L) is reduced to 1 L by partial evaporation under vacuum using a rotary evaporator. A 6M NaOH solution (200 mL) is added and air is bubbled through the mixture which is stirred vigorously for 2 h. Concentrated hydrochloric acid (100 mL) is then added and the resulting mixture is stirred at room temperature for 30 min. The solution is decanted. The organic layer is dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The residue is purified using silica gel flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 92/8) to afford Purpurin 18 (241.3 mg). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ_{ppm} = 9.55 (s, 1H, 10-H), 9.34 (s, 1H, 5-H), 8.56 (s, 1H, 20-H); 7.86 (dd, *J* = 17.8, 11.6 Hz, 1H, 3¹-CH); 6.28 (d, *J* = 17.8, 1H, trans-3²-CH₂); 6.17 (d, *J* = 11.6, 1H, cis-3²-CH₂); 5.18 (dd, *J* = 9.3, 1.8 Hz, 1H, 17H); 4.38 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H, 18-H); 3.74 (s, 3H, 12-CH₃); 3.61 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H, 8¹-CH₂); 3.33 (s, 3H, 2-CH₃), 3.14 (s, 3H, 7-CH₃); 2.76 (m, 1H, 17²-H), 2.53–2.42 (m, 2H, 17¹-H), 1.98 (m, 1H, 17²-H); 1.73 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, 18-CH₃); 1.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H, 8-CH₃); 0.19 (brs, 1H, NH); −0.10 (brs, 1H, NH).

Finally, FONPs^{NH₂} were reacted with Pp18 (Scheme 1, step 3) in a biphasic medium (H₂O/toluene) under vigorous stirring and heating at 100 °C. During this step, the FONPs^{NH₂} surface NH₂ groups may react with the exocyclic anhydride of Pp18 leading to the covalent grafting of chlorin *p6* (Cp6) via an amide bond. In parallel, Pp18 may slowly hydrolyze leading to Cp6. Both Cp6 and Pp18 have carboxylic functions which can also be extracted in the water phase by interaction with the polyaminated FONPs^{NH₂}. While

the FONPs^{NH2} are soluble in the aqueous phase, Pp18 is soluble in toluene. During the reaction, the colored toluene phase gradually fades while the aqueous solution turns red.

Experimental protocol: To a solution of 350 mg of FONPs^{NH2} in 3 mL of distilled water, were added 35 mL of toluene, then 14 mg of Pp18 (25 μ moles). The reaction mixture was stirred vigorously for 90 min while heating at 100 °C in the dark under argon. Stirring was continued overnight under an inert atmosphere. The toluene phase, which became colorless, was then decanted and discarded. The water phase was washed with toluene then freeze-dried. A final washing with dichloromethane was carried out: 310 mg of dark-green solid was obtained and stored in a freezer at -18 °C.

3.2. Characterization

Transmission electron microscopy (TEM): The sizes of FONPs-[PS] were determined by TEM imaging which was performed on a HITACHI H7650 (Krefeld, Germany) at 80 KV. Copper grids coated with a carbon membrane were pre-treated using the glow discharge technique. One droplet of the aqueous nanoparticle solution was deposited on the grid; the excess liquid was gently drawn-off with paper and the sample was further stained with uranyl acetate. The nanoparticles were randomly and manually counted using the ImageJ program (using a circle selection). The diameter of each nanoparticle was measured and the results were given as a medium size (diameter) of the overall counted nanoparticles. For the statistics, 558 nanoparticles were counted.

UV-visible absorption and fluorescence spectroscopies: All photophysical properties were investigated with freshly prepared air equilibrated solutions at room temperature (293 K). UV/Vis absorption spectra were recorded using a Jasco V-570 spectrophotometer (Lisses, France). Steady-state fluorescence measurements were performed on diluted solutions (optical density < 0.1) contained in standard 1 cm quartz cuvettes using a Horiba FluoroMax spectrometer (Palaiseau, France) or a Horiba Fluorolog spectrometer (Palaiseau, France) in photon-counting mode. Fully corrected emission spectra were obtained for each compound at $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ with an optical density at $\lambda_{\text{ex}} \leq 0.1$ to minimize internal absorption.

3.3. Singlet Oxygen Detection

To evaluate the singlet oxygen generation (SOG) quantum yield of FONPs[Cp6] (1.3 μ M), Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) was added (4 μ L of a 5 mM solution in MeOH) to the solution of FONPs[Cp6] in PBS (2500 μ L, 1.3 μ M) in a quartz cuvette and irradiated by a 240 mW 405 nm LED at a distance of 11 cm, with up to 30 min of total illumination time. Fluorescence spectra of the solution were recorded each minute for the first 10 min, then every 5 min after. The control experiment was performed by irradiating the SOSG solution in the same conditions in the absence of FONPs[Cp6]. The SOSG fluorescence was red out at 534 nm after the irradiation at 405 nm to determine the samples' SOG. The samples' SOG was evaluated using the SOSG fluorescence enhancement and compared with the background of control sample.

3.4. In Vitro Photo-Irradiation Studies

3.4.1. Cell Lines

The two human colorectal cancer cell lines HT-29 and HCT116 used were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC-LGC Standards, Mosheim, France). HT-29 cells were grown in the DMEM medium while HCT116 were in the RPMI medium. Culture media was completed with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin [all reagents are from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France)]. The cultures were placed at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂.

3.4.2. FONPs[Cp6] Phototoxicity

The FONPs[Cp6] stock solution was prepared by dissolving 10 mg in 3 mL dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentrations were obtained by dilution in an appropriate culture medium for each cell line, the final percentage of DMSO in each condition being less than 0.1% in all cases. The PDT protocol proceeded for all experiments as follows: HT-29 cells were seeded at 2.1×10^4 , and HCT116 cells at 1.2×10^4 cells/cm². After 24 h, the cells were treated or not with FONPs[Cp6]. After 24 h post-treatment, the medium was replaced with a red phenol-free medium before being irradiated with a 650 nm lamp (Photocure and Cosmedico) as a light source at 75 J/cm² (38 mW/cm² during 32 min). The cell viability was then measured 24 h and 48 h after irradiation by normalizing to untreated conditions. The phototoxicity was examined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays.

4. Conclusions

The biocompatible fully organic soft FONPs are of great interest for solubilizing the hydrophobic biosourced photosensitizers Pp18/Cp6 in aqueous environments. Moreover, the resulting nanoparticles retain both the deep-red fluorescence of the photosensitizers in aqueous solutions and show an impressive singlet oxygen generation quantum yield in water (0.72). In addition, the present work showed that such formulation of PSs, while maintaining their photochemical properties, is effective as PDT agent against two types of colorectal cancer cells (HT-29 and HCT116) by producing 72% of singlet oxygen. In addition, thanks to its deep-red NIR fluorescence, this nanoformulation offers promises for theranostics and guided therapy. Based on these positive results, additional in vivo tests will be conducted on small animals.

Author Contributions: Conceptualization, M.B.-D., M.V. and V.S.; methodology, I.S., M.B.-D. and V.S.; validation, I.S., F.B., J.D., J.C., M.B.-D. and V.S.; formal analysis, J.D.; investigation, I.S., J.C., J.D., F.B., G.C. and R.C.; resources, J.D., M.B.-D., F.B. and V.S.; writing—original draft preparation, I.S., M.B.-D., F.B., G.C. and V.S.; writing—review and editing, M.B.-D., I.S., J.C., J.D. and V.S.; visualization, I.S., J.D., M.B.-D. and V.S.; supervision, M.B.-D. and V.S.; project administration, M.B.-D. and V.S.; funding acquisition, M.B.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is supported by Région Nouvelle Aquitaine (project NANOPHOT, convention AAPR2020-2019-8225810). This study received financial support from the French government in the framework of the University of Bordeaux's France 2030 program/RRI "IMPACT".

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: TEM was performed at the Bordeaux Imaging Center (UMS 3420 CNRS—University of Bordeaux/Inserm US4), a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, a member of the National Infrastructure France BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). The help of Sabrina Lacomme is acknowledged. We also thank the platform BISCEM (NMR, microscopy analysis. . .) from OmegaHealth Institut of Limoges University.

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

References

1. Hooper, J.K.; Sery, T.W.; Yamamoto, N. Photodynamic sensitizers from chlorophyll: Purpurin-18 and chlorin p6. *Photochem. Photobiol.* **1988**, *48*, 579–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Feng, X.; Shi, Y.; Xie, L.; Zhang, K.; Wang, X.; Liu, Q.; Wan, P. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of a Porphyrin-Based Photosensitizer and Its Isomer for Effective Photodynamic Therapy against Breast Cancer. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7189–7201. [[CrossRef](#)]
3. Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yano, S.; Hirohara, S.; Obata, M.; Hagiya, Y.; Ogura, S.; Ikeda, A.; Kataokae, H.; Tanaka, M.; Joh, T. Current states and future views in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2011**, *12*, 46–67. [[CrossRef](#)]
5. Moghissi, K.; Dixon, K.; Gibbins, S. A Surgical View of Photodynamic Therapy in Oncology: A Review. *Surg. J.* **2015**, *1*, e1. [[CrossRef](#)]

6. Newman, D.K. Photodynamic therapy: Current role in the treatment of chorioretinal conditions. *Eye* **2016**, *30*, 202–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhang, P.; Wu, M.X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. *Lasers Med. Sci* **2018**, *33*, 173–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. González-Delgado, J.A.; Kennedy, P.J.; Ferreira, M.; Tomé, J.P.C.; Sarmiento, B. Use of Photosensitizers in Semisolid Formulations for Microbial Photodynamic Inactivation. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4428–4442. [[CrossRef](#)]
9. Bartolomeu, M.; Neves, M.G.P.M.S.; Faustino, M.A.F.; Almeida, A. Wastewater chemical contaminants: Remediation by advanced oxidation processes. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 1573–1598. [[CrossRef](#)]
10. Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G.B.; Hamblin, M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers* **2011**, *3*, 2516–2539. [[CrossRef](#)]
11. Zhou, Z.; Song, J.; Nie, L.; Chen, X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6597–6626. [[CrossRef](#)]
12. Gorman, A.A.; Rodgers, M.A.J. New trends in photobiology: Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1992**, *14*, 159–176. [[CrossRef](#)]
13. Triesscheijn, M.; Baas, P.; Schellens, J.H.M.; Stewart, F.A. Photodynamic Therapy in Oncology. *Oncologist* **2006**, *11*, 1034–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hamblin, M.R. Fullerenes as photosensitizers in photodynamic therapy: Pros and cons. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 1515–1533. [[CrossRef](#)]
15. Lo, P.C.; Rodríguez-Morgade, M.S.; Pandey, R.K.; Ng, D.K.P.; Torres, T.; Dumoulin, F. The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitizers for photodynamic therapy of cancer. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 1041–1056. [[CrossRef](#)]
16. Garcia-Sampedro, A.; Tabero, A.; Mahamed, I.; Acedo, P. Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23*, 11–27. [[CrossRef](#)]
17. Zhang, Y.; Lovell, J.F. Porphyrins as Theranostic Agents from Prehistoric to Modern Times. *Theranostics* **2012**, *2*, 905–915. [[CrossRef](#)]
18. Aggarwal, A.; Samaroo, D.; Radivojevic Jovanovic, I.; Singh, S.; Tuz, M.P.; Rampersad Mackiewicz, M. Porphyrinoid-based photosensitizers for diagnostic and therapeutic applications: An update. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23*, 729–765. [[CrossRef](#)]
19. O'Connor, A.E.; Gallagher, W.M.; Byrne, A.T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1053–1074. [[CrossRef](#)]
20. Tanielian, C.; Schweitzer, C.; Mechin, R.; Wolff, C. Quantum yield of singlet oxygen production by monomeric and aggregated forms of hematoporphyrin. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 208–212. [[CrossRef](#)]
21. Singh, S.; Aggarwal, A.; Dinesh, N.V.S.; Bhupathiraju, K.; Arianna, G.; Tiwari, K.; Drain, C.M. Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids for Diagnostics and Therapeutics. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10261–10306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lupu, M.; Maillard, P.; Mispelter, J.; Poyer, F.; Thomas, C.D. A glycoporphyrin story: From chemistry to PDT treatment of cancer mouse models. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 1599–1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gaware, V.S.; Håkerud, M.; Leósson, K.; Jónsdóttir, S.; Høgset, A.; Berg, K.; Másson, M. Tetraphenylporphyrin Tethered Chitosan Based Carriers for Photochemical Transfection. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 807–819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sibirian-Vazquez, M.; Jensen, T.J.; Hammer, R.P.; Vicente, M.G.H. Peptide-Mediated Cell Transport of Water Soluble Porphyrin Conjugates. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1364–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sibirian-Vazquez, M.; Jensen, T.J.; Vicente, M.G.H. Synthesis, characterization, and metabolic stability of porphyrin-peptide conjugates bearing bifunctional signaling sequences. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2915–2923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Stallivieri, A. Synthèse de Systèmes à Base de Photosensibilisateurs Pour l'amélioration de la Sélectivité Tumorale en Thérapie Photodynamique. Médecine Humaine et Pathologie. Ph.D. Thesis, Université de Lorraine, Nancy, Français, 2015.
27. Fernandes, S.R.G.; Fernandes, R.; Sarmiento, B.P.; Pereira, M.R.; Tomé, J.P.C. Photoimmunoconjugates: Novel synthetic strategies to target and treat cancer by photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 2579–2593. [[CrossRef](#)]
28. Bruce, G.; Samperi, M.; Amabilino, D.B.; Duch, M.; Plaza, J.A.; Pérez-García, L. Singlet oxygen generation from porphyrin-functionalized hexahedral polysilicon microparticles. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23*, 223–233. [[CrossRef](#)]
29. Voskuhl, J.; Kauscher, U.; Gruener, M.; Frisch, H.; Wibbeling, B.; Strassert, C.A.; Ravoo, B.J. A soft supramolecular carrier with enhanced singlet oxygen photosensitizing properties. *Soft Matter* **2013**, *9*, 2453–2457. [[CrossRef](#)]
30. Rossi, L.M.; Silva, P.R.; Vono, L.L.R.; Fernandes, A.U.; Tada, D.B.; Baptista, M.S. Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. *Langmuir* **2008**, *24*, 12534–12538. [[CrossRef](#)]
31. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373–2387. [[CrossRef](#)]
32. Lucky, S.S.; Soo, K.C.; Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1990–2042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Li, W.-P.; Yen, C.-J.; Wu, B.-S.; Wong, T.-W. Recent Advances in Photodynamic Therapy for Deep-Seated Tumors with the Aid of Nanomedicine. *Biomedicines* **2021**, *9*, 69–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Campos, E.V.R.; del Pilar Rodriguez-Torres, M.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Han, K.; Maa, Z.; Han, H. Functional peptide-based nanoparticles for photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 25–38. [[CrossRef](#)]
36. Swierczewska, M.; Han, H.S.; Kim, K.; Park, J.H.H.; Lee, S. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 70–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Md, S.; Haque, S.; Madheswaran, T.; Zeeshan, F.; Srikanth Meka, V.; Radhakrishnan, A.K.; Kesharwani, P. Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 1274–1283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Daniel, J.; Montaleytang, M.; Nagarajan, S.; Picard, S.; Clermont, G.; Lazar, A.N.; Dumas, N.; Correard, F.; Braguer, D.; Blanchard-Desce, M.; et al. Hydrophilic Fluorescent Nanoprodrug of Paclitaxel for Glioblastoma Chemotherapy. *ACS Omega* **2019**, *4*, 18342–18354. [[CrossRef](#)]
39. Sasaki, I.; Daniel, J.; Marais, S.; Clermont, G.; Verlhac, J.B.; Vaultier, M.; Blanchard-Desce, M. Soft fluorescent organic nanodots as nanocarriers for porphyrins. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23*, 1463–1469. [[CrossRef](#)]
40. Wilkinson, F.; Helman, W.P.; Ross, A.B. Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, *22*, 113–262. [[CrossRef](#)]
41. Pavličková, V.; Škubník, J.; Jurášek, M.; Rimpelová, S. Advances in Purpurin 18 Research: On Cancer Therapy. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 2254. [[CrossRef](#)]
42. Drogat, N.; Gady, C.; Granet, R.; Sol, V. Design and Synthesis of Water-Soluble Polyaminated Chlorins and Bacteriochlorins—With near-Infrared Absorption. *Dyes Pigments* **2013**, *98*, 609–614. [[CrossRef](#)]
43. Meng, Z.; Yu, B.; Han, G.; Liu, M.; Shan, B.; Dong, G.; Miao, Z.; Jia, N.; Tan, Z.; Li, B.; et al. Chlorin P6-Based Water-Soluble Amino Acid Derivatives as Potent Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4999–5010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhang, X.; Meng, Z.; Ma, Z.; Liu, J.; Han, G.; Ma, F.; Jia, N.; Miao, Z.; Zhang, W.; Sheng, C.; et al. Design and Synthesis of Novel Water-Soluble Amino Acid Derivatives of Chlorin P6 Ethers as Photosensitizer. *Chin. Chem. Lett.* **2019**, *3*, 247–249. [[CrossRef](#)]
45. Begum, G.; Dube, A.; Joshi, P.G.; Gupta, P.K.; Joshi, N.B. Chlorin P6 Preferentially Localizes in Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus and Inhibits Ca²⁺ Release from Intracellular Store. *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *95*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sharma, M.; Sahu, K.; Dube, A.; Gupta, P.K. Extracellular pH Influences the Mode of Cell Death in Human Colon Adenocarcinoma Cells Subjected to Photodynamic Treatment with Chlorin P6. *J. Photochem. Photobiol. B* **2005**, *81*, 107–113. [[CrossRef](#)]
47. Castro, K.A.D.F.; Moura, N.M.M.; Simoes, M.M.Q.; Mesquita, M.M.Q.; Ramos, L.C.B.; Biazotto, J.C.; Canaleiro, J.A.S.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; da Silva, R.S. A Comparative Evaluation of the Photosensitizing efficiency of Porphyrins, Chlorins and Isobacteriochlorins toward Melanoma Cancer Cells. *Molecules* **2023**, *28*, 4716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Yeo, S.; Song, H.H.; Kim, M.J.; Hong, S.; Yoon, I.; Lee, W.K. Synthesis and Design of Purpurin-18-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improved Anticancer Efficiency of Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1064. [[CrossRef](#)]
49. Drogat, N.; Granet, R.; Le Morvan, C.; Bégau-Grimaud, G.; Krausz, P.; Sol, V. Chlorin-PEI-Labeled Cellulose Nanocrystals: Synthesis, Characterization and Potential Application in PDT. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3648–3652. [[CrossRef](#)]
50. Uppal, A.; Jain, B.; Swami, M.K.; Patel, H.S.; Dube, A.; Gupta, P.K.; Das, K. Evaluation of Photodynamic Efficacy of Chlorin p 6 Bound to Amine-Modified Silica Nanoparticles in Colon and Oral Cancer Cell Lines. *BioNanoSci* **2014**, *4*, 85–91. [[CrossRef](#)]
51. Pang, X.; Xiao, Q.; Cheng, Y.; Ren, E.; Lian, L.; Zhang, Y.; Gao, H.; Wang, X.; Leung, W.; Chen, X.; et al. Bacteria-Responsive Nanoliposomes as Smart Sonotheranostics for Multidrug Resistant Bacterial Infections. *ACS Nano* **2019**, *13*, 2427–2438. [[CrossRef](#)]
52. Song, Y.; Zhu, S.; Zhang, S.; Fu, Y.; Wang, L.; Zhao, X.; Yang, B. Investigation from Chemical Structure to Photoluminescent Mechanism: A Type of Carbon Dots from the Pyrolysis of Citric Acid and an Amine. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3*, 5976–5984. [[CrossRef](#)]
53. Ragàs, X.; Jiménez-Banzo, A.; Sanchez-García, D.; Batllori, X.; Nonell, S. Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green[®]. *Chem. Commun.* **2009**, *28*, 2920–2922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Redmond, R.W.; Gamlin, J.N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 391–475. [[CrossRef](#)]
55. Bouramtane, S.; Bretin, L.; Pinon, A.; Leger, D.; Liagre, B.; Richard, L.; Brégier, F.; Sol, V.; Chaleix, V. Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 168–175. [[CrossRef](#)]
56. Bouramtane, S.; Bretin, L.; Pinon, A.; Leger, D.; Liagre, B.; Da Silva Perez, D.; Launay, Y.; Brégier, F.; Sol, V.; Chaleix, V. Acetylxylan-pheophorbide—A nanoparticles designed for tumor-targeted photodynamic therapy. *J. Appl. Polym. Sci.* **2020**, *138*, e50799. [[CrossRef](#)]
57. Drogat, N.; Barrière, M.; Granet, R.; Sol, V.; Krausz, P. High Yield Preparation of Purpurin-18 from Spirulina Maxima. *Dyes Pigments* **2011**, *88*, 125–127. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

VII.1. Application des FONPs[Cp6] dans le traitement du CCR

VII.1.2. Article 2

Activity of Hydrophilic, Biocompatible, Fluorescent, Organic Nanoparticles Functionalized with Purpurin-18 in Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer

Rayan Chkair, Justine Couvez, Frédérique Brégier, Mona Diab-Assaf, Vincent Sol,
Mireille Blanchard-Desce, Bertrand Liagre and Guillaume Chemin

Nanomaterials 2024, 14, 1557. <https://doi.org/10.3390/nano14191557>

Les FONP[Cp6] ont montré une forte phototoxicité *in vitro* contre deux lignées cellulaires de CRC, HCT116 et HT-29, après illumination à 650 nm. En effet, nos résultats précédents ont démontré le potentiel photodynamique de ces nouvelles nanoparticules avec des IC₅₀ de 0,04 et 0,13 nmol/mL pour les lignées cellulaires HCT116 et HT-29, respectivement (**article 1**). Sur la base des résultats prometteurs de l'**article 1**, l'**article 2** vise à étudier les mécanismes de mort cellulaire médiés par les FONP[Cp6] après illumination et qui contribuent aux effets anticancéreux.

Nos résultats n'ont montré aucune réduction significative de la viabilité cellulaire lorsque les FONPs (seules sans PS) ont été exposées à la lumière ou conservées à l'obscurité, et cela même à une concentration de 100 µg/mL dans les deux lignées cellulaires. Ces résultats complètent les résultats précédents concernant l'absence de cytotoxicité à l'obscurité des FONP[Cp6]. Il est intéressant de noter que les FONPs[Cp6] ont montré une internalisation préférentielle dans les lignées cellulaires du CCR en comparaison aux cellules non-cancéreuses HEK-293. En outre, l'analyse par microscopie confocale a confirmé que les FONP[Cp6] étaient localisées dans les mitochondries, les lysosomes et le RE, qui sont les cibles souhaitées pour la PDT. Nous avons également montré que les FONP[Cp6] présentent une forte activité photodynamique par la génération d'ERO, avec 85,7 % et 72,6 % de production d'ERO dans les lignées cellulaires HCT116 et HT-29, respectivement. Etant localisée dans les mitochondries, la photoactivation des FONP[Cp6] induit la génération d'ERO qui endommagent la membrane mitochondriale, suivie d'une augmentation du ratio Bax/Bcl-2, conduisant à l'activation ultérieure de la caspase-9. Une fois activée, la caspase-9 clive et active les caspases 3 et 7, ce qui entraîne le clivage de PARP-1 et la fragmentation de l'ADN. On a montré par ces résultats une induction d'apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale. Les preuves accumulées suggèrent que l'autophagie est déclenchée après la PDT en raison de la production des ERO. Donc, pour compléter cette étude, l'analyse des acteurs de l'autophagie à différentes étapes a été réalisée (résultats supplémentaires de l'**article 2**). Les résultats montrent que la photoactivation des FONPs[Cp6] entraîne une induction de l'autophagie dans les deux lignées de CCR, montrée par une forte conversion du LC3.

L'ensemble des résultats *in vitro* démontre l'efficacité anticancéreuse intéressante de cette nano-formulation contre le CCR. Pour poursuivre cette étude, l'utilisation de modèles en 3D a été entreprise et sera présentée dans la suite de ce manuscrit. Dans un second temps, des expérimentations *in vivo* (sur un modèle de xénogreffe sous-cutanée du CCR) permettront de valider nos résultats.

Article

Activity of Hydrophilic, Biocompatible, Fluorescent, Organic Nanoparticles Functionalized with Purpurin-18 in Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer

Rayan Chkair ¹, Justine Couvez ², Frédérique Brégier ¹, Mona Diab-Assaf ³, Vincent Sol ¹, Mireille Blanchard-Desce ^{2,*}, Bertrand Liagre ¹ and Guillaume Chemin ^{1,*}

¹ University Limoges, LABCiS, UR 22722, 87000 Limoges, France; rayan.chkair@unilim.fr (R.C.); frederique.bregier@unilim.fr (F.B.); vincent.sol@unilim.fr (V.S.); bertrand.liagre@unilim.fr (B.L.)

² University Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, ISM (UMR5255), Bat A12, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France; justine.couvez@u-bordeaux.fr

³ Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Hadath, Beirut 21219, Lebanon; mdiabassaf@ul.edu.lb

* Correspondence: mireille.blanchard-desce@u-bordeaux.fr (M.B.-D.); guillaume.chemin@unilim.fr (G.C.)

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is a clinically approved, non-invasive therapy currently used for several solid tumors, triggering cell death through the generation of reactive oxygen species (ROS). However, the hydrophobic nature of most of the photosensitizers used, such as chlorins, limits the overall effectiveness of PDT. To address this limitation, the use of nanocarriers seems to be a powerful approach. From this perspective, we have recently developed water-soluble and biocompatible, fluorescent, organic nanoparticles (FONPs) functionalized with purpurin-18 and its derivative, chlorin p6 (Cp6), as new PDT agents. In this study, we aimed to investigate the induced cell death mechanism mediated by these functionalized nanoparticles after PDT photoactivation. Our results show strong phototoxic effects of the FONPs[Cp6], mediated by intracellular ROS generation, and subcellular localization in HCT116 and HT-29 human colorectal cancer (CRC) cells. Additionally, we proved that, post-PDT, the FONPs[Cp6] induce apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway, as shown by the significant upregulation of the Bax/Bcl-2 ratio, the activation of caspases 9, 3, and 7, leading poly-ADP-ribose polymerase (PARP-1) cleavage, and DNA fragmentation. Our work demonstrates the photodynamic activity of these nanoparticles, making them promising candidates for the PDT treatment of CRC.

Keywords: colorectal cancer; photodynamic therapy; purpurin-18; nanocarriers; FONPs; apoptosis



Citation: Chkair, R.; Couvez, J.; Brégier, F.; Diab-Assaf, M.; Sol, V.; Blanchard-Desce, M.; Liagre, B.; Chemin, G. Activity of Hydrophilic, Biocompatible, Fluorescent, Organic Nanoparticles Functionalized with Purpurin-18 in Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer. *Nanomaterials* **2024**, *14*, 1557. <https://doi.org/10.3390/nano14191557>

Academic Editor: James Chow

Received: 15 August 2024

Revised: 14 September 2024

Accepted: 19 September 2024

Published: 26 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent malignancies worldwide, ranking second in terms of cancer-related deaths and third in terms of incidence in 2022, according to the World Health Organization (WHO). By 2035, it is estimated that CRC incidence will increase by 80%, resulting in approximately 2.4 million cases and 1.3 million deaths globally [1,2]. Once diagnosed, cancer patients receive several treatment modalities, alone or in combination, depending on the stage and location of the tumor. Conventional therapies that are commonly used include surgery, radiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy. These therapies are very effective in the early stages, but their efficacy becomes very limited in the later stages. Besides this limitation, conventional treatment is often associated with severe side effects, cancer recurrence, and resistance [3]. Hence, it has become vital to develop new therapeutic strategies that selectively target tumor sites while improving patients' quality of life.

Photodynamic therapy (PDT) has emerged as a potential localized treatment, showing promising outcomes with solid tumors (such as gastrointestinal, prostate, and bladder

cancers) [4,5], with improved tumor selectivity and minimal adverse effects compared to conventional cancer therapies [6]. Moreover, phase I and II clinical trials showed the clinical efficacy of PDT in CRC as a successful approach [7]. The mechanism of action relies on the dynamic interaction between three non-toxic components: a photosensitizer (PS), light with a suitable wavelength that activates the PS, and molecular oxygen. Once administered, the PS preferentially accumulates within the tumor and converts from its ground state (PS_0) to an excited singlet state (PS_1), under tumor illumination. The latter is unstable: it can return to the ground state by fluorescence emission or generate heat via internal conversion. However, this excited state can generate a more stable excited triplet state (T_1) through an intersystem crossing. By this triplet state, the PS can undergo two kinds of photochemical reactions, leading to the production of reactive oxygen species (ROS), which are highly reactive and can damage biomolecules, triggering PDT-induced cancer cell death. In the case of type I reactions, the triplet state reacts with the cellular compounds by electron transfer, producing free radicals that, in the presence of molecular oxygen, generate hydroxyl radical ($\bullet OH$), superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$), and hydrogen peroxide (H_2O_2). On the other hand, the type II reactions occur when the triplet state interacts directly with the molecular oxygen, resulting in singlet oxygen (1O_2) generation [8].

Like any therapeutic option, PDT presents some limitations, such as the hydrophobicity of most of the traditional PSs used in the literature, PS aggregation occurring in biological environments, and selective cellular uptake [6]. These factors reduce the PDT's clinical efficiency, limiting its overall therapeutic potential. To address these limitations, and thanks to the development of nanotechnology, especially in the context of CRC treatment, PS delivery efficiency may be improved by the encapsulation of the PS within nanoparticles (NPs), providing enhanced water solubility, tumor selectivity through passive or active approaches, and the reduction of toxic effects [7,9]. For this purpose, a wide range of nanocarriers were used in the literature, mainly categorized into organic and inorganic NPs [10,11]. The main advantage of organic NPs is their high biocompatibility, as they can be easily modified to control their physical and chemical characteristics [12]. Overall, the preclinical studies demonstrate the benefits of using nano-encapsulated PSs in the CRC model [7,13,14].

Among chlorins, purpurin-18 (Pp-18), is one of the most commonly used PSs in the literature. With an absorption maximum of 700 nm and a high singlet oxygen quantum yield, Pp-18 has been shown as a strong inducer of PDT-mediated cell death [15–17]. However, its clinical application is limited due to its high hydrophobicity. Thanks to its chemical structure that offers the possibility of different structural modifications, several approaches have been reported to improve its physicochemical properties, such as conjugation with peptides [18], gold nanoparticles [19], polyethylene glycol (PEG) [20], and sugars [21]. In addition, targeted nanoparticles as drug delivery systems has become one of the most promising strategies for CRC cancer therapy [22].

In this context, we have recently developed a new nano-formulation, based on dedicated soft fluorescent organic nanoparticles (FONPs) as nanocarriers of Pp-18 and its derivative chlorin p6 (Cp6). The functionalized FONPs, hereafter referred to as FONPs[Cp6], represent potential biocompatible nanoparticles for PDT treatment in CRC [23]. We stress that targeted nanoparticles The FONPs were prepared from an equimolar mixture of citric acid and diethylenetriamine (DETA) via polycondensation reactions using precise synthesis protocols (Scheme S1). The dehydration can be achieved either by heating a water solution under microwave activation [24] or by the dry heating of the diethylenetriammonium citrate salt at 200 °C [23]. Importantly, controlled reaction conditions need to be implemented to avoid the carbonization and formation of the graphitic region. As a result, the FONPs had dry diameters of approximately 10–15 nm (Figure S1) and showed high water-solubility (>200 g/L) and biocompatibility [23]. Aqueous FONP solutions strongly absorb in the near UV-region ($\lambda_{abs}^{max} = 360$ nm) and generate bright blue fluorescence under excitation due to an endogenous chromophore formed during the condensation process [23,24]. The FONPs showed a large number of CO_2H and NH_2 surface groups, which were responsible for

their high-water solubility. These groups are of major interest for further functionalization using standard conjugation reactions. In order to implement such conjugations, the FONPs were activated either (i) with succinic acid [24], leading to organic nanoparticles enriched in CO₂H surface groups, or (ii) with ethylene diamine [23] leading to organic nanoparticles enriched NH₂ surface groups. In particular, the reaction of the latter with Pp18 resulted in the FONPs[Cp6] having a total PS loading (i.e., Cp6+ Pp18) of approximately 35 μmol.g⁻¹. These nanoparticles retained good water solubility and showed the characteristic absorption bands of Cp6 and Pp18 in the visible region (Figure S2), with peaks at 420 nm (Soret Band), 500 nm, 560 nm, 660 nm, and 710 nm (Q bands). Interestingly, the FONPs[Cp6] showed deep-red emissions upon excitation in the visible region, as well as weak NIR emissions when excited at 720 nm (Figure S3). Moreover, the FONPs[Cp6] exhibited a high singlet oxygen generation quantum yield in aqueous media (0.72 upon excitation at 405 nm) [23].

The FONPs[Cp6] were found to show a strong *in vitro* phototoxicity against two CRC cell lines, HCT116 and HT-29, after illumination at 650 nm. Indeed, our previous results demonstrated the PDT potential of these new NPs with half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of 0.04 and 0.13 nmol/mL for the HCT116 and HT-29 CRC cell lines, respectively [23].

Based on these promising results, the present study aimed to investigate the cell death mechanism mediated by these FONPs. First, we showed an excellent safety profile of the FONPs against human CRC cell lines, HCT116 and HT-29. Then, we demonstrated that the intracellular accumulation and the subcellular localization of the FONPs[Cp6] induced a strong anticancer efficacy through ROS production. Consistent with other *in vitro* PDT studies, we validated that once photoactivated, the FONPs[Cp6] induced apoptosis via the intrinsic pathway.

2. Results

2.1. *In Vitro* Safety of FONPs

Our previous study demonstrated the *in vitro* phototoxicity of FONPs functionalized with Pp18 and its derivative Cp6 (FONPs[Cp6]) [23], so we aimed first to investigate the FONPs safety as drug delivery nanocarriers in human CRC cell lines, HCT116 and HT-29. For this aim, the cells were treated with the FONPs at 1 to 100 μg/mL concentrations. Then, the cells were exposed to red light (650 nm), and the phototoxic effects were monitored for 48 h post-illumination using an MTT assay. Our results showed no significant reduction in cell viability when the FONPs were exposed to light or kept in the dark, even at a concentration of 100 μg/mL in both cell lines (Figure 1). These results further complement the previous findings of the absence of the dark cytotoxicity of the FONPs[Cp6], suggesting the good safety of the FONPs in human CRC cell lines.

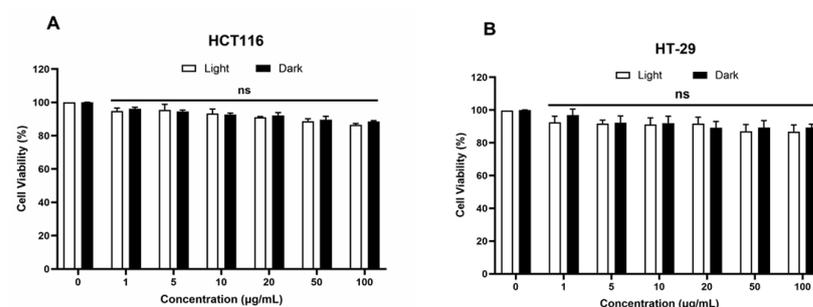


Figure 1. Phototoxic effects of FONPs on human CRC cell lines. HCT116 (A), and HT-29 (B) cells were seeded in 96-well plates for 24 h, then cells were treated or not with FONPs at different concentrations for 24 h. Cells were illuminated or not with red light (650 nm, 38 mW/cm²). The cytotoxic effects were then monitored 48 h following illumination by MTT assay. Data are shown as mean ± SEM (n = 3); ns: not significant relative to the control group.

2.2. Cellular Internalization and Localization of FONPs[Cp6]

For confocal microscopy analyses, the HCT116 and HT-29 CRC cell lines were treated with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations already calculated: 1.40 and 3.86 µg/mL for the HCT116 and HT-29 cells, respectively, (corresponding to 0.04 nmol/mL and 0.13 nmol/mL of active PSs, respectively). The FONPs[Cp6] exhibited a deep-red or infrared NIR fluorescence [23], so their cellular uptake could be monitored by confocal microscopy when excited typically at 520 nm. The red fluorescence observed in the cytoplasm of the HCT116 and HT-29 CRC cells indicated the cellular internalization of the NPs in both of the cell lines (Figure 2 and Figure S5). Interestingly, compared to the noncancerous cell line HEK-293, we observed higher cellular accumulation within the HCT116 and HT-29 CRC cells, with a negligible uptake in HEK-293 cells, even at 10 µg/mL (Figure 2C). These results show that our NPs were preferentially internalized into CRC cells.

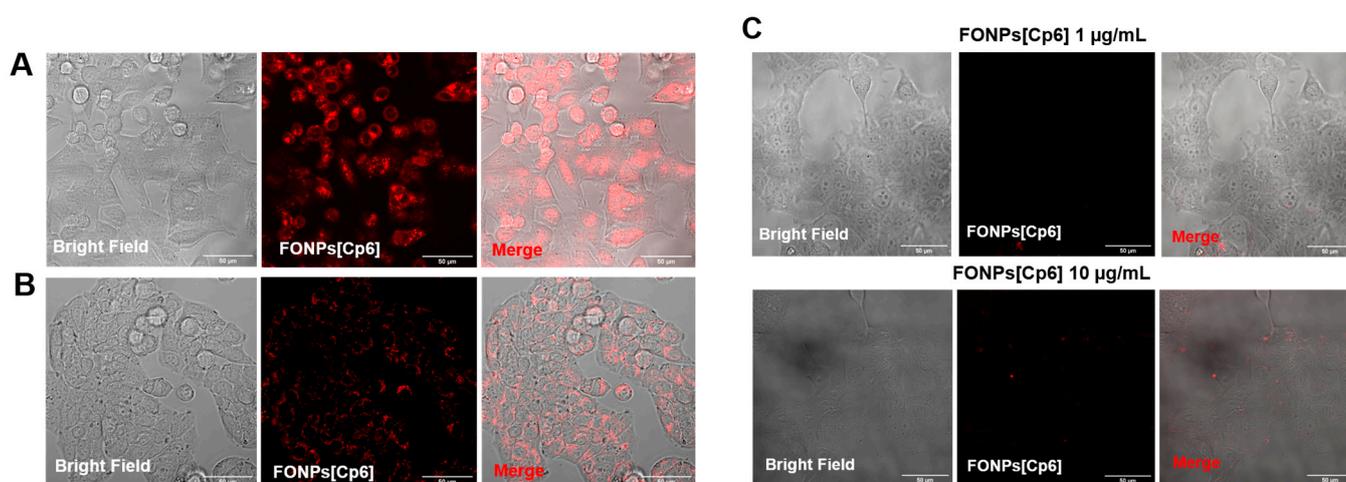


Figure 2. Cellular internalization of FONPs[Cp6] on HCT116 (A), HT-29 (B), and HEK-293 (C) cell lines. Cells were grown for 24 h in chamber slides coated with a type I collagen (3 mg/mL) with acetic acid (20 mM) gel. Cells were then treated with FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations for HCT116 and HT-29 and 1 or 10 µg/mL for HEK-293 cells. After 24 h, red fluorescence was assessed by confocal microscopy (Zeiss LSM880 confocal microscope/Jena, Germany). Co-localization was analyzed using the ImageJ software. White scale bars represent 50 µm.

PDT-induced cell death depends on the intracellular localization of the PS. Thus, after confirming the cellular uptake, we looked to determine the subcellular localization of the FONPs[Cp6] in the CRC cells. For this aim, the cells were co-treated with MitoTracker, LysoTracker, or Endoplasmic Reticulum-Tracker (ER-Tracker) organelle probes. The confocal fluorescence images in Figure 3 showed that the FONPs[Cp6] were distributed in all organelles, including the mitochondria, lysosomes, and ER (as indicated by yellow fluorescence in merged images), demonstrating the co-localization of the FONPs[Cp6] in both of the cell lines.

2.3. ROS Generation

The PDT-induced cell death mechanism involves intracellular ROS generation. Therefore, ROS levels were quantified using DCFDA staining after PDT illumination. Flow cytometry analyses revealed that the photoactivation of the FONPs[Cp6] enhanced cellular ROS generation in both cell lines (Figure 4A,B). Moreover, our results showed a greater ROS production, with 85.7% of positive gated in the HCT116 CRC cells compared to 72.6% in the HT-29 CRC cells (Figure 4C). In both the cell lines, the FONPs[Cp6] induced a limited ROS generation in the dark, with 9% and 6.4% of positive gated in the HCT116 and the HT-29 CRC cells, respectively.

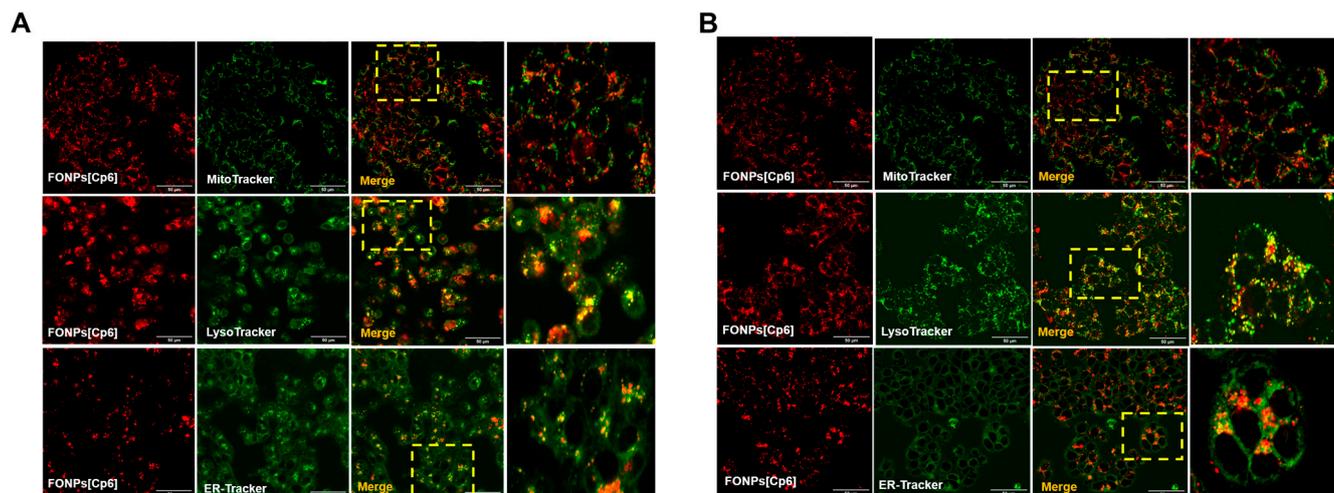


Figure 3. Cellular localization of FONPs[Cp6] on HCT116 (A) and HT-29 (B) CRC cell lines. Cells were seeded in chamber slides for 24 h prior to exposure to FONPs[Cp6] at IC_{50} concentrations. After 24 h, cells were co-treated with MitoTracker, LysoTracker, or ER-Tracker organelle probes. The images on the right of each panel correspond to the zoomed-in merged images (yellow box). Localization was determined by confocal microscopy, and co-localization was assessed using the ImageJ software. Scale bar = 50 μ m.

These results were further confirmed by confocal microscopy, using the DCFDA as an ROS indicator. The confocal fluorescence images indicated a strong green fluorescence within the cells after the photoactivation of the FONPs[Cp6] compared to the control in both the cell lines (Figure 4D,E). Similarly, the HCT116 CRC cells showed an increased green fluorescence compared to the HT-29 CRC cells, demonstrating an enhanced ROS generation in the HCT116 CRC cells. Together, these data demonstrate that the photoactivation of the FONPs[Cp6] induces intracellular ROS generation in both the CRC cell lines.

2.4. Apoptotic Cell Death Induction

In order to investigate the cell death mechanism induced by the FONPs[Cp6], Annexin V-FITC and PI dual staining were performed to assess the level of apoptosis 24 and 48 h post-illumination by flow cytometry. The early apoptotic cells could only retain Annexin V-FITC and were placed in the lower right quadrant. However, due to increased cell permeability, the late apoptotic cells could retain Annexin V-FITC and PI and were placed in the upper right quadrant. As shown in Figure 5A,C, in the HCT116 CRC cells, the control, light control, and the FONPs[Cp6] exhibited high cellular viabilities of 86.97%, 86.47%, and 85.00%, respectively, at 24 h. Similarly, 85.60%, 85.46%, and 84.43% of the population of the HCT116 CRC cells were viable after exposure to the control, light control, and the FONPs[Cp6], respectively, at 48 h. However, 24 h after the FONPs[Cp6] photoactivation, the rate of early and late apoptosis both increased significantly to 46.23%, while the percentage of viable cells decreased to 47.83%. Importantly, 48 h post-PDT, the rate of apoptosis continued to rise to 69.94%, with only 25.50% being viable cells. Similar results were observed with the HT-29 CRC cells: 85.20%, 85.68%, and 83.49% of the cell population were viable after exposure to the control, light control, and the FONPs[Cp6], respectively, at 24 h. After 48 h, 86.97%, 85.18%, and 84.75% of the control, light control, and the FONPs[Cp6], respectively, remained mostly viable. Twenty-four hours after illumination, the FONPs[Cp6] induced a significant increase in the rate of apoptosis to 28.01%, with 64.45% being viable cells. Moreover, after 48 h of photoactivation, the rate of apoptosis increased further to reach 60.19%, while the percentage of viable cells decreased to 36.48% (Figure 5B,D). Together, these findings provide evidence that the photoactivation of the FONPs[Cp6] induces a significant increase in the rate of early and late apoptosis, thus confirming that apoptosis was one of the major induced cell death mechanisms.

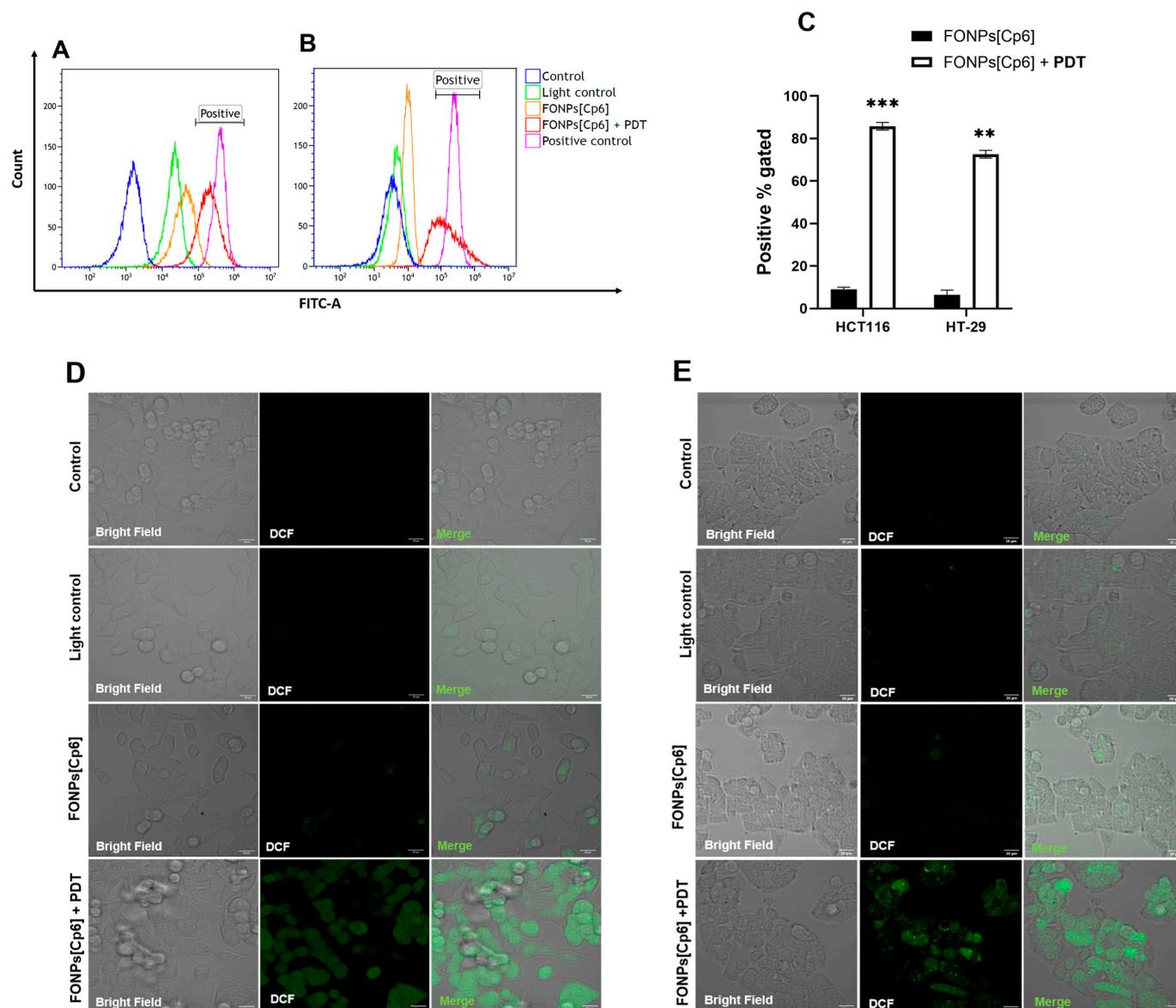


Figure 4. ROS generation by the FONPs[Cp6] in HCT116 (A,C,D) and HT-29 (B,C,E) CRC cell lines. For all experiments, cells were grown for 24 h. Then, cells were treated with the FONPs[Cp6] at IC_{50} concentrations and illuminated or not. Intracellular ROS generation was quantified by flow cytometry using DCFDA staining directly after PDT. An increased fluorescence intensity, resulting from increased 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) formation, causes a shift to the right. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was used as a positive control (A,B). Results of flow cytometry analyses are shown in (C). The confocal microscopy images of DCFDA-labeled HCT116 (D) and HT-29 (E) CRC cells were captured immediately after PDT illumination. Scale bar = 20 μm . Data are represented as mean \pm SEM (n = 3). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, relative to the control.

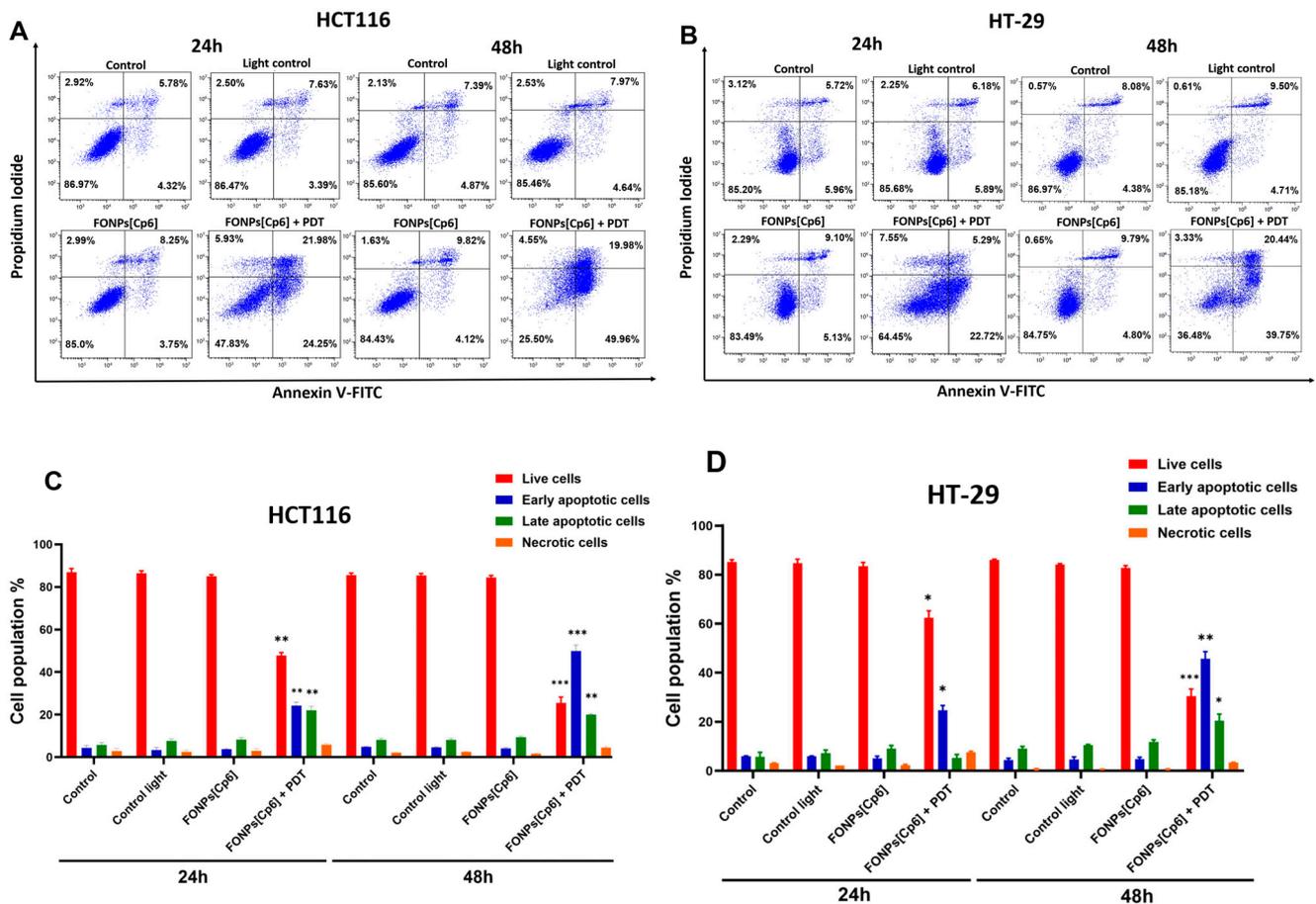


Figure 5. Apoptosis effects of the FONPs[Cp6] on HCT116 (A,C) and HT-29 (B,D) CRC cells. Cells were grown 24 h before exposure or not to the FONPs[Cp6] at IC_{50} concentrations. Then, cells were illuminated or not. Twenty-four and forty-eight hours after PDT illumination, cells were stained with Annexin V-FITC and PI, and cell apoptosis was measured by flow cytometry. (A,B) The results are represented in a scatter plot as four quadrants: living (lower left), early apoptotic (lower right), late apoptotic (upper right), and necrotic (upper left) cells. (C,D) The percentage of each cell population is expressed as mean \pm SEM ($n = 3$). A t -test was used to compare each population in the treated group to its corresponding population in the control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, relative to the control.

2.5. PDT-Induced Apoptosis Mechanism

Caspases are known for their crucial role in the initiation and execution of apoptosis. Hence, to confirm the apoptotic cell death mechanism observed after the photoactivation of the FONPs[Cp6], the level of the caspases-3/7 activity, the main apoptosis executioner, was measured using the Incucyte S3 live-cell imaging system. For this purpose, the cells were labeled with caspases-3/7 green reagent immediately after PDT, and their fluorescence was monitored for 48 h. As observed in Figure 6A, the photoactivation of the FONPs[Cp6] in the HCT116 CRC cells induced a significant increase in the percentage of activated caspases-3/7 in a time-dependent manner, with 86.6% compared to 6.1% in the light control, at 48 h post-illumination. Similar results were obtained with the HT-29 CR+C cells, with a significant increase in caspase-3/7 activity level to 68.5%, compared to 9.6% in the light control (Figure 6B).

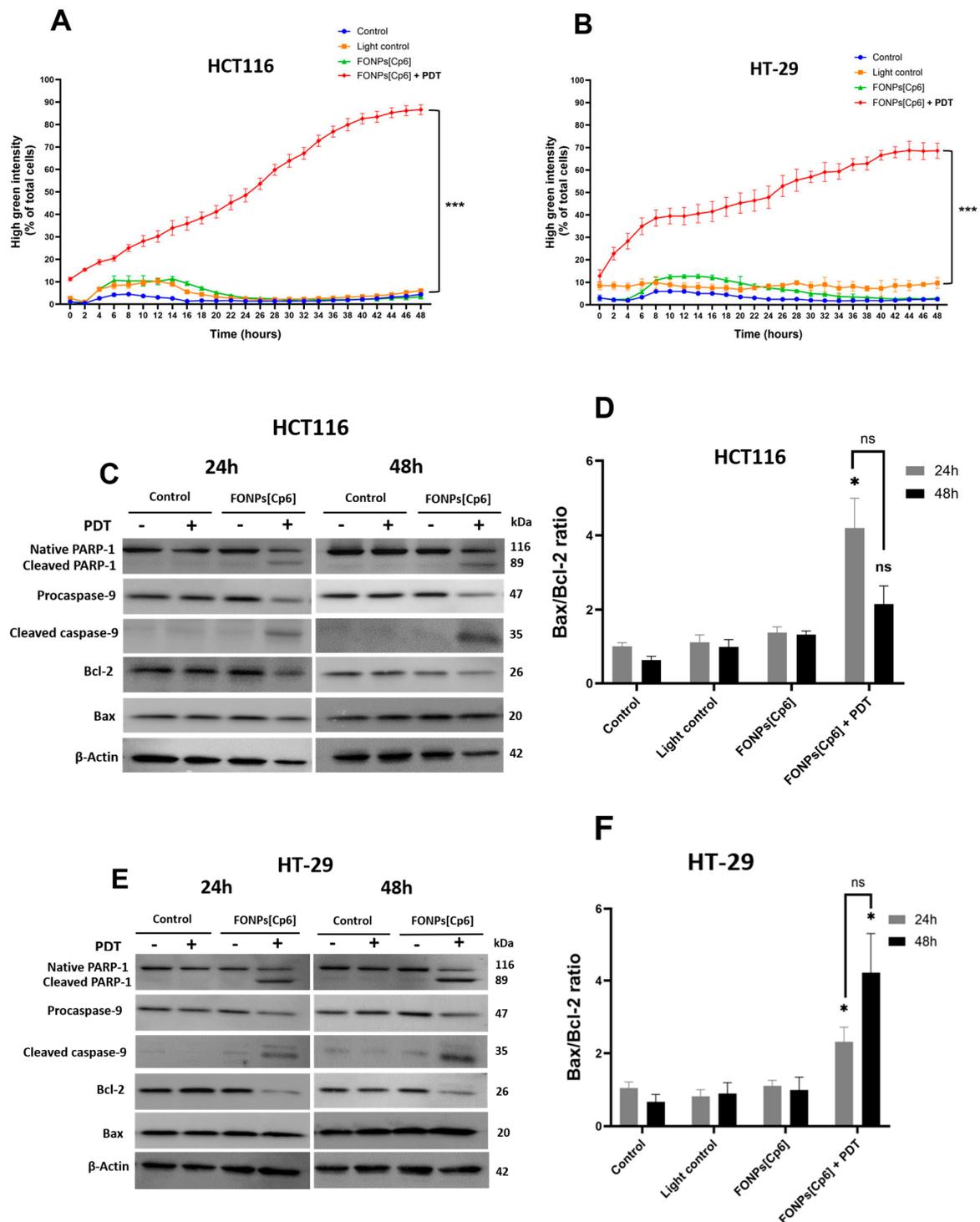


Figure 6. Effects of photoactivation of the FONPs[Cp6] on caspases-3/7 activity and protein expression in HCT116 (A,C,D) and HT-29 (B,E,F) CRC cells. Cells were cultured for 24 h, then treated with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations for 24 h, then illuminated. (A,B) Quantification of caspases-3/7 activity. Directly after PDT of cells co-treated with caspases-3/7 green reagent, fluorescence over time was monitored by Incucyte S3 live-cell imaging system. The ratio of green fluorescent cells to total cells was quantified using IncuCyte software version 2023A Rev1). (C–F) The expression of the key apoptotic proteins was assessed by western blotting 24 and 48 h after illumination. β -actin served as a loading control. Bands were quantified by densitometry using ImageJ software, and the Bax/Bcl-2 ratio was then calculated relative to β -actin. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, relative to the control; ns: not significant.

To further confirm the apoptotic cell death, we conducted western blotting to assess the protein expression of key apoptotic-related markers. We focused mainly on poly-ADP-ribose polymerase (PARP-1), which is a substrate of caspase-3, caspase-9 (initiator caspase), Bax (pro-apoptotic), and Bcl-2 (anti-apoptotic) protein expression, 24 and 48 h following photoactivation. In the HCT116 CRC cells, our results show that the photoactivation of the FONPs[Cp6] induced a significant increase in the Bax/Bcl-2 ratio, by 4.19-fold compared to the control. After 48 h, this ratio decreased to 2.1-fold. These observations were correlated with caspase-9 activation, leading to its cleavage, when the FONPs[Cp6] were photoactivated. Subsequently, the activation of caspase-3 (Figure 6C, D) resulted in PARP-1 cleavage (inactivation), associated with a decrease in the expression of the native PARP-1, 24 and 48 h after the FONPs[Cp6] illumination. Similar results were observed in the HT-29 CRC cells: the Bax/Bcl-2 ratio was significantly increased by 2.31- and 4.1-fold at 24 and 48 h, respectively, compared to the control. The increase in the Bax/Bcl-2 ratio was correlated with the activation of caspase-9, and its cleavage 24 and 48 h following PDT. Furthermore, the PARP-1 cleavage was mainly observed 24 and 48 h after the FONPs[Cp6] photoactivation (Figure 6E,F).

In the absence of PARP-1 repair, DNA is cleaved by endonucleases. To evaluate the apoptotic process at the later stages and examine the nuclear changes induced by the FONPs[Cp6], DNA fragmentation was performed 24 and 48 h after PDT using an ELISA assay. In the HCT116 CRC cells, the results indicate that the FONPs[Cp6], after PDT, induced a strong increase in DNA fragmentation by 5.2- and 12.3-fold, at 24 and 48 h, respectively, compared to the control (Figure 7A). As expected, the FONPs[Cp6] in the dark induced very limited DNA fragmentation of 1.3- and 1.5-fold at 24 and 48 h, respectively, compared to the control. The same results were observed in the HT-29 CRC cells: the FONPs[Cp6] photoactivation induced a significant increase in DNA fragmentation by 3.3- and 6.3-fold at 24 and 48 h, respectively, when compared to the control. The FONPs[Cp6] in the dark showed no significant DNA fragmentation, with 1.3- and 1.5-fold changes at 24 and 48 h, respectively (Figure 7B).

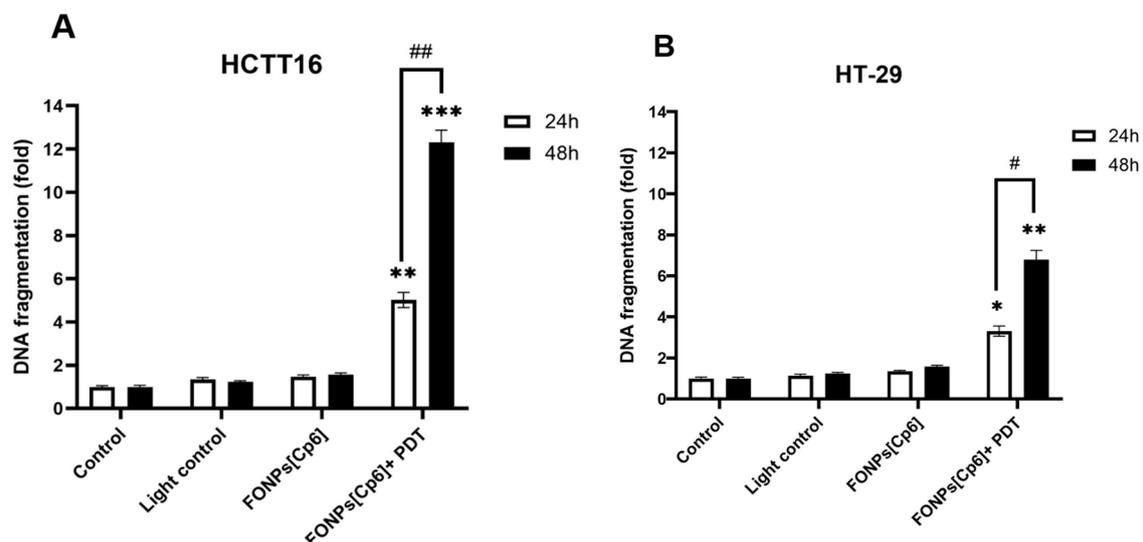


Figure 7. Effects of photoactivation of the FONPs[Cp6] on DNA fragmentation in HCT116 (A) and HT-29 (B) CRC cells. Cells were grown for 24 h before being treated or not with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations. After 24 h of incubation, cells were then illuminated or not. DNA fragmentation 24 and 48 h post-illumination was quantified from cytosol extracts by ELISA assay. The results are expressed as n-fold compared to the control. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, compared to the control, or # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$, compared to 24 h data.

Taken together, these results demonstrate that the FONPs[Cp6] photoactivation induced apoptosis in the human CRC cell lines via the intrinsic pathway.

3. Discussion

Presently, extensive efforts have been made to overcome the conventional PDT limitations, particularly through nanocarrier platforms. The use of NPs seems to be an attractive strategy for improving traditional PSs' hydrophilicity and accumulation within tumor sites. Interestingly, targeted NPs are a novel class of NPs that were developed by conjugating with ligands or other molecules to facilitate cancer cell recognition. These NPs are widely used in the literature to treat CRC [22]. In a previous study [23], we investigated the anticancer efficiency of a new nano-formulation (FONPs[Cp6]) of hydrophobic PS, Pp-18, and its derivative, Cp6, on human CRC cell lines (HCT116 and HT-29). Our previous work demonstrated that the FONPs[Cp6] combine several attractive characteristics, including high water solubility and stability, a high singlet oxygen quantum yield, and deep-red or NIR fluorescence [23]. So, after confirming the photodynamic activity of these functionalized NPs, the main objective of the present study was to understand the induced cell death mechanism that contributes to anticancer effects. First, we evaluated the *in vitro* safety of the FONPs, and we showed that these nanocarriers were extremely safe on the human CRC cell lines and were found to selectively accumulate within the cancer cells, compared to noncancerous HEK-293 cells. These results confirmed a previous study using the FONPs on glioblastoma cells, in which they were shown to preferentially accumulate in glioblastoma cells, mainly by caveolin and lipid rafts endocytosis [24].

On the other hand, the subcellular localization of PSs plays a critical role in determination of the extent of the cellular damage and the mechanisms involved in cell death. Our nanocarriers were found to accumulate in the cytoplasm of both the cell lines, but not in the nucleus. These results correlate with a previous study, in which Pp-18 was loaded into solid lipid nanoparticles (SLNs) and evaluated against HeLa and A549 lines [25]. Moreover, our confocal fluorescence images showed that the FONPs[Cp6] seemed to localize in lysosomes, mitochondria, and ER organelles. Similarly, a research group found that the conjugation of Pp-18 with a polyethylene glycol (PEG) spacer led to improved accumulation in the mitochondria, lysosomes, and ER in various human cancer cells [20].

Apoptosis is the most commonly described cell death after PDT, mainly due to ROS generation [26]. The intracellular ROS generation results showed that the FONPs[Cp6] exhibited high photoactivity, with 85.7% and 72.6% of ROS production in the HCT116 and the HT-29 CRC cell lines, respectively. When compared to Liu et al.'s work [27], in which they obtained water dispersible organic nanoparticles (WSONs) from the nanoprecipitation in water of hydrophobic chlorin derivatives, the FONPs[Cp6] in the present study seem to have a higher photodynamic efficiency. Liu et al.'s study highlighted that WSONs obtained from purpurin18 methyl ester (pu18ME) induce mitochondrial apoptotic cell death, with singlet oxygen generation of less than 65% in HeLa cell lines [27]. The use of a carbon monoxide (CO) controllable release system has emerged as an efficient anticancer therapy [28]. An interesting approach, reported by Wu et al., is the PDT-driven CO release system, based on Cp6, using nanogels. They showed that, when exposed to light irradiation, this system induces synergistic anticancer effects shown by the high CO and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) generation, demonstrating a strong photodynamic efficiency in both *in vitro* and *in vivo* breast cancer models [29].

Regarding the apoptotic cell death mechanism, we validated that the FONPs[Cp6] induce apoptosis via the intrinsic pathway. As localized in the mitochondria, the photoactivation of the FONPs[Cp6] induces ROS generation that induces damage to the mitochondrial membrane, followed by an increase in the Bax/Bcl-2 ratio, leading to the subsequent activation of caspase-9. Once activated, caspase-9 cleaves and activates the executioner caspases 3 and 7, leading to PARP-1 cleavage and DNA fragmentation. Consistent with our results, a study reported that the photoactivation of Cp6 induces apoptosis and autophagy via ROS generation in human CRC SW620 cells [17]. Furthermore, Bharathiraja

et al. demonstrated that Cp6 conjugated with silica nanoparticles enhanced cellular uptake and induced apoptosis by intracellular ROS generation in breast cancer cells [30]. An *in vivo* study on hepatocellular carcinoma, using Pp-18 conjugated with gold NPs, showed that PDT-irradiation induced caspase-3 activation and DNA fragmentation [31].

Accumulating evidence suggests that autophagy is triggered after PDT due to ROS generation. In fact, autophagy seems to play a controversial role in the PDT context. Several studies have demonstrated that applying an autophagy inhibitor can enhance PDT-induced cell death [17,32]. However, other studies showed that autophagy inhibition significantly decreased PDT-induced cell death in breast cancer cells [33]. In our work, we proved that the FONPs[Cp6] were localized in the lysosomes and ER, so further investigations of the role of autophagy in the induced apoptotic cell death could be useful. Indeed, the use of 3D cell spheroid models of CRC that imitate the tumor microenvironment seems to be crucial to assessing the PDT potential of the FONPs[Cp6]. Additionally, the use of *in vivo* animal models (such as the subcutaneous xenograft mouse model of CRC) [34] to investigate these novel nanocarriers would be the ultimate goal of the present work.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

The RPMI 1640 and RPMI 1640 red-phenol-free mediums were purchased from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) kit, cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay^{PLUS} (ELISA), and human anti-actin antibodies were acquired from Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA). The Poly-ADP-ribose polymerase (PARP), caspase-9, Bcl-2, and Bax antibodies, goat anti-rabbit IgG H&L horseradish peroxidase (HRP) secondary antibodies, and LysoTracker Green DND-26 were obtained from Cell Signaling Technology-Ozyme (Danvers, MA, USA). The MitoTracker Green FM, ER-TrackerTM Green, annexin V-FITC, propidium iodide (PI), and rabbit anti-mouse IgG-IgM H&L HRP secondary antibodies were obtained from Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Van Allen Way, Carlsbad, CA, USA).

4.2. Synthesis of the FONPs[Cp6]

The FONPs and the FONPs[Cp6] were prepared as described in ref [23]. Briefly, the ammonium citrate salt was first prepared by mixing equimolar amounts of diethylenetriamine (DETA) and citric triacid in pure water, then evaporating the water under vacuum to obtain a dry solid. The salt was subsequently heated at 200 °C for 30 min, leading to a brownish–yellowish crude material, which was washed with ethanol and then dried under vacuum. The bare FONPs were then enriched in NH₂ surface groups by heating in ethylene diamine at 120 °C for 16 h [35]. Finally, the FONPs^{NH₂} were reacted with Pp18 (Scheme S1, step 3) in a biphasic medium (H₂O/toluene) under vigorous stirring and heating at 100 °C to yield the FONPs[Cp6] after the separation of the aqueous phase, freeze-drying, and washing with CH₂Cl₂, then drying under a vacuum. The FONPs[Cp6] showed a size distribution ranging between 10 nm and 20 nm, giving a mean diameter of 12.9 nm, as indicated by transmission electron microscopy (Figure S1). A small number of larger nanoparticles (approximately 25 and 35 nm in diameter) were also detected [23]. Gel electrophoresis (Figure S4) indicated that both the FONPs^{NH₂} and the FONPs[Cp6] were mainly positively charged.

4.3. Cell Lines Culture and Treatment

The human CRC HCT116 and HT-29 adherent cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC—LGC Standards, Molsheim, France). We chose these human CRC cell lines because they are of different stages, enabling us to evaluate the possible resistance to our treatments: The HCT116 CRC line was isolated from a stage I colorectal carcinoma from an adult male. The HT-29 CRC line was derived from a stage II colorectal adenocarcinoma from a 44-year-old woman.

The cells were grown in an RPMI medium and cultured as previously mentioned [23], and the HEK cells were seeded at 2×10^4 cells/cm². The FONPs[Cp6] and FONP platform stock solutions were prepared in ultrapure water and diluted in a culture medium to prepare the working concentrations. The in vitro PDT protocol was performed as previously explained [23].

4.4. In Vitro Cytotoxicity Assay of FONPs

The cytotoxicity of the FONPs was assessed using the MTT assay, as described in [23], which reveals dehydrogenase activity in living cells. The cells were seeded in 96-well culture plates for 24 h before exposure or not to the compounds. After 24 h of incubation, the cells were illuminated with a 650 nm lamp (PhotoCure ASA, Oslo, Norway) as a light source at 38 mW/cm². The cell viability percentage was then measured 48 h after illumination, by normalizing control cells.

4.5. Intracellular ROS Generation by the FONPs[Cp6]

ROS production was quantified using a cell-permeable fluorescent probe, 2',7'-dichloro fluorescein diacetate (DCFDA), to determine the intracellular oxidative stress. To this end, the cells were seeded in 25 cm² tissue culture flasks for 24 h before being treated or not with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations. After 24 h, the cells were stained with DCFDA (20 μM) at 37 °C. After 30 min of incubation, the cells were illuminated or not. ROS generation was assessed by flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) directly after PDT. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as a positive control (800 μM).

For confocal microscopy images, the cells were plated for 24 h in chamber slides (ibidi μ-Slide 8 well; Clinisciences, Gräfelfing, Germany) and coated with a type I collagen (3 mg/mL) and acetic acid (20 mM) gel. After this, the cells were treated with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ values. Then, after 24 h, DCFDA (20 μM) was added for 30 min, and the fluorescence images were taken under excitation of 488 nm at 40× magnification by confocal microscopy (Zeiss LSM880 confocal microscope).

4.6. Cellular Uptake and Localization of the FONPs[Cp6]

The cells were seeded for 24 h before treatment with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations in chamber slides coated as mentioned above to determine the cellular localization. Then, after 24 h, the cells were treated with MitoTracker Green FM (50 nM), ER-Tracker™ Green (500 nM), and LysoTracker Green DND-26 (50 nM) for 45 min, 30 min, and ex-temporaneously at 37 °C, respectively. The FONPs[Cp6] localization was examined by confocal microscopy, using the FONPs[Cp6] fluorescence (excitation/emission: 520/665 nm) with MitoTracker fluorescence (490/516 nm), LysoTracker fluorescence (504/511 nm), and ER-Tracker fluorescence (504/511 nm). The co-localization was analyzed using the ImageJ software (version 1.52p).

4.7. Apoptotic Cell Death Induction by the FONPs[Cp6]

4.7.1. Dual Staining Assay with Annexin V-FITC and PI

Annexin V-FITC/PI dual staining was performed to evaluate the apoptosis induction. The cells were treated with the FONPs[Cp6] for each cell line at IC₅₀ concentrations and were illuminated or not. Twenty-four and forty-eight hours post-PDT, a total of 2.5×10^5 cells/conditions were collected, then washed with PBS, centrifuged at 1500 rpm for 5 min, and incubated with 100 μL binding buffer (1X) with 5 μL annexin V-FITC and 1 μL of PI at 100 μg/mL for 15 min in the dark. After that, 200 μL of the binding buffer was added to the samples, and the percentage of apoptotic cells was analyzed by flow cytometry. Our data are represented in a scatter plot as four quadrants: living, early apoptosis, late apoptosis, and necrotic cells.

4.7.2. DNA Fragmentation

A further analysis for cell death was performed using a Cell Death Detection ELISA^{PLUS} to detect DNA fragmentation. For this, the cells were treated or not with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations for 24 h, and then illuminated or not. Twenty-four and forty-eight hours after PDT, cytosolic extracts of 2×10^5 cells/condition were obtained, and the amounts of mono- and oligonucleosomes produced from apoptotic cells were quantified, following the manufacturer's protocol. The absorbance was measured at 405 nm, using a microplate reader (Thermoscientific MULTISKAN FC). The results are expressed as n-fold compared to the control.

4.7.3. Quantification of Caspase-3/7 Activity

The amounts of activated caspases-3/7 were monitored using an IncucyteS3 system (Sartorius, Göttingen, Germany), a live-cell imaging device that allows fluorescence tracking over time. The cells were seeded in 96-well plates for 24 h before being treated or not with the FONPs[Cp6] at IC₅₀ concentrations and illuminated. Then, the cells were labeled with caspases-3/7 green reagent (Sartorius) at 5 μ M. The photos were taken every 2 h at $\times 20$ magnification in phase contrast/green fluorescence. The Green Object Count/Phase Object Count ratio was quantified using Incucyte software (version 2023A Rev1) to determine the percentage of green fluorescent cells.

4.7.4. Protein Expression by Western Blotting

Each cell line was treated with IC₅₀ concentrations and illuminated. Twenty-four and forty-eight hours after PDT, the total cells of each condition were collected, and whole-cell lysate proteins were extracted using an RIPA lysis buffer (containing 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, and 20 mg/mL of aprotinin). The protein levels were quantified using the Bradford method. Briefly, the proteins (60–80 μ g) were separated by electrophoresis on SDS-PAGE gels and then transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France). After that, the membranes were incubated with primary antibodies against human apoptosis-related proteins, including PARP-1 (1:1000), caspase-9 (1:1000), Bcl-2 (1:1000), and Bax (1:1000). β -actin (1:5000) was used as a loading control. The membranes were then incubated with secondary antibodies, and bands were revealed using the Immobilon Western HRP Substrate (Merck, Darmstadt, Germany) and a G: BOX system (Syngene, Cambridge, UK). The bands were quantified by densitometry, using ImageJ software.

4.8. Statistical Analyses

All the data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 by two-tailed unpaired Student's *t*-tests. *p* values of * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, and *** *p* < 0.001 or # *p* < 0.05 and ## *p* < 0.01 were considered statistically significant.

5. Conclusions

In this study, we evaluated the anticancer efficiency of novel biocompatible FONPs that were functionalized with a hydrophobic PS (Pp-18 and its derivative Cp6) on human CRC cell lines (HCT116 and HT-29). We validated the *in vitro* safety of the FONPs as delivery nanocarriers for the hydrophobic PS. Interestingly, the FONPs[Cp6] showed a preferential internalization in the CRC cell lines. Furthermore, the confocal microscopy analysis confirmed that the FONPs[Cp6] were localized in the mitochondria, lysosomes, and ER, which are the desired targets for PDT. We can conclude that the FONPs[Cp6] exhibit strong photodynamic activity through ROS generation, resulting in induced apoptosis via the intrinsic pathway. Together, the *in vitro* results demonstrate the interesting anticancer efficiency of this nano-formulation against CRC. To further this study, the use of 3D cancer models could be the first step, followed by *in vivo* experiments to validate our findings.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano14191557/s1>. Synthesis and characterizations of FONPs[Cp6]. DAPI staining. Western blot analysis of the autophagy markers.

Author Contributions: Conceptualization, G.C., M.D.-A. and B.L.; methodology, R.C.; software, R.C.; validation, G.C., B.L. and M.B.-D.; formal analysis, R.C.; investigation, R.C., J.C., F.B. and V.S.; resources, J.C., F.B., V.S. and M.B.-D.; data curation, G.C. and B.L.; writing—original draft preparation, R.C.; writing—review and editing, B.L., M.B.-D. and G.C.; visualization, R.C. and G.C.; supervision, B.L. and G.C.; project administration, B.L., M.D.-A. and G.C.; funding acquisition, G.C., M.D.-A., V.S. and M.B.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Ligue contre le Cancer Haute-Vienne, 23 Av. des Bénédictins, 87000 Limoges, PFI grant number R2107610 and the Université de Limoges, 33 Rue François Mitterrand, 87000 Limoges, PFI grant number RET23840. This work was supported by Région Nouvelle Aquitaine (project NANOPHOT, convention AAPR2020-2019-8225810). This study received financial support from the French government in the framework of the University of Bordeaux's France 2030 program/RRI "IMPACT".

Data Availability Statement: The data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: We are grateful to the BISCEm platform of OmegaHealth Institut of Limoges University, especially Catherine OUK and Claire CARRION for the flow cytometry and the confocal microscopy analyses. We thank Olivier Sandre for his contribution to funding acquisition (grant to J.C.). We thank Aline Pinon for her technical assistance during the requested revisions.

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

Abbreviations

ATCC: American Type Culture Collection; Cp6: chlorin p6; CRC: colorectal cancer; DCFDA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DNA: deoxyribonucleic acid; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ER-Tracker: endoplasmic reticulum tracker; FONPs: fluorescent organic nanoparticles; HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid; HEK-293 cells: human embryonic kidney-293 cells; H₂O₂: hydrogen peroxide; HRP: horseradish peroxidase; IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NPs: nanoparticles; ¹O₂: singlet oxygen; •OH: hydroxyl radical; O₂^{•−}: superoxide anion; PARP-1: poly-ADP-ribose polymerase; PBS: phosphate-buffered saline; PDT: photodynamic therapy; PI: propidium Iodide; PS: photosensitizer; PVDF membrane: polyvinylidene fluoride membrane; Pp-18: purpurin-18; RIPA: radio immuno precipitation assay; ROS: reactive oxygen species; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; SDSPAGE: electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate; SEM: standard error of the mean.

References

1. Douaiher, J.; Ravipati, A.; Grams, B.; Chowdhury, S.; Alatise, O.; Are, C. Colorectal Cancer—Global Burden, Trends, and Geographical Variations. *J. Surg. Oncol.* **2017**, *115*, 619–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sawicki, T.; Ruszkowska, M.; Danielewicz, A.; Niedźwiedzka, E.; Arłukowicz, T.; Przybyłowicz, K.E. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers* **2021**, *13*, 2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nompumelelo Simelane, N.W.; Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Photodynamic Diagnosis and Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer: In Vitro and In Vivo. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 41560–41576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sharifkazemi, H.; Amini, S.M.; Koohi Ortakand, R.; Narouie, B. A Review of Photodynamic Therapy in Different Types of Tumors. *Transl. Res. Urol.* **2022**, *4*, 61–70. [[CrossRef](#)]
5. Azzouzi, A.R.; Vincendeau, S.; Barret, E.; Cicco, A.; Kleinclaus, F.; van der Poel, H.G.; Stief, C.G.; Rassweiler, J.; Salomon, G.; Solsona, E.; et al. Padeliporfin Vascular-Targeted Photodynamic Therapy versus Active Surveillance in Men with Low-Risk Prostate Cancer (CLIN1001 PCM301): An Open-Label, Phase 3, Randomised Controlled Trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 181–191. [[CrossRef](#)]
6. Rodrigues, J.A.; Correia, J.H. Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer: An Update and a Look to the Future. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12204. [[CrossRef](#)]

7. Simelane, N.W.N.; Abrahamse, H. Nanoparticle-Mediated Delivery Systems in Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12405. [[CrossRef](#)]
8. Correia, J.H.; Rodrigues, J.A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1332. [[CrossRef](#)]
9. Lee, D.; Kwon, S.; Jang, S.Y.; Park, E.; Lee, Y.; Koo, H. Overcoming the Obstacles of Current Photodynamic Therapy in Tumors Using Nanoparticles. *Bioact. Mater.* **2022**, *8*, 20–34. [[CrossRef](#)]
10. Dos Santos, A.F.; Arini, G.S.; de Almeida, D.R.Q.; Labriola, L. Nanophotosensitizers for Cancer Therapy: A Promising Technology? *J. Phys. Mater.* **2021**, *4*, 032006. [[CrossRef](#)]
11. Bhattacharya, D.; Mukhopadhyay, M.; Shivam, K.; Tripathy, S.; Patra, R.; Pramanik, A. Recent developments in photodynamic therapy and its application against multidrug resistant cancers. *Biomed. Mater.* **2023**, *18*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Debele, T.A.; Peng, S.; Tsai, H.-C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 22094–22136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rajan, S.S.; Chandran, R.; Abrahamse, H. Overcoming Challenges in Cancer Treatment: Nano-Enabled Photodynamic Therapy as a Viable Solution. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2024**, *16*, e1942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nkune, N.W.; Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Possible Enhancement of Photodynamic Therapy (PDT) Colorectal Cancer Treatment When Combined with Cannabidiol. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2020**, *21*, 137–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pavličková, V.; Škubník, J.; Jurášek, M.; Rimpelová, S. Advances in Purpurin 18 Research: On Cancer Therapy. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 2254. [[CrossRef](#)]
16. Huang, P.; Zhang, B.; Yuan, Q.; Zhang, X.; Leung, W.; Xu, C. Photodynamic Treatment with Purpurin 18 Effectively Inhibits Triple Negative Breast Cancer by Inducing Cell Apoptosis. *Lasers Med. Sci.* **2021**, *36*, 339–347. [[CrossRef](#)]
17. Xue, Q.; Wang, X.; Wang, P.; Zhang, K.; Liu, Q. Role of P38 MAPK in Apoptosis and Autophagy Responses to Photodynamic Therapy with Chlorin E6. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 84–91. [[CrossRef](#)]
18. Srivatsan, A.; Ethirajan, M.; Pandey, S.K.; Dubey, S.; Zheng, X.; Liu, T.H.; Shibata, M.; Missert, J.; Morgan, J.; Pandey, R.K. Conjugation of CRGD Peptide to Chlorophyll a Based Photosensitizer (HPPH) Alters Its Pharmacokinetics with Enhanced Tumor-Imaging and Photosensitizing (PDT) Efficacy. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 1186–1197. [[CrossRef](#)]
19. Oluwole, D.O.; Manoto, S.L.; Malabi, R.; Maphanga, C.; Ombinda-Lemboumba, S.; Mthunzi-Kufa, P.; Nyokong, T. Evaluation of the Photophysicochemical Properties and Photodynamic Therapy Activity of Nanoconjugates of Zinc Phthalocyanine Linked to Glutathione Capped Au and Au3Ag1 Nanoparticles. *Dye. Pigment.* **2018**, *150*, 139–150. [[CrossRef](#)]
20. Pavličková, V.; Rimpelová, S.; Jurášek, M.; Záruba, K.; Fähnrich, J.; Křížová, I.; Bejček, J.; Rottnerová, Z.; Spiwok, V.; Drašar, P.; et al. PEGylated Purpurin 18 with Improved Solubility: Potent Compounds for Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules* **2019**, *24*, 4477. [[CrossRef](#)]
21. Kato, A.; Kataoka, H.; Yano, S.; Hayashi, K.; Hayashi, N.; Tanaka, M.; Naitoh, I.; Ban, T.; Miyabe, K.; Kondo, H.; et al. Maltotriose Conjugation to a Chlorin Derivative Enhances the Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Peritoneal Dissemination of Pancreatic Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1124–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cisterna, B.A.; Kamaly, N.; Choi, W.I.; Tavakkoli, A.; Farokhzad, O.C.; Vilos, C. Targeted nanoparticles for colorectal cancer. *Nano-Medicine* **2016**, *11*, 2443–2456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sasaki, I.; Brégier, F.; Chemin, G.; Daniel, J.; Couvez, J.; Chkair, R.; Vaultier, M.; Sol, V.; Blanchard-Desce, M. Hydrophilic Biocompatible Fluorescent Organic Nanoparticles as Nanocarriers for Biosourced Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Nanomaterials* **2024**, *14*, 216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Daniel, J.; Montaleytang, M.; Nagarajan, S.; Picard, S.; Clermont, G.; Lazar, A.N.; Dumas, N.; Correard, F.; Braguer, D.; Blanchard-Desce, M.; et al. Hydrophilic Fluorescent Nanoprodrug of Paclitaxel for Glioblastoma Chemotherapy. *ACS Omega* **2019**, *4*, 18342–18354. [[CrossRef](#)]
25. Yeo, S.; Song, H.H.; Kim, M.J.; Hong, S.; Yoon, I.; Lee, W.K. Synthesis and Design of Purpurin-18-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improved Anticancer Efficiency of Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1064. [[CrossRef](#)]
26. Gunaydin, G.; Gedik, M.E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front. Chem.* **2021**, *10*, 691697. [[CrossRef](#)]
27. Liu, Y.; Lee, T.H.; Lee, S.H.; Li, J.; Lee, W.K.; Yoon, I. Mitochondria-Targeted Water-Soluble Organic Nanoparticles of Chlorin Derivatives for Biocompatible Photodynamic Therapy. *ChemNanoMat* **2020**, *6*, 610–617. [[CrossRef](#)]
28. Wegiel, B.; Gallo, D.; Csizmadia, E.; Harris, C.; Belcher, J.; Vercellotti, G.M.; Penacho, N.; Seth, P.; Sukhatme, V.; Ahmed, A.; et al. Carbon monoxide expedites metabolic exhaustion to inhibit tumor growth. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 7009–7021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wu, L.; Cai, X.; Zhu, H.; Li, J.; Shi, D.; Su, D.; Yue, D.; Gu, Z. PDT-Driven Highly Efficient Intracellular Delivery and Controlled Release of CO in Combination with Sufficient Singlet Oxygen Production for Synergistic Anticancer Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1804324. [[CrossRef](#)]
30. Bharathiraja, S.; Moorthy, M.S.; Manivasagan, P.; Seo, H.; Lee, K.D.; Oh, J. Chlorin E6 Conjugated Silica Nanoparticles for Targeted and Effective Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *19*, 212–220. [[CrossRef](#)]
31. Kwon, J.-G.; Song, I.-S.; Kim, M.-S.; Lee, B.H.; Kim, J.H.; Yoon, I.; Shim, Y.K.; Kim, N.; Han, J.; Youm, J.B. Pu-18-N-Butylimide-NMGA-GNP Conjugate Is Effective against Hepatocellular Carcinoma. *Integr. Med. Res.* **2013**, *2*, 106–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Xiong, L.; Liu, Z.; Ouyang, G.; Lin, L.; Huang, H.; Kang, H.; Chen, W.; Miao, X.; Wen, Y. Autophagy Inhibition Enhances Photocytotoxicity of Photosan-II in Human Colorectal Cancer Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 6419–6432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Zhu, J.; Tian, S.; Li, K.T.; Chen, Q.; Jiang, Y.; Lin, H.D.; Yu, L.H.; Bai, D.Q. Inhibition of Breast Cancer Cell Growth by Methyl Pyropheophenylchlorin Photodynamic Therapy Is Mediated Through Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Autophagy in vitro and vivo. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 1908–1920. [[CrossRef](#)]
34. Bretin, L.; Pinon, A.; Bouramtane, S.; Ouk, C.; Richard, L.; Perrin, M.-L.; Chaunavel, A.; Carrion, C.; Bregier, F.; Sol, V.; et al. Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sasaki, I.; Daniel, J.; Marais, S.; Clermont, G.; Verlhac, J.B.; Vaultier, M.; Blanchard-Desce, M. Soft fluorescent organic nanodots as nanocarriers for porphyrins. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23*, 1463–1469. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

VII.1.3. Résultats supplémentaires de l'utilisation des FONPs[Cp6] sur les lignées cellulaires colorectales

- Pour compléter les résultats de l'article 2, vous trouvez ci-dessous des résultats supplémentaires sur la Pp-18 seule et sur les FONPs[Cp6].

VII.1.3.1. Analyse de la viabilité cellulaire après traitement à la Pp-18 seule

Notre PS de base, la Pp-18, a été également testée sur les deux lignées de CCR : HCT116 et HT-29. Afin d'évaluer l'activité cytotoxique de la Pp-18 seule, le test MTT a été réalisé 24 et 48 h après l'illumination à 650 nm. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité déterminée. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées à des concentrations croissantes de Pp-18. Après 24 h, les cellules ont été illuminées ou non. La viabilité cellulaire a été déterminée 24 et 48 h post-PDT. Nos résultats ont révélé que la Pp-18 n'a aucune toxicité significative à l'obscurité sur les lignées cellulaires HCT116 et HT-29. En revanche, en présence de la lumière, la viabilité cellulaire diminue rapidement de manière dose-dépendante dans les deux lignées cellulaires (Figure 61).

Nos résultats ont montré que 48 h après l'illumination, les cellules HCT116 sont plus sensibles au traitement par la Pp-18 que les cellules HT-29 avec des IC_{50} de 0,007 μ M et 0,0127 μ M, respectivement (Tableau 12).

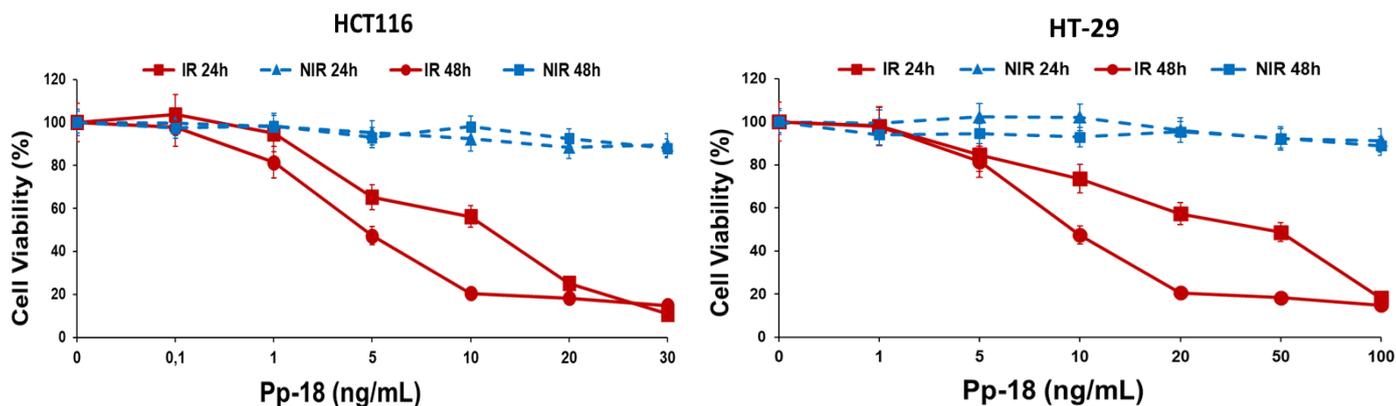


Figure 61. Effets cytotoxiques in vitro de la Pp-18 sur les lignées cellulaires HCT116 et HT-29 (IR : irradié ; NIR : non-irradié).

Pp-18	IC_{50} /PDT 24 h		IC_{50} /PDT 48 h	
HCT116	11,48 ng/mL	0,02 μ M	4,40 ng/mL	0,0077 μ M
HT-29	43,27 ng/mL	0,076 μ M	7,18 ng/mL	0,0127 μ M

Tableau 12. Valeurs des IC₅₀ déterminées par des tests MTT sur les lignées cellulaires HCT116 et HT-29.

En comparant la Pp-18 seule avec la Pp-18 nanovectorisée (FONPs[Cp6]), on voit que des concentrations inférieures ont été nécessaires pour induire une cytotoxicité (0,0127 μ M avec la Pp-18 en comparaison à 0,13 μ M avec les FONPs[Cp6], 48 h post-PDT dans la lignée HT-29). Cependant, pour nous, ce n'est pas comparable, vu que dans la nanoformulation FONPs[Cp6], on ne connaît pas la concentration finale en Pp-18.

VII.1.3.2. Localisation cellulaire des FONPs[Cp6]

Pour compléter la **Figure 2 et 3 de l'article 2**, et confirmer la localisation cellulaire des FONPs[Cp6], le marquage du noyau par DAPI a été réalisé. Pour cela, les cellules ont étéensemencées dans des chambres d'incubation pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées aux IC₅₀ calculées. Après 24 h d'incubation, 200 μ L de la solution DAPI à 1 μ g/ml (dans du PBS stérile) ont été ajoutés pendant 15 min à 37 °C. Le complexe DAPI-ADN fluorescent a ensuite été évalué par microscopie confocale (excitation = 364 nm, émission = 458 nm).

Les FONPs[Cp6] présentent naturellement une fluorescence dans le rouge voire l'infrarouge. Les résultats montrent que nos nanoparticules sont bien internalisées au sein des cellules HCT116 et HT-29, et sont accumulées dans le cytoplasme des deux lignées cellulaires, mais pas dans le noyau (**Figure 62**).

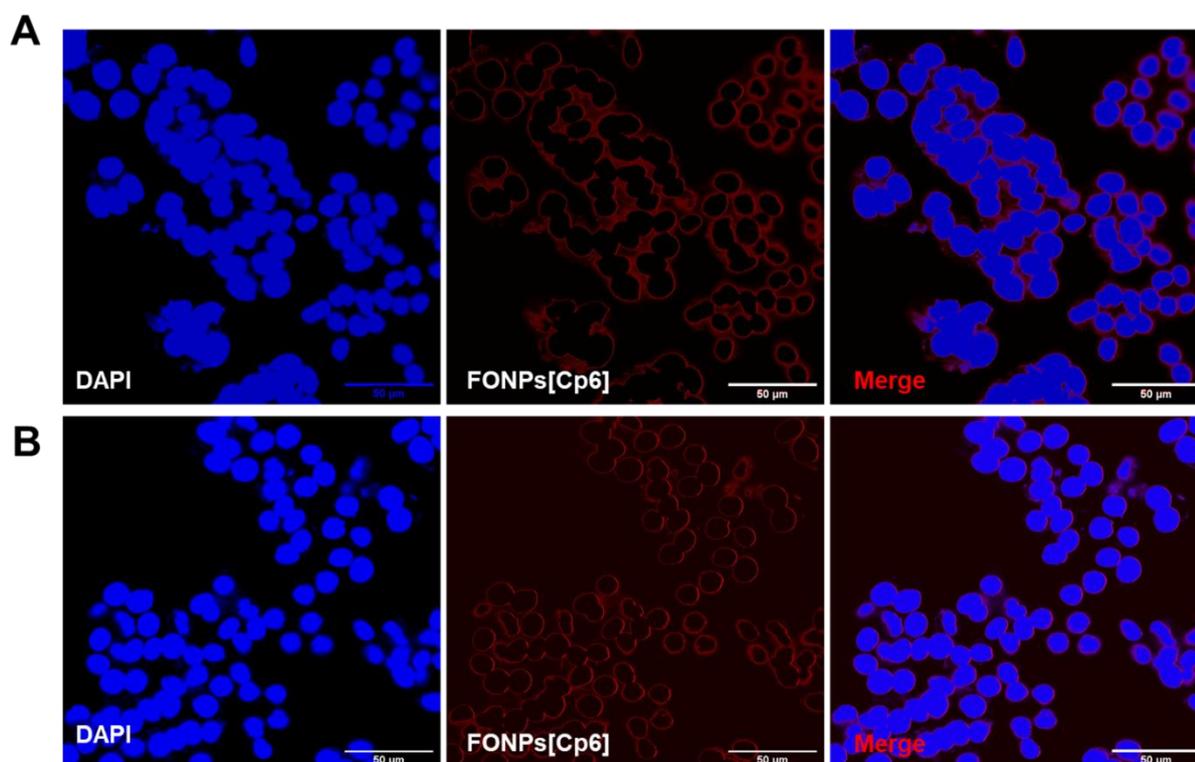


Figure 62. Internalisation cellulaire des FONPs[Cp6] dans les cellules HCT116 (A) et HT-29 (B). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits pendant 24 h avant d'être exposées aux FONPs[Cp6] aux valeurs d'IC₅₀ déterminées. Après 24 h, les noyaux ont été marqués avec du DAPI (bleu). La fluorescence a été détectée par microscopie confocale (microscope confocal Zeiss LSM880). La colocalisation a été analysée à l'aide du logiciel ImageJ. Les barres d'échelle représentent 50 µm.

VII.1.3.3. Analyse quantitative des caspases-3/7 activées

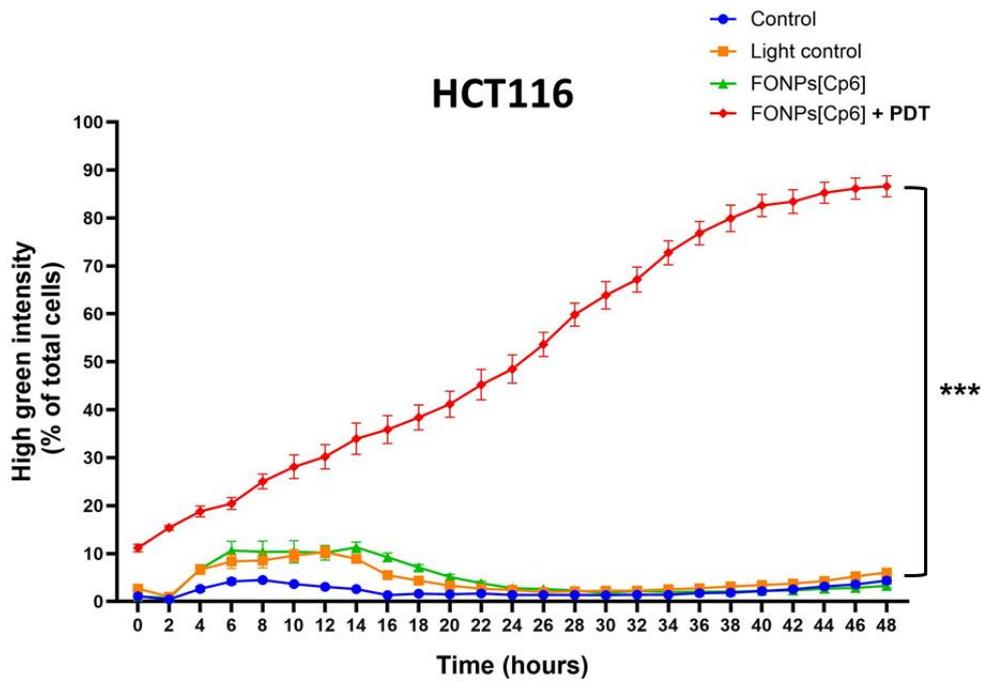
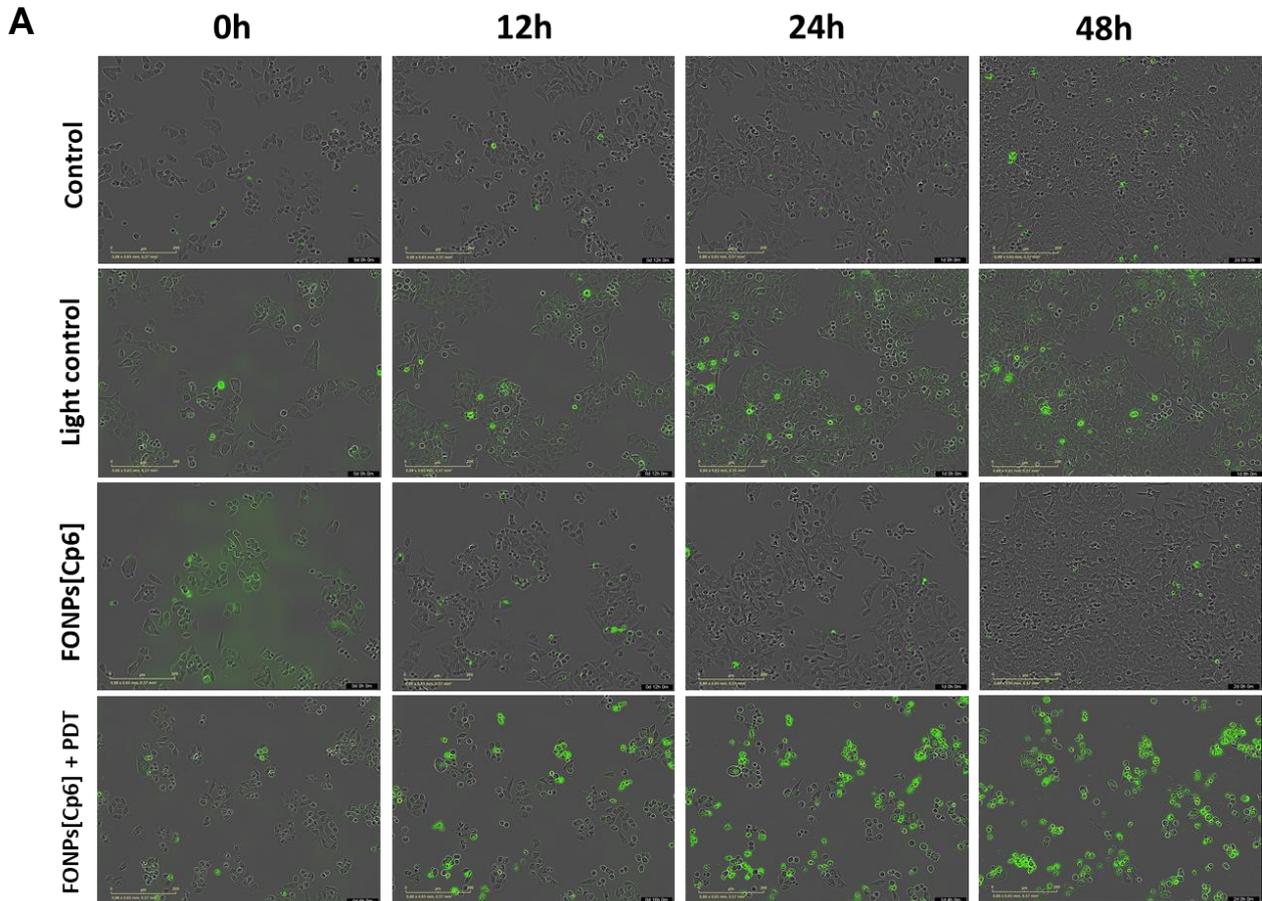
(Pour compléter la **Figure 6 A et B de l'article 2**, des images représentatives sont présentées ci-dessous).

Les caspases sont connues pour leur rôle crucial dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Par conséquent, pour confirmer le mécanisme de mort cellulaire apoptotique observé après la photoactivation des FONPs[Cp6], le niveau d'activité des caspases-3/7, les principaux exécuteurs de l'apoptose, a été mesuré à l'aide du système d'imagerie de cellules vivantes Incucyte S3 qui permet le suivi de la fluorescence au cours du temps.

Ainsi, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits pendant 24 h avant d'être traitées ou non avec les FONPs[Cp6] aux IC₅₀ et illuminées. Ensuite, les cellules ont été marquées avec le réactif vert caspases-3/7 à 5 µM. Les photos ont été prises toutes les 2 h à un grossissement x20 en contraste de phase/ fluorescence verte.

Les résultats révèlent que la photoactivation des FONPs[Cp6] entraîne une augmentation de la fluorescence verte au fil du temps par rapport au contrôle dans les deux lignées cellulaires (**Figure 63**). Comme le montre la **figure 63A**, la photoactivation des FONPs[Cp6] dans les cellules HCT116 a induit une augmentation significative du pourcentage de caspases activées-3/7 en fonction du temps, avec 86,6 % par rapport à 6,1 % dans le contrôle-lumière, 48 h après l'illumination. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules HT-29, avec une augmentation significative du niveau d'activité de la caspase-3/7 à 68,5 %, par rapport à 9,6 % dans le contrôle-lumière.

HCT116



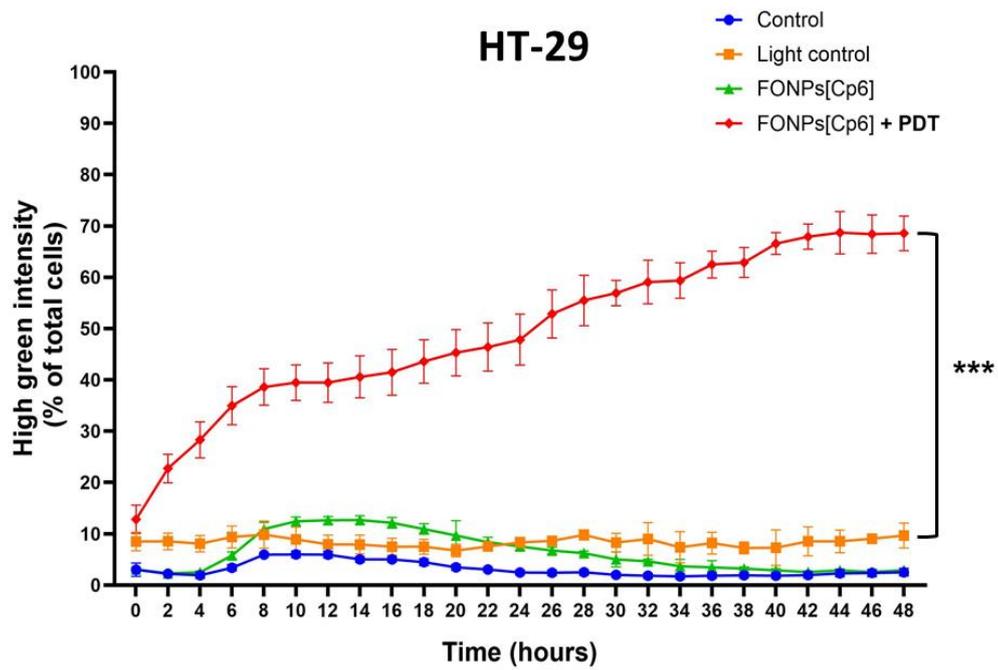
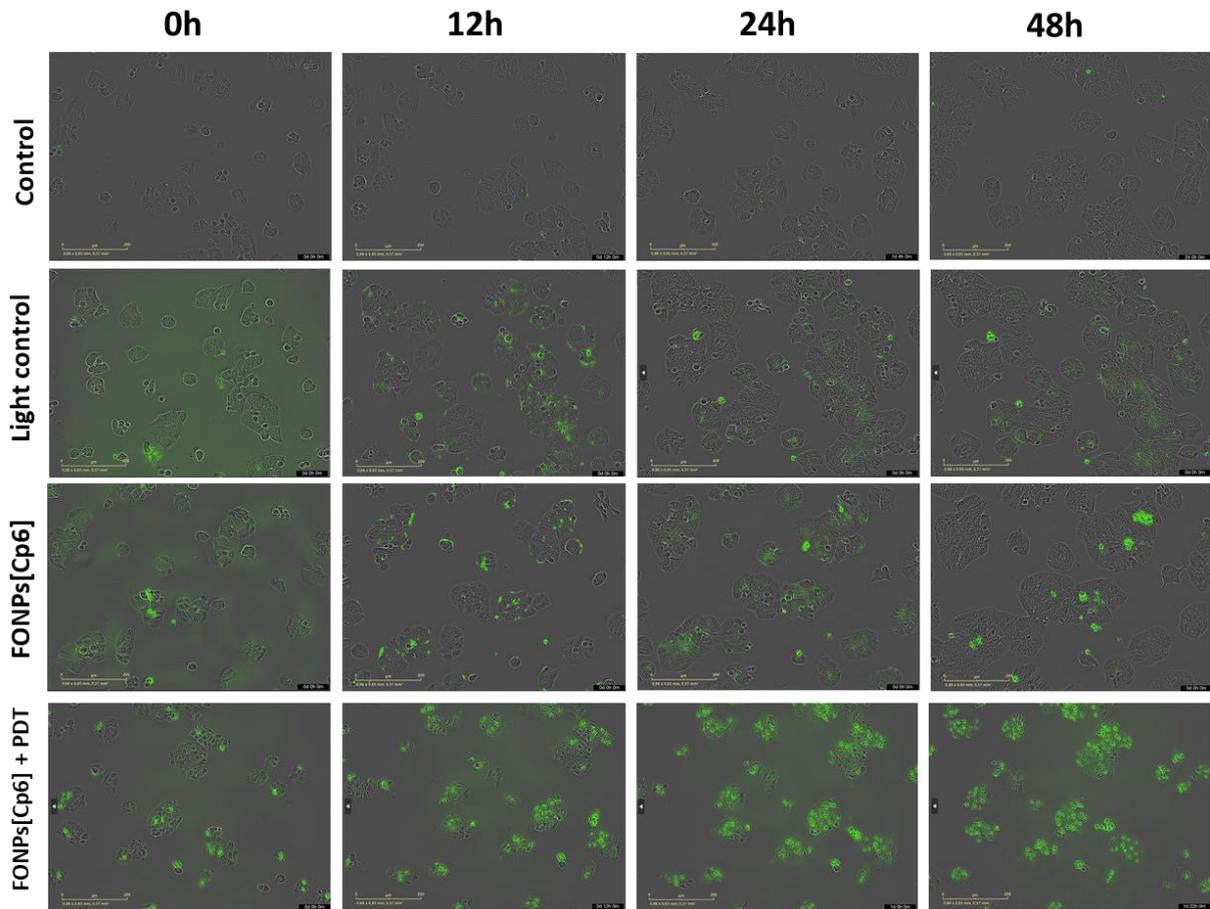
B**HT-29**

Figure 63. Quantification de l'activité des caspases-3/7 dans les cellules HCT116 (A) et HT-29 (B). Les cellules ont étéensemencées et cultivées pendant 24 h, puis traitées avec les FONPs[Cp6] aux IC₅₀ déterminées. Les cellules ont ensuite été illuminées, co-traitées avec le réactif vert caspases-3/7 et placées dans le système IncuCyte S3. (A) Le nombre de cellules en apoptose a été quantifié à l'aide du logiciel IncuCyte® en utilisant le ratio du pourcentage de cellules fluorescentes vertes normalisé par le pourcentage de cellules totales dans chaque puits pendant 48 h. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition à 0, 12, 24 et 48 h. *** p < 0,001, par rapport au contrôle. Barre d'échelle jaune = 200 µm.

VII.1.3.4. Analyse des différents marqueurs de l'autophagie par Western-blot

De nombreuses études confirment que l'autophagie est déclenchée lors des traitements par PDT en raison de la production des ERO. On a donc examiné l'expression des acteurs de l'autophagie à différentes étapes.

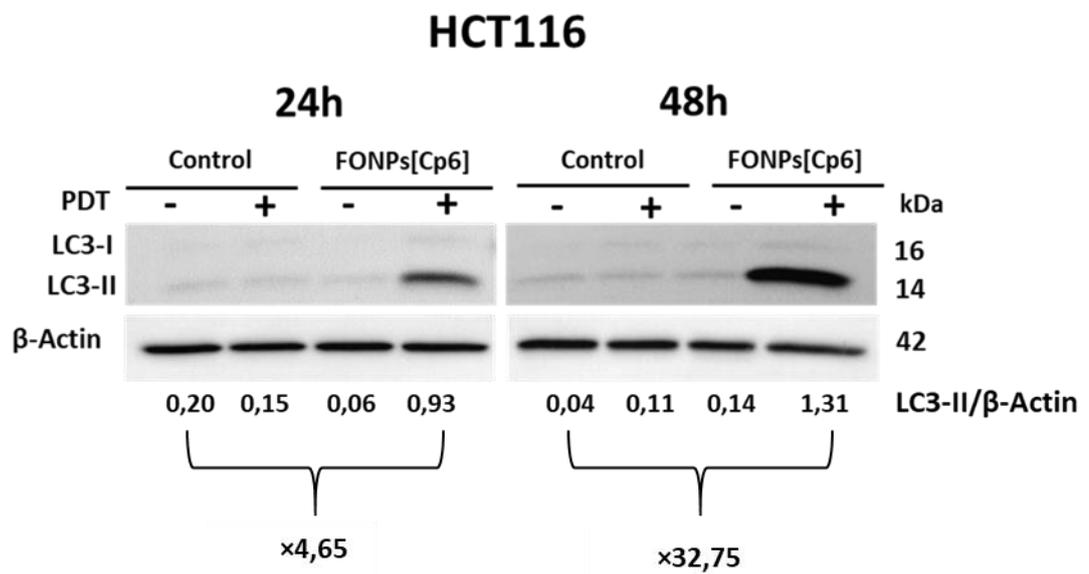
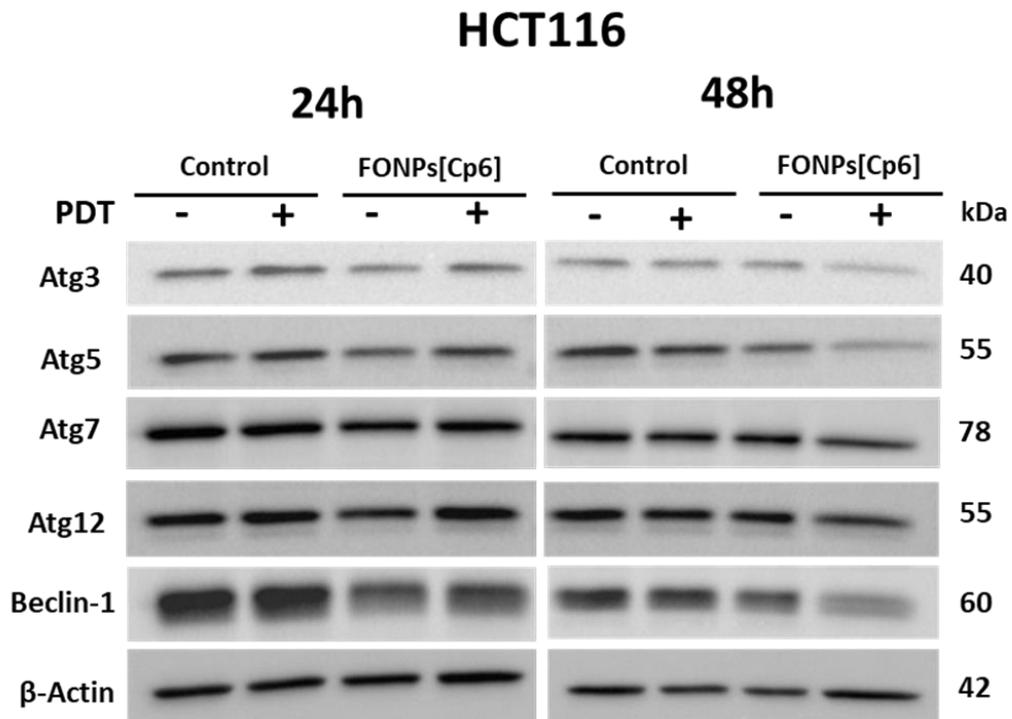
L'autophagie peut être étudiée par différentes approches, dont l'une consiste à surveiller la localisation de LC3. Au cours de l'autophagie, la protéine cytoplasmique LC3-I est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) pour former LC3-II, qui est à son tour localisée à la surface des autophagosomes. La conversion de LC3 en LC3-II est donc bien connue comme marqueur de l'induction de l'autophagie, d'où l'expression de ce marqueur a été analysée. Ainsi, les expressions de Bécline-1, qui joue un rôle dans l'initiation, et celles d'Atg5, 12, et 7 qui jouent un rôle dans l'élongation de l'autophagie, ont été étudiées.

Les cellules (HCT116 et HT-29) ont étéensemencées à une densité déterminée pendant 24 h avant d'être traitées ou non avec les FONPs[Cp6] aux IC₅₀. Après 24 h, les cellules ont été illuminées. 24 et 48 h post illumination, l'expression des protéines liées à l'autophagie a été analysée par Western blot.

Les résultats montrent que la photoactivation des FONPs[Cp6] entraîne une induction de l'autophagie dans les deux lignées de CCR (**Figure 64**). La photoactivation des FONPs[Cp6] induit une diminution de protéines Atg 3, 7 et 12 dans les cellules HCT116 par rapport au contrôle-lumière 48 h après l'illumination. De même, pour le Bécline-1, une diminution de l'expression a été observée 48 h post-PDT. De manière très importante, la conversion de LC3 I en LC3 II est fortement induite 24 et 48 h post-PDT d'un facteur de 4,65 (24 h) et 32,75 fois (48 h), supérieure par rapport au contrôle-lumière. Des résultats similaires ont été observés avec la lignée HT-29, avec une forte conversion de LC3 I en LC3 II, mais avec une augmentation de l'expression d'Atg5 48 h post-PDT.

L'ensemble de ces résultats montrent que la photoactivation des FONPs[Cp6] induit l'activation de l'autophagie, en plus de l'apoptose dans les deux lignées HCT116 et HT-29.

A



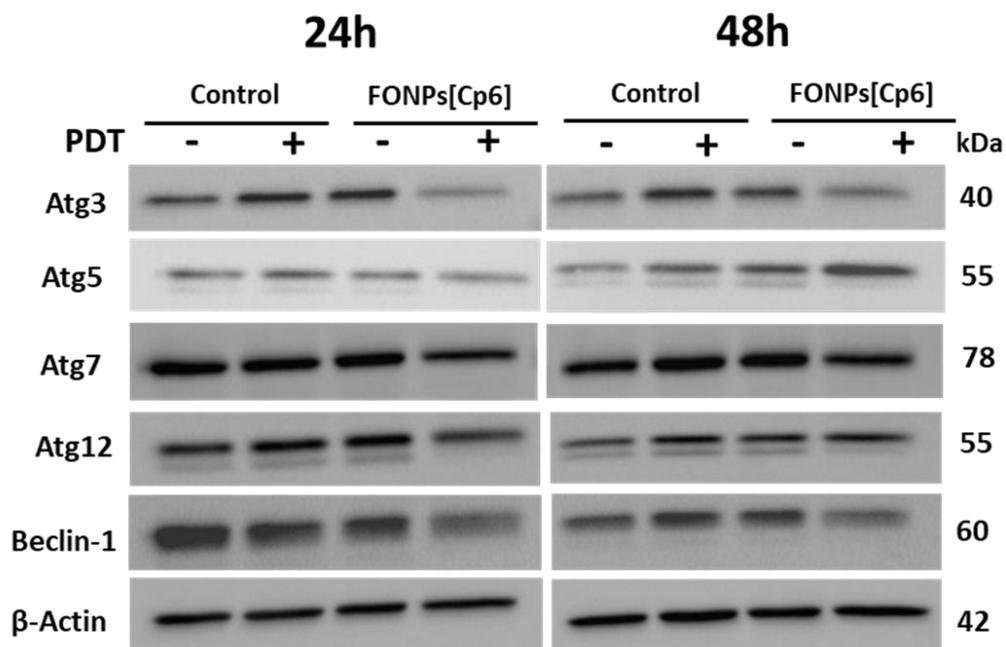
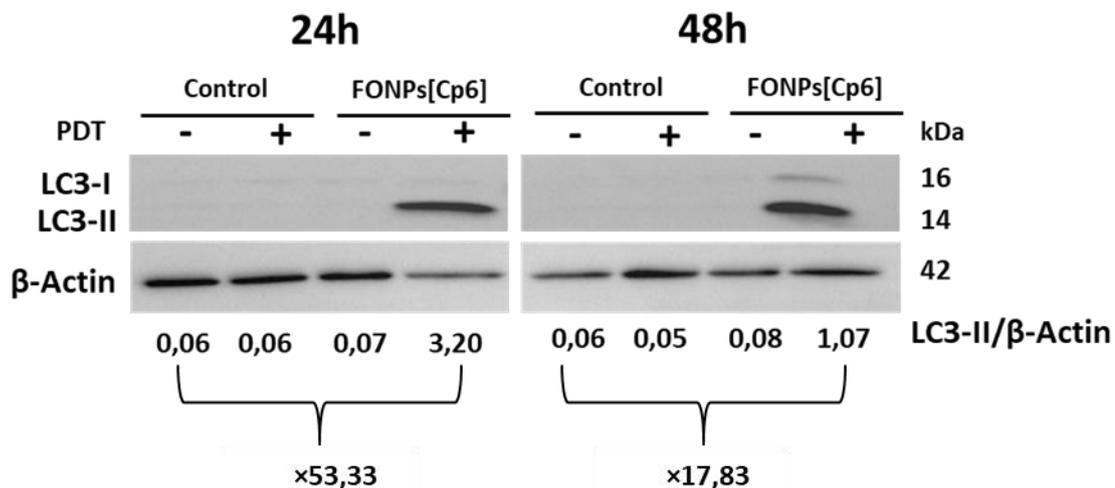
B**HT-29****HT-29**

Figure 64. Effets de la photoactivation des FONPs[Cp6] sur l'expression des protéines dans les cellules HCT116 (A) et HT-29 (B). Les cellules ont été cultivées pendant 24 h, puis traitées avec des FONPs[Cp6] aux IC₅₀ déterminées, avant d'être illuminées. L'expression des protéines liées à l'autophagie a été évaluée par Western blot 24 et 48 h après l'illumination. La β-actine sert de protéine de référence. Les bandes de LC3 ont été quantifiées par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ.

VII.1.3.5. L'activité anticancéreuse des FONPs[Cp6] dans les cultures 3D

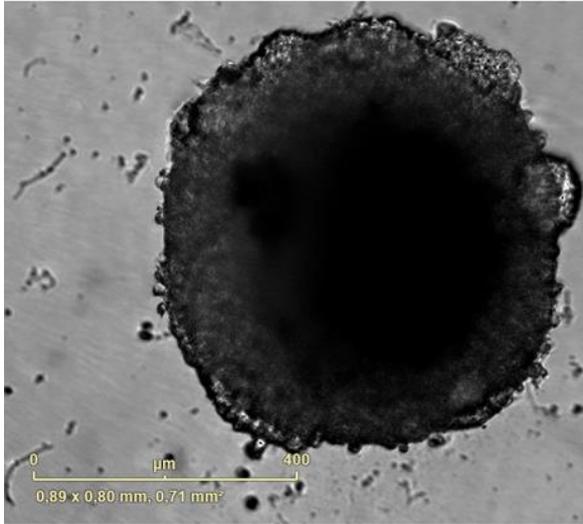
L'utilisation de modèles tridimensionnels 3D suscitent un intérêt croissant pour mieux reproduire la réponse cellulaire à la PDT et surmonter certaines limites de la culture cellulaire *in vitro* en 2D. Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires représentent l'un des modèles d'organisation cellulaire 3D les plus simples, nommés d'après la forme sphérique qu'ils présentent généralement lorsque les cellules s'agrègent sans avoir besoin de plaques ou d'autres surfaces pour s'adhérer. Les sphéroïdes tumoraux tridimensionnels constituent un excellent système modèle puisqu'ils prennent en compte les interactions cellule-cellule et que la matrice extracellulaire ressemble aux tumeurs *in vivo*. Ainsi, l'utilisation des sphéroïdes dans le traitement PDT du CCR est cruciale pour évaluer le potentiel de phototoxicité provoquée par les PS.

Pour cela, les cellules de la lignée la plus résistante, HT-29, ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond et à fixation ultra-faible et cultivées pendant 3-4 jours. Comme on peut le voir sur **la figure 65**, les sphéroïdes ont présenté une compacité à partir des jours 3 et 4, présentant des formes variées et leur diamètre moyen varie entre 500 et 700 μm .

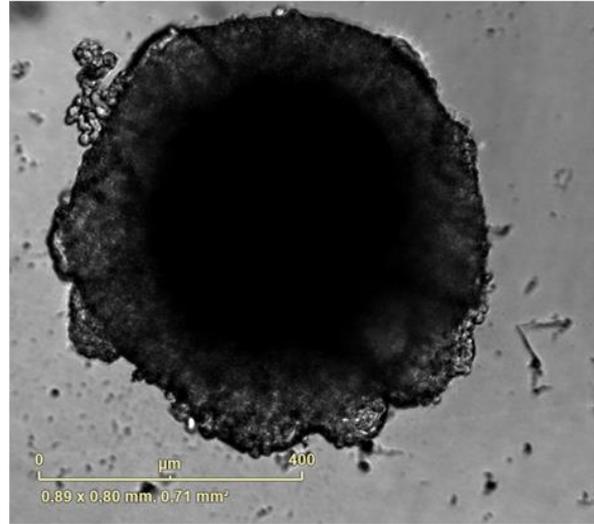
Afin de déterminer l'effet phototoxique des FONPs[Cp6] sur les sphéroïdes, ils ont été traités à différentes concentrations de FONPs[Cp6], après 3-4 jours d'ensemencement. Après 24 h d'incubation, les sphéroïdes ont été illuminés ou non. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS/PMS 48 h post-PDT. Nos résultats ont révélé que nos nanoparticules FONPs[Cp6] n'ont aucune toxicité sur les sphéroïdes de HT-29 à l'obscurité. En revanche, la photoactivation des FONPs[Cp6] entraîne une diminution significative de la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante dans les sphéroïdes multicellulaires de HT-29 (**Figure 66**). Les valeurs de IC_{50} ont varié entre 6 et 7 μM .

Pour vérifier l'effet phototoxique, l'évaluation de la forme des sphéroïdes au cours du temps a été réalisée par le système d'imagerie IncucyteS3 (Sartorius). Après 48 h d'illumination, les sphéroïdes traités avec les FONPs[Cp6] (6 μM) présentent des formes irrégulières par rapport aux sphéroïdes de contrôle-lumière, avec une diminution de la surface des sphéroïdes traités, ce qui liée à une diminution de la viabilité cellulaire (**Figure 67**).

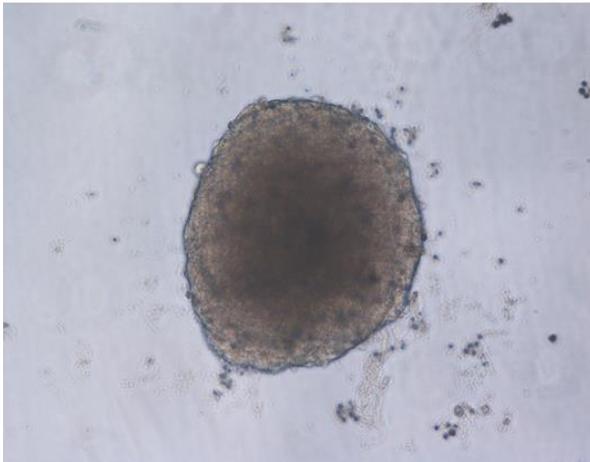
3 jours



4 jours



3 jours



4 jours

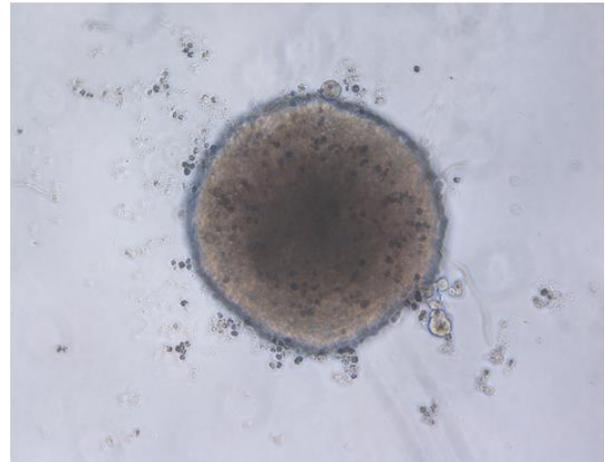


Figure 65. Images représentatives de l'évaluation morphologique des sphéroïdes de la lignée HT-29 cultivées en 3D, 3 et 4 jours après l'ensemencement, vues sous l'objectif $\times 10$. La barre d'échelle jaune représente 400 μm .

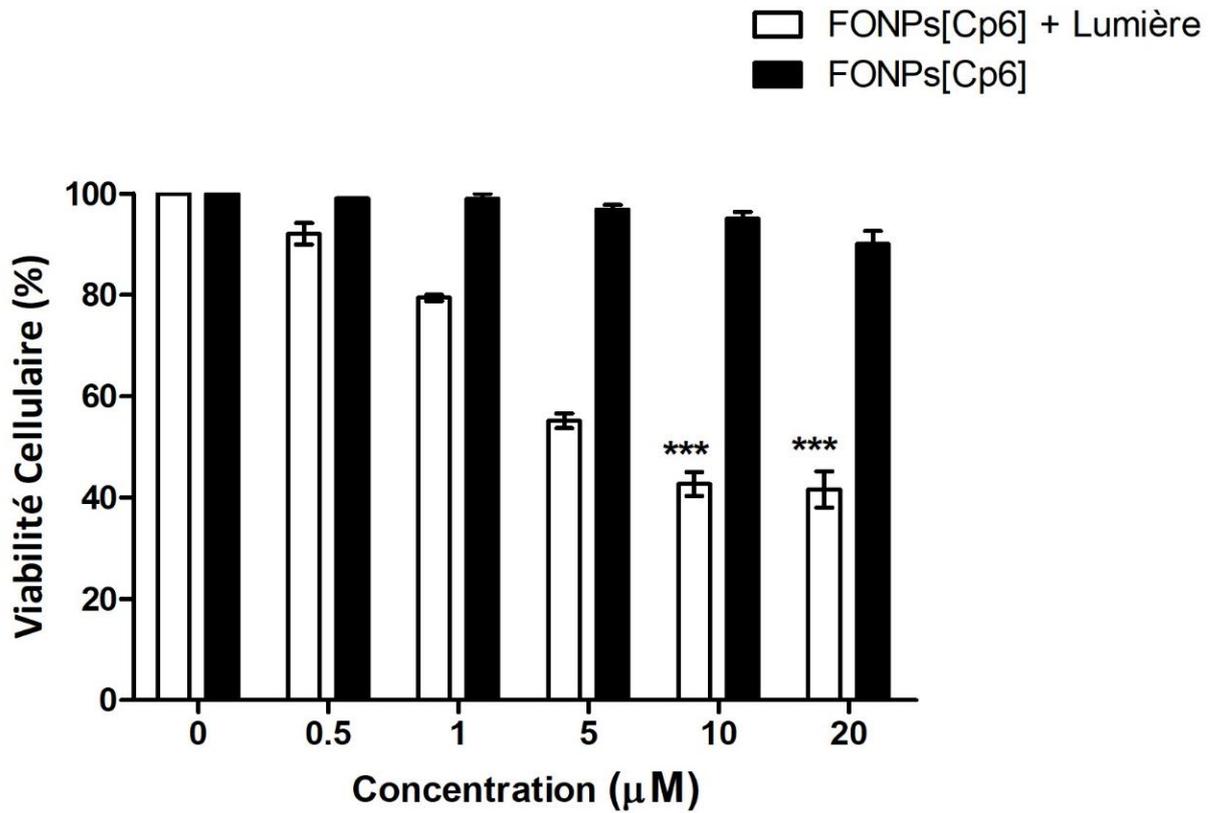


Figure 66. Effets cytotoxiques des FONPs[Cp6] sur les sphéroïdes de la lignée HT-29.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond et à fixation ultra-faible dans 200 μL de milieu de culture sans rouge de phénol, pendant 3-4 jours pour former les sphéroïdes. Ensuite, les sphéroïdes ont été traités à différentes concentrations de FONPs[Cp6]. Après 24 h d'incubation, les sphéroïdes ont été illuminés ou non. Après 48 h d'illumination, la viabilité cellulaire a été évalué par le test MTS/PMS. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n = 3). *** p < 0,001, par rapport au contrôle.

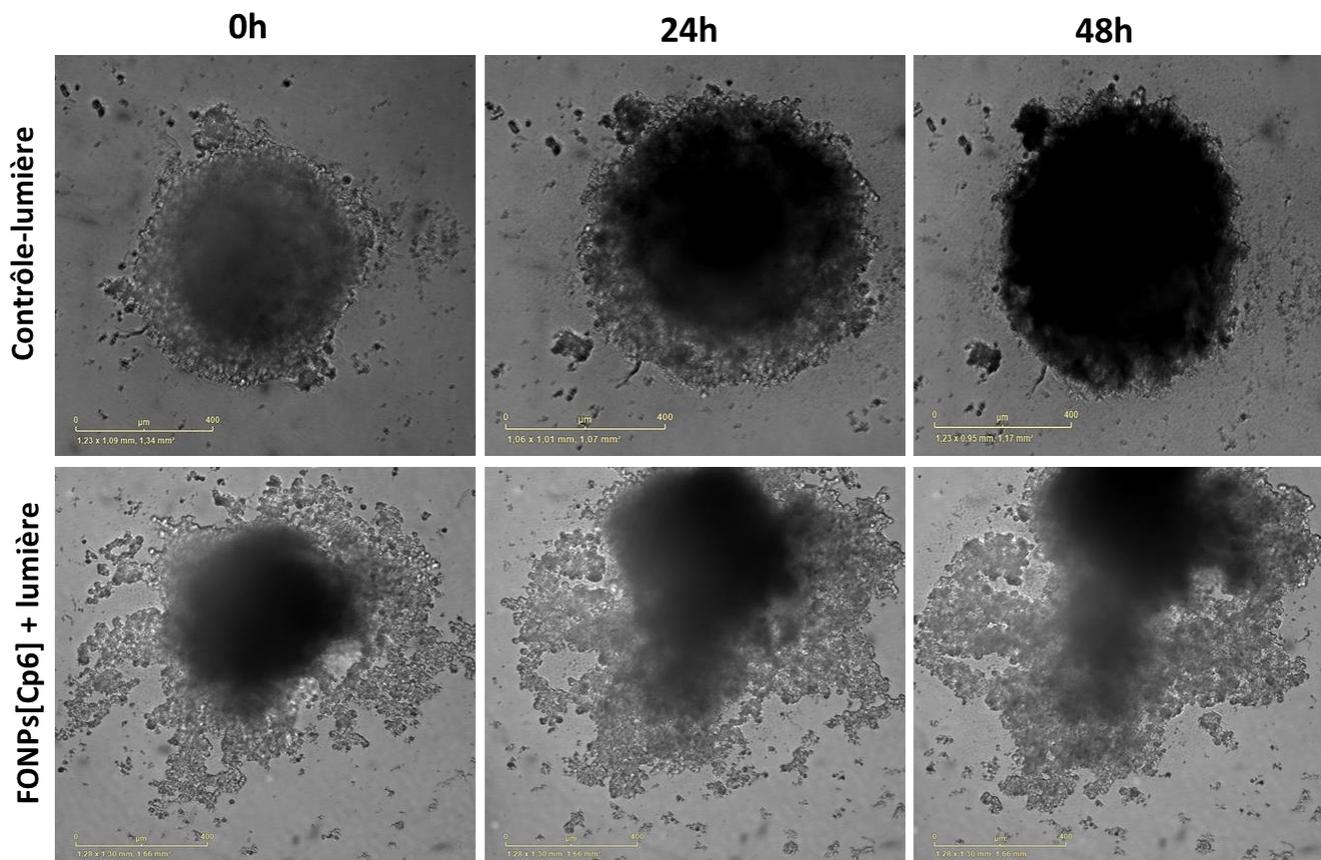


Figure 67. Images représentatives de l'évaluation morphologique des sphéroïdes de HT-29 au cours du temps. Les cellules ont été ensemencées et cultivées pendant 3-4 jours, puis traitées avec les FONPs[Cp6] à 6 µM. Les sphéroïdes ont ensuite été illuminées, et placées dans le système IncuCyte S3. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition à 0, 24 et 48 h (sous l'objectif $\times 10$). Barre d'échelle jaune = 400 µm.

Conclusion générale

Les résultats présentés ci-dessus sur les sphéroïdes de cellules HT29 permettent de confirmer les résultats obtenus en culture 2D après traitement PDT avec les FONPs[Cp6]. Ces nouvelles nanoparticules combinent plusieurs propriétés intéressantes, notamment une excellente solubilité dans l'eau et une grande stabilité, un rendement quantique élevé de production d'oxygène singulet (72 %) et une fluorescence dans le rouge voire l'infrarouge. De plus, les FONP[Cp6] présentent une distribution de taille comprise entre 10 nm et 20 nm, avec un diamètre moyen de 12,9 nm. En outre, ces nanoparticules se comportent comme des PS efficaces en induisant un effet cytotoxique *in vitro* en 2D et 3D contre les lignées cellulaires de CCR HCT116 et HT-29 après illumination, sans toxicité significative à l'obscurité. Cet effet phototoxique est médié par une forte production des ERO uniquement après photoactivation. De manière intéressante, les FONP[Cp6] ont montré une internalisation préférentielle dans les

lignées cellulaires CCR. L'analyse par microscopie confocale a confirmé que les FONP[Cp6] sont localisées dans les mitochondries, les lysosomes et le RE. Globalement, nous avons prouvé que les FONP[Cp6] induisent l'apoptose par la voie mitochondriale intrinsèque, notamment montrée par l'augmentation significative du ratio Bax/Bcl-2, mais également via l'autophagie montrée par une forte conversion du LC3. Par conséquent, nos résultats soulignent le potentiel de phototoxicité induit par ces nouvelles nanoparticules à base de Pp-18.

VII.2. Application d'un nouveau dérivé purpurinimide adamantane vectorisé dans nanocristaux de cellulose couplés à des cyclodextrines cationiques dans le traitement du CCR.

VII.2.1. Article 3

Synthesis of long-wavelength absorbing photosensitizer/nanoparticle conjugates and their in vitro PDT evaluation on colorectal cancer cell lines

Luce Janice Ndzimbou, **Rayan Chkair**, Gautier M.A. Ndong Ntoutoume, Mona Diab-Assaf, Guillaume Chemin, Bertrand Liagre, Frédérique Brégier and Vincent Sol

En révisions mineures, Comptes Rendus Chimie de l'Académie des sciences

Un autre exemple de la vectorisation de la Pp-18 est également étudié au cours de cette thèse. Dans le cadre d'un projet secondaire et partant toujours de la Pp-18, l'ouverture de l'anhydride exocyclique par une alkylamine primaire portant un groupe adamantane permet après cyclisation interne de créer une fonction imide. Cette réaction a conduit au dérivé purpurinimide adamantane (PIA) qui permet l'inclusion du photosensibilisateur (PS) dans la cavité de la cyclodextrine cationique couplée à des nanocristaux de cellulose (NCCs/ β -CD+) (**Figure 68**). Des résultats préliminaires *in vitro* ont montré que les complexes (NCCs/ β -CD+) améliorent l'internalisation des PS dans les lignées cellulaires de CCR, HCT116 et HT-29. En outre, le test MTT des complexes NCCs/ β -CD+/PIA a montré une phototoxicité dose-dépendante significative après illumination par la lumière rouge, avec des IC_{50} de 2,5 et 8,7 nM, pour HT116 et HT29, respectivement, et une très faible toxicité à l'obscurité. Les résultats actuels suggèrent que ces complexes nanoparticules/PS sont des outils prometteurs et utiles pour la PDT.

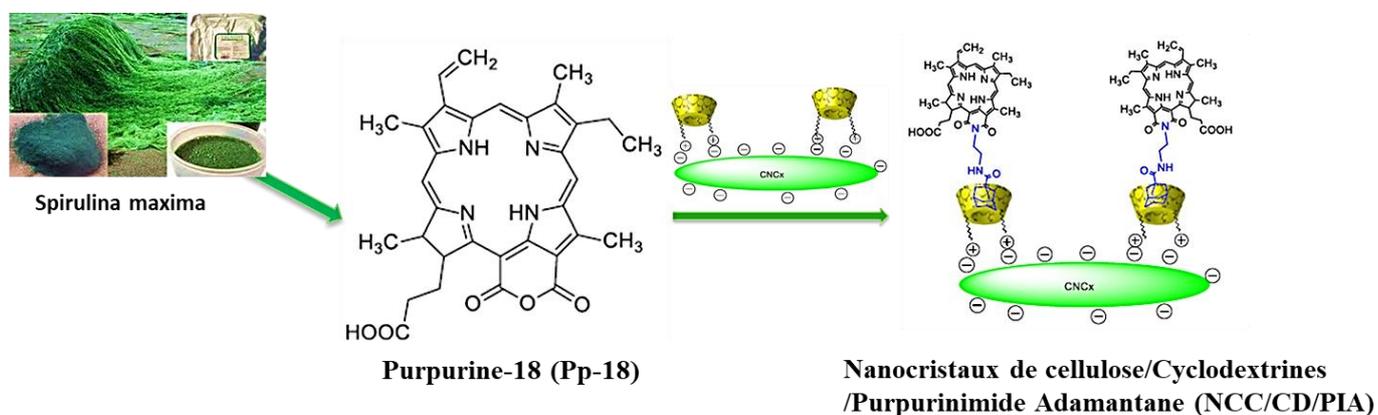


Figure 68. Vectorisation de la Pp-18 par les nanocristaux de cellulose.

1 **Synthesis of long-wavelength absorbing photosensitizer/nanoparticle**
2 **conjugates and their *in vitro* PDT evaluation on colorectal cancer cell lines**

3

4 Luce Janice Ndzimbou¹, Rayan Chkair¹, Gautier M.A. Ndong Ntoutoume¹, Mona Diab-Assaf²,
5 Guillaume Chemin¹, Bertrand Liagre¹, Frédérique Brégier¹ and Vincent Sol¹

6 ¹Univ. Limoges, LABCiS, UR 22722, F-87000 Limoges, France.

7 ² Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Hadath El Jebbeh,
8 Beyrouth 21219, Lebanon.

9

10 **ABSTRACT:** Starting from purpurin-18, a stable purpurin-18 imide derivative with intensive
11 absorption in near infrared has been synthesized. The opening of the exocycle anhydride by a
12 primary alkylamine bearing an adamantyl group, allow after internal cyclization to create an
13 imide function. This reaction led to purpurinimide adamantane derivative (PIA) which enables
14 photosensitizer inclusion in the cavity of cationic cyclodextrin coupled to cellulose nanocrystals
15 (CNCs/ β -CD⁺). Preliminary *in vitro* results showed that CNCs/ β -CD⁺ complexes improved
16 internalization of photosensitizers into HCT116 and HT-29 colorectal cancer cell lines.
17 Moreover, MTT assay of CNCs/ β -CD⁺/PIA complexes showed significant dose-dependent
18 phototoxicity after illumination with red light, with IC₅₀ of 2.5 and 8.7 nM, for HT116 and
19 HT29, respectively and very low dark toxicity. The current results suggest that these
20 nanoparticle/photosensitizer complexes are promising and useful tools for PDT.

21

22 **KEYWORDS:** purpurinimide, photosensitizers, cellulose nanocrystals, photodynamic therapy
23 (PDT), colorectal cancer.

24 1 INTRODUCTION

25 Colorectal cancer is the second most deadly cancer accounting for 9.4% of the nearly 10 million
26 worldwide cancer deaths in 2020;¹ it remains a major public health problem. Photodynamic
27 therapy (PDT) is an adjuvant or alternative treatment seen today as promising.² This
28 therapeutical approach requires the presence of molecular oxygen, the use of a photosensitizer
29 (PS), and irradiation with light of appropriate wavelength. Upon illumination, the PS produces
30 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and other reactive oxygen species (ROS) which induce multiple damage
31 to the tumor cell.^{3,4} Ideally, photosensitizers must be characterized by a high singlet oxygen
32 quantum yield and would not exhibit cytotoxicity in the dark; in addition, they must be able to
33 absorb light in the near-infrared (NIR) spectral region since NIR light has the deepest
34 penetration in animal tissues. Another key point to avoid unwanted side effects is the
35 preferential accumulation of PS in tumors.^{5,6} Thus, one approach to targeting solid tumors is to
36 exploit the enhanced permeability and retention (EPR) effect.⁷ Over the past decade a large
37 number of nanoparticle-based PS delivery systems have been developed.^{8,9} These nanocarrier
38 families include silica-,¹⁰ gold-,¹¹ and natural polymer-based nanoparticles.¹² Polysaccharides
39 have been widely explored for the design and development of nanocarriers due to their
40 numerous advantages, including high water solubility, good biocompatibility, low toxicity,
41 biodegradability and abundance of sources. We have recently reported the synthesis of
42 nanoparticles consisting of covalently bound porphyrins¹³ or pheophorbide a to modified
43 xylan.¹⁴ These nanoparticles exhibited a dose-dependent phototoxicity only when illuminated
44 with red light but their aggregation tendency, leading to a reduction in photodynamic efficiency,
45 presented a major drawback. To overcome this issue, nanoconjugates consisting of negatively
46 charged cellulose nanocrystals (CNCs) and cationic β -cyclodextrin were developed to
47 encapsulate protoporphyrin IX derivatives bearing an adamantane group.¹⁵ The *in vitro*
48 evaluations of this nanoparticle-based photosensitizer against HT-29 colorectal cancer cells

49 showed a clear increase in efficacy compared with the free photosensitizer; this nanoplatform
50 appears to be a very promising strategy for the vectorization of photosensitizers. Purpunin-18
51 (Pp-18) possesses a strong absorption band in the red region (702 nm in CHCl₃), making it a
52 potential photosensitizer for PDT, as red light penetrates deep into animal tissues.¹⁶
53 Unfortunately, the direct use of Pp-18 as photosensitizer is limited, due to the presence of a
54 cyclic anhydride, that readily opens after alkaline treatment or in biological media to form
55 chlorin p6 with a hypsochromic shift of the Q absorption band around 662-665 nm.¹⁷⁻¹⁹ In
56 addition, the high hydrophobicity of Pp-18 leads to its aggregation at physiological pH and
57 reduces its bioavailability.^{20,21} To overcome these issues, it has been shown that it was possible
58 to generate more stable photosensitizers such as purpurinimides with a bathochromic red-shift
59 and excellent *in vitro* and *in vivo* PDT efficacy.^{22,23} CNCs were obtained by sulfuric acid
60 hydrolysis of microcrystalline cellulose, which removed amorphous regions and introduced
61 negatively charged sulfate groups that cause electrostatic repulsion forces between suspended
62 particles.^{24,25} These negative charges promote the addition, via electrostatic coupling, of
63 positively charged β -cyclodextrin (β -CD⁺) previously functionalized with glycidyltrimethyl
64 ammonium chloride (GTAC).²⁶

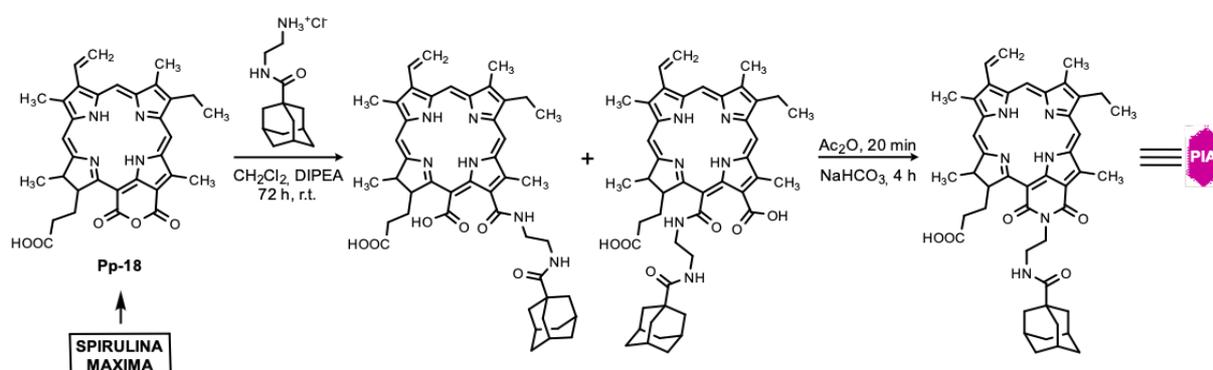
65 Firstly, in the present work, to yield a more stable purpurinimide photosensitizer with red-shift
66 light absorption, we transformed the Pp-18 anhydride ring into an imide ring to which is
67 attached an adamantyl group. The adamantyl moiety is a spherical entity with a diameter of 7
68 Å, which is perfectly matched to the cavity diameter of β -CD. Moreover, β -CD/adamantane
69 complexes have found several important applications in supramolecular chemistry and
70 biomedical applications due to their high stability.²⁷ In a second step, a complex between the
71 newly synthesized photosensitizer and celluloses-cyclodextrin nanoparticles was formed.
72 Finally, using PDT, we tested the antiproliferative activity of this conjugate against HCT116
73 and HT-29 colorectal cancer cell lines.

74 2 RESULTS AND DISCUSSION

75 2.1 Synthesis and characterization of the purpurinimide adamantane derivative (PIA)

76 The hemisynthesis of Pp-18 from chlorophyll a was first performed following a previously
77 reported procedure.²⁸ Pp-18 was then reacted with *N*-(2-aminoethyl)adamantane-1-
78 carboxamide chloride in the presence of diisopropylamine (DIPEA) to obtain the two chlorin-
79 *p6* derivatives following the opening of the Pp-18 anhydride exocycle. After solvent
80 evaporation, the treatment of the crude reaction mixture with acetic anhydride led to the
81 intramolecular cyclisation of the two chlorin *p6* derivatives. After purification by preparative
82 thin layer chromatography, purpurinimide adamantane derivative (PIA) was obtained in 32%
83 yield (Scheme 1). The chemical structure of PIA was confirmed by UV-Vis spectroscopy, ¹H
84 and ¹³C NMR, IR and HRMS (Fig. 1, Fig. 2 and Fig. S5-S10).

85

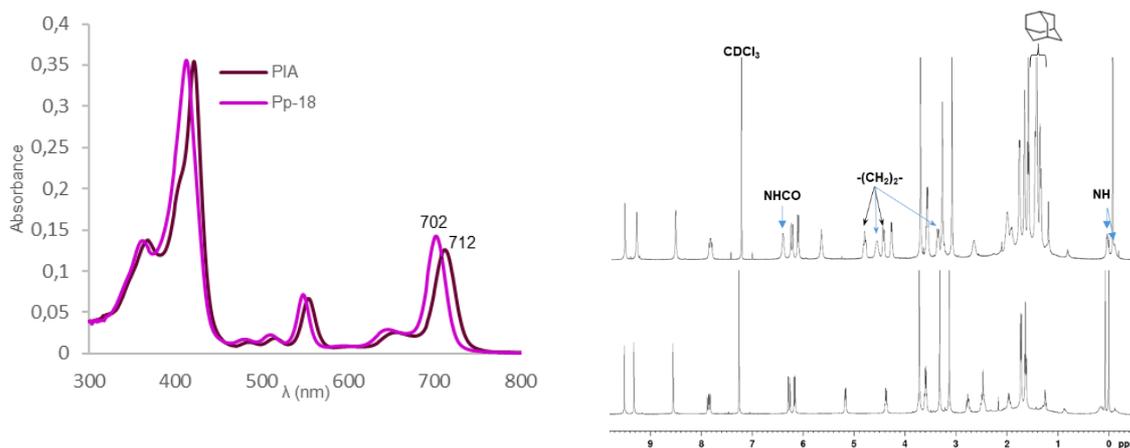


87 **Scheme 1.** Synthesis of the purpurinimide adamantane derivative (PIA)

88 UV-visible monitoring of the reaction showed that conversion of the anhydride ring of
89 purpurin-18 to the cyclic imide ring of PIA was accompanied by a shift in the absorption
90 maximum from 702 to 712 nm in CHCl₃ (Fig. 1). The ¹H NMR spectrum of PIA displayed the
91 characteristic signals belonging to hydrogens, methyl, ethyl and vinyl groups on β-pyrrolic
92 positions, shared with Pp-18. The signals at δ = 1.73 and δ = 1.38-1.55 ppm were assigned to
93 CH protons of the adamantyl moiety (Fig. 2). The broad singlet at δ = 6.45 ppm was assigned

94 to the NH amide. The two multiplets at $\delta = 4.84$ and 4.48 ppm were assigned to the protons of
95 the methylene group, close to the exocycle, while the two multiplets at $\delta = 4.60$ and 3.42 ppm
96 were assigned to the protons of the second methylene group, close to the adamantyl moiety
97 (Fig. 2). FTIR spectrum of PIA also displayed specific peaks at 3333 cm^{-1} (N-H stretching),
98 1725 cm^{-1} C=O stretching, 1679 cm^{-1} C=O (amide bond) stretching, 1641 cm^{-1} of N-H (amide
99 function), 1600 cm^{-1} (C=C stretching) (Fig. S10). HRMS analysis of PIA confirmed the
100 formation of the expected compound (calculated $[M + H]^+ = 769.4072$; found = 769.4080) (Fig.
101 S9).

102



103

104

105 Fig. 1. UV-Visible absorption spectra of Pp-18 and PIA in CHCl₃.

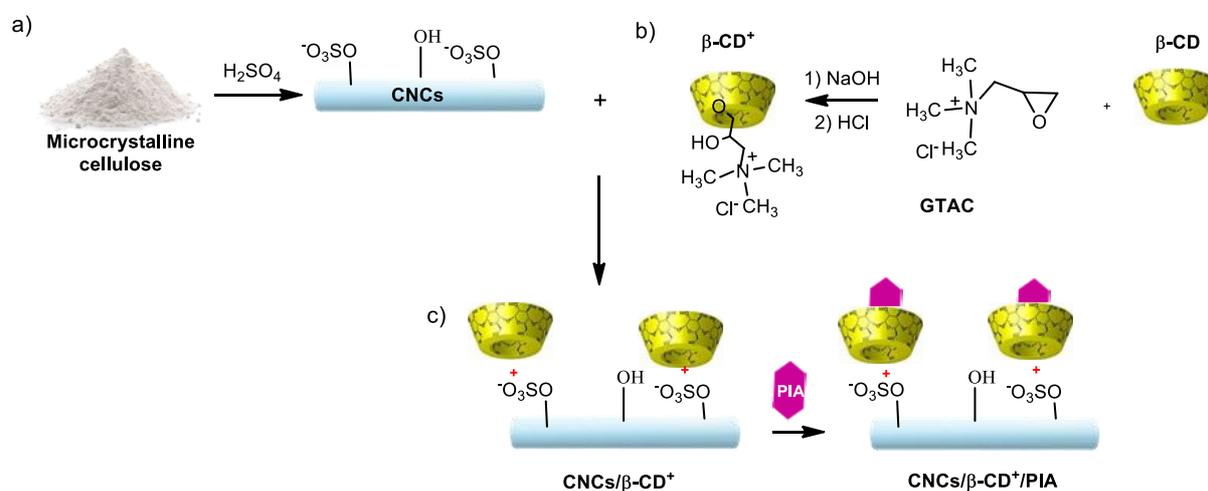
105 Fig. 2. Overlay ¹H NMR spectrum of Pp-18 and PIA in CDCl₃.

106 2.2 Synthesis and characterization of Cellulose Nanocrystals / Cationic β -Cyclodextrin/ 107 Purpurinimide adamantane derivative (CNCs/ β -CD+/PIA) complexes

108 After sulfuric acid hydrolysis of microcrystalline cellulose, CNCs were obtained in 29%
109 yield according to previously described methods (Scheme 2a).^{24,25} The high zeta potential value
110 of -51.8 ± 1.5 mV exhibited by CNCs (at 1.52/1000 w/w) (Fig. S1a) confirmed the presence

111 of negatively charged sulfate groups on the surface of CNCs.^{24,29} This absolute value, higher
112 than 30 mV, indicated a high degree of stability of the CNCs in aqueous suspension^{30,31}. FTIR
113 spectra of CNCs showed peaks at 1205 cm⁻¹ and 817 cm⁻¹ that were assigned to sulfate esters
114 groups on the CNCs surface, resulting from hydrolysis with sulfuric acid^{32,33} (Fig. S10). In
115 parallel, positive charges were introduced onto β -cyclodextrin by functionalization with a large
116 excess of glycidyltrimethylammonium chloride (GTAC) in alkaline aqueous medium (Scheme
117 2b) according to Chisholm and Wenzel.³⁴ Characterizations of the final product are in
118 agreement with literature data (Fig. S2 and S3).^{26,34} Finally, mixing β -CD⁺ with CNCs resulted
119 in the formation of CNCs/ β -CD⁺ complexes via electrostatic interaction (Scheme 2).²⁶ These
120 complexes were then separated from free β -CD⁺ by centrifugation for 10 min at 13,000 rpm.
121 To see how the characteristics have evolved after coupling, zeta potential measurements were
122 conducted on CNCs/ β -CD⁺ without dilution to determine their overall surface charge; their
123 hydrodynamic size was measured on a 21-fold dilution (Table 1, Fig. S1b). A significant
124 increase in zeta potential from -51.8 ± 1.5 mV for CNCs to 29.77 ± 2.67 mV for CNCs/ β -CD⁺
125 was observed (Table 1). This last value, close to 30 mV, indicated that the dispersion was
126 stable.³¹ Analyzed by dynamic light scattering (DLS), this suspension showed an apparent
127 hydrodynamic particle size of 438.97 ± 13 nm in comparison with 165.5 ± 2.1 nm for CNCs
128 (Fig. S1, Table 1). The FTIR spectrum of CNCs/ β -CD⁺ differs from that of CNCs with the
129 appearance of a new peak at 1478 cm⁻¹ attributed to the -N⁺-CH₃ group of β -CD⁺, indicating
130 the presence of β -CD⁺ on the CNCs surface, (FTIR spectrum of CNCs/ β -CD⁺/PIA, Fig. S10).
131 These data are a good indication that positively charged β -CD were successfully complexed
132 with CNCs. PIA was loaded into the cavity of the complexed β -CD⁺(Scheme 2c) thanks to the
133 hydrophobic nature of the adamantane group. Briefly, a solution of PIA in acetone was mixed
134 with aqueous CNCs/ β -CD⁺ under ultrasound and magnetic stirring. After reaction, complexes
135 were purified by centrifugation for 10 min at 10,000 rpm. A decrease in the zeta potential from

136 29.77 ± 2.67 mV for CNCs/ β -CD⁺ to 19.97 ± 0.15 for CNCs/ β -CD⁺/PIA was observed (Table
 137 1). This slight decrease of zeta potential value could be explained by the carboxylate group of
 138 PIA. This value around 20 mV indicated that the dispersion is relatively to moderately stable.³¹
 139 The successful inclusion of PIA in complexes was also confirmed by FT-IR spectroscopy (Fig.
 140 S10) with peaks at 1724 cm^{-1} due to C=O, 1679 cm^{-1} C=O (amide bond), 1641 cm^{-1} for
 141 vibrations of N-H (amide function), 1600 cm^{-1} (C=C). The concentration of PIA into CNCs/ β -
 142 CD⁺ complexes is determined by UV-Vis spectroscopy and was found around 3.65×10^{-4}
 143 mol/L.



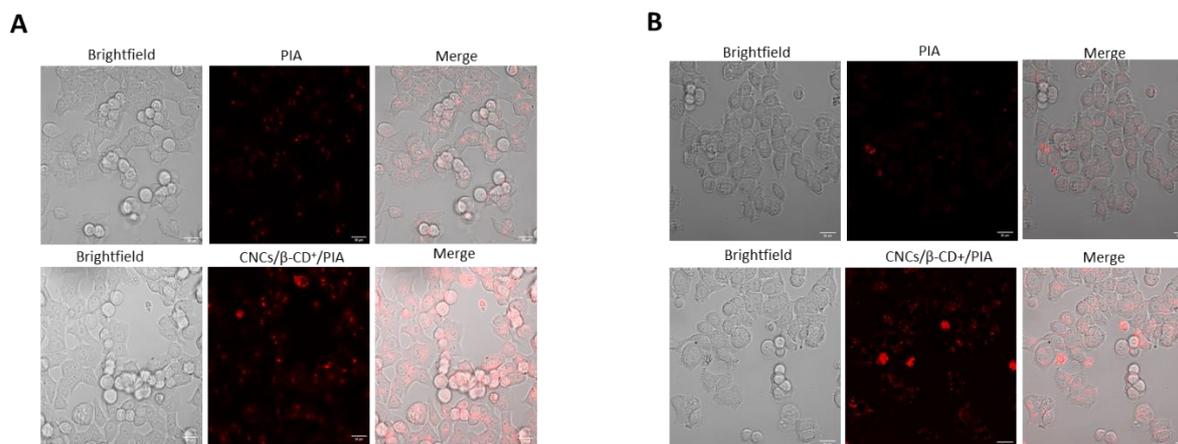
144
 145 **Scheme 2.** Synthesis of CNCs/ β -CD⁺/PIA complexes: a) Synthesis of CNCs, b) Synthesis of β -CD⁺, c) Inclusion
 146 of PIA into CNCs/ β -CD⁺ complexes.

147
 148 **Table 1.** Size distribution, PDI and zeta potential (ζ) of CNCs, CNCs/ β -CD⁺ and CNCs/ β -CD⁺/PIA

	CNCs	CNCs/ β -CD ⁺	CNCs/ β -CD ⁺ /PIA
Size (nm)	165.5 ± 2.1	438.97 ± 13	-
PDI	0.296	0.196	-
ζ (mV)	-51.8 ± 1.5	29.77 ± 2.67	19.97 ± 0.15

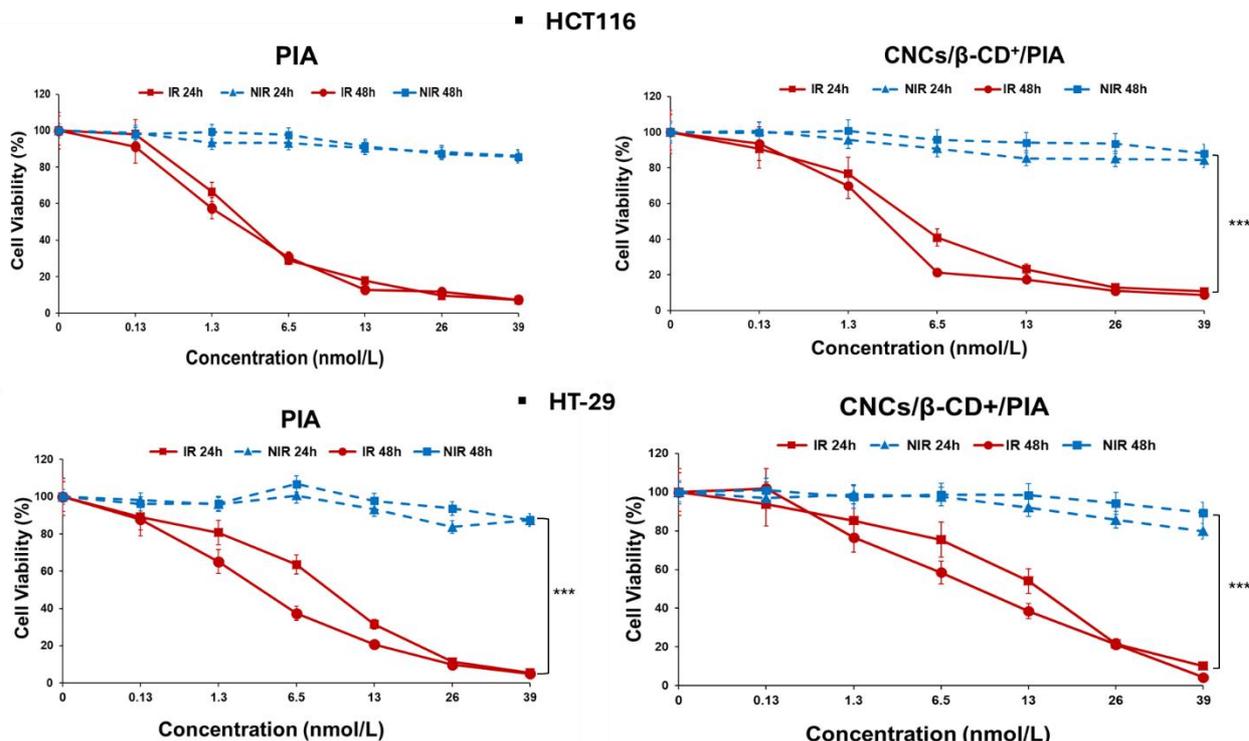
150 **2.3 *In vitro* biological studies**

151 PIA and CNCs/ β -CD⁺/PIA complexes uptakes by HCT116 and HT-29 cells were studied by
152 fluorescence confocal microscopy (Fig. 3).



153
154 **Fig. 3.** Cellular internalization of PS on human colorectal cancer cell lines HCT116 (A) and HT-29 (B). Cells were grown for 24h in the
155 chamber slides coated with type I collagen and acetic acid. Cells were then treated with PS at IC50 values. After 24h, the red fluorecence of
156 PS was assessed by confocal microscopy. ImageJ software (version 1.52p) was used to determine co-localization. White scale bar = 20 μ m.

157
158 Cellular accumulation was observed after 24 h incubation with PIA and CNCs/ β -CD⁺/PIA.
159 Incubations in presence of CNCs/ β -CD⁺/PIA led to increasing accumulation of
160 photosensitizers, regardless of the cell line. These results testify to the important role played by
161 CNCs/ β -CD⁺ in the cellular uptake of the photosensitizer and are in agreement with our
162 previous results.²⁶ Photodynamic activities of PIA alone and CNCs/ β -CD⁺/PIA complexes were
163 evaluated against HCT116 and HT-29 colorectal cancer cell lines using MTT assays (Fig. 4).
164 The cancer cell lines were incubated with different concentrations of CNCs/ β -CD⁺/PIA
165 complexes as aqueous solution or PIA alone in DMSO: 0.13, 1.3, 6.5, 13, 26 and 39 nM for 24
166 h. Cells were then illuminated at 650 nm (light dose 30 J/cm²) and then incubated in the dark
167 for 24 and 48 h. Within the concentration range tested, we observed a low cytotoxicity in the
168 dark. Under illumination, PIA alone and CNCs/ β -CD⁺/PIA cytotoxicities were much stronger
169 in comparison with the control tests in the dark.



170

171 **Fig. 4.** Cell viability against HCT116 and HT-29 colorectal cancer cells for photocytotoxicity (IR) (light, total light dose $30 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$; irradiation
 172 time 7 min, $\lambda=650 \text{ nm}$) and dark cytotoxicity (NIR) after 24 h incubation times of PIA alone and CNCs/ β -CD⁺/PIA complexes at concentrations
 173 of 0.13–39 nM. The percentage of cell viability was determined by an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
 174 assay, 24 h and 48 h after irradiation. Error bars represent the standard deviation of three replicate experiments. (IR = irradiated and NIR = non
 175 irradiated). Data are represented as mean \pm SEM (n = 3). *** p < 0.001 relative to the NIR at 48 h.

176

177 CNCs/ β -CD⁺ complexes alone were shown to only slightly reduce cancer cell proliferation after
 178 48 h;²⁶ we can therefore conclude that the antiproliferative efficacy observed in these
 179 experiments on the two cancer cell lines is mainly due to the presence of PIA in the CNCs/ β -
 180 CD⁺. In both cases, whether PIA is alone or complexed, the IC₅₀s after 48 h are very slightly
 181 lower than those obtained after 24 h (Table 2).

182

183

184

185

186 **Table 2.** IC₅₀ values of PIA and CNCs/β-CD+/PIA obtained using MTT assay

187 • *Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of three experiments. The statistical significance of results was evaluated using
 188 GraphPad Prism 5.0 by a two-tailed unpaired Student's t-test, as * p < 0.05 was considered statistically significant. * p < 0.05 , ** p < 0.01 *NS: not
 189 significant.

190

Cell Line	HCT116				P value (48h relative to 24h)	HT-29				P value (48h relative to 24h)
	24 h		48 h			24h		48 h		
Incubation time after irradiation (h)	IC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	IC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b		IC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	IC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	
PIA	2.6	-	2		0.3118 (NS)	8.7	-	3.1	-	0.0458 (*)
CNCs/β- CD+/PIA	4.3	22.9	2.5	13.3	0.0856 (NS)	10	53.2	8.7	46.2	0.0565 (NS)
P value (PIA relative to CNCs/β- CD+/PIA)	0.0306 (*)	-	0.0876 (NS)	-	-	0.0226 (*)	-	0.0054 (**)	-	-

191

192 ^a nmol PIA/L, ^b μg CNCs/β-CD+/PIA /mL

193 We observed dose-dependent antiproliferative effect in both colon cancer cell lines but HT-29
 194 cells were more resistant than HCT116, as previously observed during *in vitro* assay using these
 195 two cell lines.^{35,36} 48 h after photo-irradiation, IC₅₀ values of 2 and 3.1 nM were observed for
 196 HCT116 and HT-29, respectively. Encapsulation into CNCs/β-CD⁺ appeared to slightly
 197 decrease the toxicity of PIA. However, the IC₅₀ values remained in the nanomolar range, with
 198 IC₅₀ values of 2.5 and 8.7 nM against HCT116 and HT-29, respectively. The IC₅₀ values for
 199 the CNCs/β-CD⁺/PIA complex of 13.3 and 46.2 μg/mL against HCT116 and HT-29 are

200 relatively low in comparison with biotoxicity described in the literature.³⁷ Encapsulation of
201 PIA in complexes proves to be a relevant choice to solubilize it in aqueous media and will
202 facilitate its selective accumulation in the tumor tissues via enhanced permeation and retention
203 (EPR) effect. In comparison with previous work, CNCs/c- β -CD⁺/PIA showed stronger
204 photocytotoxicities than two different protoporphyrin IX (PpIX) adamantane derivatives
205 encapsulated in the same way (IC₅₀ values of 1000 nM and 420 nM).¹⁵ PIA and its
206 nanoformulation exhibited excellent PDT efficacies against cancer cell lines.

207 **3 Conclusion**

208 In conclusion, we describe in this work the synthesis of a new purpurin-18 imide derivative
209 bearing an adamantane moiety and the preparation of biocompatible CNCs/ β -CD⁺/PIA
210 complexes for PDT anticancer therapy. ¹H NMR, HRMS, UV-Visible and FTIR spectroscopies
211 indicated that purpurin-18 imide derivative and its inclusion complexes were successfully
212 obtained. The biological tests demonstrated that the resulting complexes possessed a very good
213 solubility in aqueous media, an increase of uptake of hydrophobic photosensitizer by cancer
214 cells, and excellent photodynamic efficacy (IC₅₀ = 2.5 and 8.7 nM against HCT116 and HT-29
215 cell lines respectively, 48 h after illumination). Based on these results, we can suggest that PIA
216 loaded CNCs/ β -CD⁺ is a promising tool for PDT anticancer therapy.

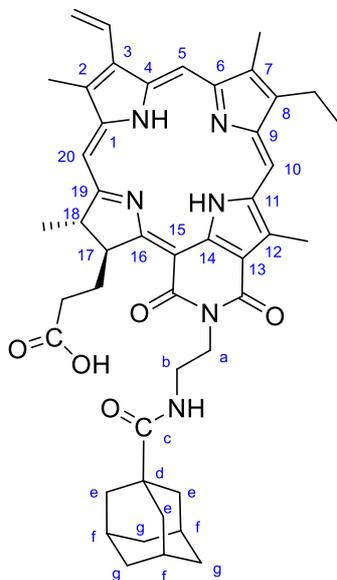
217 **4 Materials and methods**

218 **4.1 Materials**

219 For a list of materials, see Supplementary Information (SI).

220 **4.2 Methods**

221 **4.2.1 Synthesis of 131,151-N-(N-(2-[(1-Adamantylcarbonyl)amino]ethyl)cycloimide) chlorin p6**
222 **(purpurinimide adamantane derivative or PIA)**



223
224 **Fig. 5.** Structure and numbering of PIA

225 Purpurin-18 (90.8 mg, 0.1608 mmol) and *N*-2-(aminoethyl)adamantane-1-carboxamide
226 chloride (99.8mg, 0.3856 mmol) were dissolved in 10 mL of CH₂Cl₂ under argon atmosphere.
227 DIPEA (100 μL) was added and the resulting solution was stirred for 72 h at room temperature;
228 the color of the solution changed from purple to green indicating the formation of the chlorin
229 p6 derivative. Methylene chloride was evaporated and the residue was dissolved in 3 mL of
230 Ac₂O and stirred for 20 min; the color changed from green to purple indicating the formation
231 of the new imide cycle. The resulting mixture was diluted with 5% aqueous (90 mL) and was
232 stirred during 4 h. The product was extracted with CH₂Cl₂, washed with deionized water and
233 dried over MgSO₄. After evaporation, the purpurinimide was isolated by preparative thin layer
234 chromatography using 5% CHCl₃/MeOH as the eluent and crystallized from dichloromethane-
235 petroleum ether-cyclohexane. Yield 39.6 mg (32%).

236 CCM R_f (CHCl₃/MeOH 95:5) = 0.17. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H, ppm 9.54 (1 H, s, H10),
237 9.31 (1 H, s, H5), 8.55 (1 H, s, H20), 7.87 (1 H, dd, *J*=17.0 and 11.9 Hz, H3¹-CH), 6.45 (1H,
238 bs, NH), 6.28 (1 H, d, *J*=17.7 Hz, H3²-CH₂), 6.17 (1 H, d, *J*=11.4 Hz, H3²-CH₂), 5.69 (1H, m,

239 H17), 4.84 (1 H, m, a-CH₂), 4.60 (1H, m, b-CH₂), 4.48 (1H, d, *J*=13.4 Hz, a-CH₂), 4.32 (1 H,
240 m, 18-H), 3.76 (3 H, s, 12-CH₃), 3.59 (2 H, q, *J*=7.3 Hz, 8¹-CH₂), 3.42 (1H, d, *J*=13.1 Hz, b-
241 CH₂), 3.32 (3 H, s, 2-CH₃), 3.14 (3 H, s, 7-CH₃), 2.70 (1 H, m, 17¹-CH₂), 2.15-1.92 (3 H, m,
242 17¹-CH₂ and 17²-CH₂), 1.82 (3 H, d, *J*= 8.0 Hz, 18-CH₃), 1.73 (3 H, m, f-Ad), 1.66 (3 H, t,
243 *J*=7.5 Hz, 8²-CH₃), 1.53-1.38 (12 H, m, e-Ad et g-Ad), 1.10 and -0.10 (2 H, s, NH). ¹³C NMR
244 (125 MHz, CDCl₃): δ_c, ppm 179.8 (1C, Adamantane C=O), 176.5 (1C, C16), 175.8 (1C, C19),
245 170.4 (1C, COOH), 167.7 (2C, cycloimide C=O), 164.2 (1C, C14), 155.8 (1C, C6), 149.9 (1C,
246 C9), 145.6 (1C, C8), 143.4 (1C, C2), 139.0 (1C, C12), 137.25, 137.17 (2C, C3, C4), 136.40
247 (1C, C7), 131.5 (2C, C1, C11), 128.6 (1C, C3¹), 123.3 (1C, C3²), 115.1 (1, C13), 107.0 (1C,
248 C10), 102.6 (1C, C5), 97.9 (1C, C15), 94.9 (1C, C20), 53.5 (1C, C17), 50.3 (1C, C18), 40.5
249 (1C, C-Ad_d), 38.64 (3C, CH₂-Ad), 38.56 (1C, NCH₂CH₂NH), 38.22 (1C, NCH₂CH₂NH), 36.21
250 (3C, CH₂-Ad), 32.19 (1C, C17¹-CH₂), 31.37 (1C, C17²-CH₂), 27.77 (3C, CH-Ad_f), 23.72 (1C,
251 18-CH₃), 19.40 (1C, 8-CH₂), 17.43 (1C, 8-CH₃), 12.4 (1C, 12-CH₃), 11.9 (1C, 2-CH₃), 11.1
252 (1C, 7-CH₃). FTIR/ATR, ν/cm⁻¹: 3333, 2961, 2904, 2850, 1725, 1679, 1641, 1600, 1524.
253 HRMS, m/z: [M + H]⁺ calculated for C₄₆H₅₂N₆O₅ 769.4072 found 769.4080. UV-Visible in
254 DMSO, λ_{max}/nm (ε, 10⁻³ L.mol⁻¹.cm⁻¹): 420 (78), 512 (6.4), 550 (14), 648 (5), 705 (28). UV-
255 Visible in CHCl₃, λ_{max}/nm (ε, 10⁻³ L.mol⁻¹.cm⁻¹): 421 (120), 515 (6), 554 (23), 656 (8), 712
256 (44).

257 4.2.2 Production of cellulose nanocrystals (CNCs)

258 Microcrystalline cellulose (MCC) was used as starting material to obtain cellulose nanocrystals
259 according to previously reported methods.^{24,25} Briefly, 2 g of microcrystalline cellulose was
260 mixed with 40 mL of 61 wt % H₂SO₄ using a magnetic stirrer at 45 °C for 1 h 30 min. The
261 suspension was diluted with 150 mL of cold distilled water (4°C) to stop the reaction. Then,
262 CNCs were pelleted by centrifugation for 10 min at 3,700 rpm and supernatant was discarded.
263 The pellets were resuspended in water to eliminate excess acid and impurities and then

264 centrifuged for 10 min at 3,700 rpm Supernatant was discarded. The pellet was resuspended in
265 water and centrifuged for 10 min at 3,700 rpm. This supernatant containing the CNCs was
266 dialyzed against distilled water by using membrane tubing (6-8 KDa cutoff) for 5-6 days.
267 Dialysis water was changed two or three times each day. After dialysis, the resulting solution
268 was completely dispersed by ultrasonic treatment in an ice bath using a Elmasonic S15 for 15
269 min to give the desired colloidal suspension. After freeze drying, the yield was determined as
270 29 % using the following equation (1). Hydrodynamic size, polydispersity index and zeta
271 potential measurements were carried out with a suspension at 0.152 (wt.%).

272 FTIR/ATR ν/cm^{-1} : 3337, 2900, 1650, 1425, 1369, 1333, 1317, 1281, 1205, 1161, 1111, 1033,
273 1057, 898, 817 and 776.

274 The CNCs yield (%) was calculated following the Eq. (1) as below:

$$275 \quad \text{CNCs yield (\%)} = \frac{M_2 \times V_1}{M_1 \times V_2} \times 100 \quad (1)$$

276 where M_1 represents the mass of MCC; M_2 represents the mass of aliquot lyophilized CNCs;
277 V_1 represents the total volume of collected supernatant CNCs suspension; V_2 represents the
278 volume of the aliquot of CNCs suspension to be lyophilized.

279 **4.2.3 Cationic β -cyclodextrin ($\beta\text{-CD}^+$) synthesis**

280 Cationic β -cyclodextrin was prepared by reacting the native β -cyclodextrin ($\beta\text{-CD}$) with
281 glycidyltrimethylammonium chloride (GTAC)³⁴. To a round-bottomed flask (100 mL), were
282 added 20 mL of distilled water and 3.0008 g (3.08 mmol) of $\beta\text{-CD}$. pH was adjusted to 12 with
283 NaOH (2M). Then GTAC, 14.2 mL (106 mmol, 34.5 equiv) was added to the mixture. The
284 reaction mixture was stirred at 50 °C for 5 days. The pH was adjusted to 6 with the addition of
285 HCl (2M) and stirring for 30 min at room temperature. The reaction mixture was dialyzed
286 against distilled water in a dialysis tubing (MWCO Molecular weight cutoff: 500 Da) for 27 h,
287 distilled water was replaced once. After dialysis, the volume of the colorless liquid was brought

288 up to 250 mL with distilled water. Aliquots of this solution were lyophilized and characterized.
289 Degree of substitution (DS) = 2 was determined by integrating the appropriate signals of the ^1H
290 NMR spectrum.

291 ^1H NMR (500 MHz, D_2O): δ (ppm) = 5.33 (1H, d, J = 5.75 Hz), 4.48 (2H, m), 4.35-4.26 (1H,
292 m), 4.08-3.81 (6H, m), 3.78-3.69 (2H, m), 3.64 (4H, m), 3.6-3.42 (6H, m), 3.6-3.42 (6H, m),
293 3.38-3.33 (2H) and 3.27 (27H, s). FTIR/ATR (cm^{-1}): 3345, 2929, 1638, 1478, 1418, 1353, 1148,
294 1108 and 1024.

295 **4.2.4 Preparation of CNCs/ β -CD $^+$**

296 CNCs/ β -CD $^+$ complex was prepared as previously described with slight modification²⁶. 40 mL
297 of β -CD $^+$ (1.42 mg/mL) was added slowly to 20 mL of CNCs (1.42 mg/mL) under ultrasound
298 in an ice bath for 15 min and stirred overnight at room temperature. The mixture was then
299 centrifuged at 13,000 rpm for 10 min to eliminate free β -CD $^+$. The precipitate was dispersed in
300 20 mL of distilled water. The final solution was used to encapsulate PIA.

301 **4.2.5 Preparation of purpurinimide-loaded cellulose nanocrystal/cationic- β -cyclodextrin** 302 **(CNCs/ β -CD $^+$ /PIA)**

303 5 mg of PIA were dissolved in 800 μL of acetone and introduced into 11 mL of aqueous
304 CNCs/ β -CD $^+$ suspension under ultrasound in an ice bath for 5 min. The solution was then
305 protected from light and stirred for 1 h 25 min in an ice bath. The complex was centrifuged at
306 10,000 rpm for 10 min to eliminate free PIA that remains in the supernatant. The pellet was
307 redispersed in 11 mL of distilled water to form the final suspension of inclusion complex.
308 Aliquots (0.5 mL) of this final suspension were lyophilized and then solubilized in DMSO to
309 determine the loading amount of PIA in CNCs/ β -CD $^+$ /PIA, by measurement of absorbance at
310 420 nm. PIA concentration in CNCs/ β -CD $^+$ /PIA complex was 3.65×10^{-4} mol/L. To determine
311 the overall surface charge of CNCs/ β -CD $^+$ /PIA inclusion complex, the zeta potential of the
312 sample was measured without dilution.

313 FTIR/ATR (cm^{-1}): 3338, 2969, 2904, 2852, 1724, 1679, 1641, 1600, 1526, 1479, 1455, 1426,
314 1369, 1136, 1315, 1281, 1248, 1205, 1161, 1110, 1056, 1032, 900, 881 and 791.

315 **4.2.6 *In Vitro* Photo-Irradiation Studies**

316 The two human colorectal cancer cell lines used, HT-29 and HCT116, were provided by the
317 American Type Culture Collection (ATCC-LGC Standards, Mosheim, France). Both cell lines
318 were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-
319 glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin [All reagents were purchased
320 from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France)]. Cells were cultured in a humidified atmosphere
321 with 5% CO_2 at 37 °C. For all experiments, HCT116 cells were seeded at 1.2×10^4 , and HT-29
322 cells at 2.1×10^4 cells/ cm^2 .

323 The PDT protocol was performed as follows: 4×10^3 and 7×10^3 cells/well for HCT116 and HT-
324 29 respectively were seeded into 96-well plates. Cells were grown for 24 h before exposure or
325 not to 0.13, 1.3, 6.5, 13, 26 and 39 nM of PIA in DMSO and CNCs/ $\beta\text{-CD}^+$ /PIA (aqueous
326 suspension). After 24 h, a red phenol-free medium was added before exposure or not with 650
327 nm ($30 \text{ J/cm}^2 - 7 \text{ min}$) delivered from the light source PDT TP-1 (Cosmedico Medizintechnik
328 GmbH, Schwenningen, Germany). After irradiation, the cells were incubated at 37°C for 24
329 and 48 h for further analysis.

330 Cancer cell viability was assessed by MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
331 diphenyltetrazolium bromide method (from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).
332 MTT (5 g/L) was added 24 h and 48 h after irradiation. After 3 h of incubation, 100 μL of
333 DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals and absorbance was recorded
334 at 550 nm, using a microplate reader (Thermoscientific MULTISKAN FC). The absorbance
335 [A] values \pm standard deviation was the mean of three experiments. The percent of viability
336 was calculated using the following equation (2):

337
$$\text{Viability (\%)} = \frac{[A]_{\text{treated}}}{[A]_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

338 In which [A]_{treated} is the absorbance of the treated cells and the absorbance of the negative
339 control cells is [A]_{control}.

340

341 **4.2.7 Cellular internalization by confocal microscopy**

342 To confirm the cellular uptake, HCT116 and HT-29 cells were seeded for 24 h before treatment
343 with PIA or CNCs/β-CD+/PIA complexes at IC₅₀ concentrations in chamber slides (ibidi μ-
344 Slide 8 well; Clinisciences, Martinsried, Germany) coated with a type I collagen (3 mg/mL)
345 with acetic acid (20 mM) gel. Photos were taken using a confocal microscope (laser Zeiss LSM
346 510 Meta—×1000). Co-localization was assessed using the ImageJ software (version 1.52p)

347 **Acknowledgements**

348 The authors acknowledge logistical and financial support from Campus France, “Agence
349 Nationale des Bourses du Gabon” and ‘Conseil Régional de Nouvelle Aquitaine’. They wish to
350 thank Dr. Cyril Colas (ICOA-Univ. Orléans) for ESI-HRMS analyses and Dr. Yves
351 Champavier from BISCEm platform for NMR analysis. They are indebted to Dr. Michel
352 Guilloton for his help in manuscript editing.

353

354 **Supplementary data**

355 Supplementary data about procedure for the synthesis and spectra for this article can be found
356 online at

357

358

359

- 361 (1) Xi, Y.; Xu, P. Global Colorectal Cancer Burden in 2020 and Projections to 2040. *Transl Oncol* **2021**,
362 *14* (10), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>.
- 363 (2) Rodrigues, J. A.; Correia, J. H. Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer: An Update and a Look
364 to the Future. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (15), 12204. <https://doi.org/10.3390/ijms241512204>.
- 365 (3) Pass, H. I. Photodynamic Therapy in Oncology: Mechanisms and Clinical Use. *J Natl Cancer Inst*
366 **1993**, *85* (6), 443–456. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.6.443>.
- 367 (4) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korblik, M.; Moan, J.; Peng,
368 Q. Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* **1998**, *90* (12), 889–905.
369 <https://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>.
- 370 (5) Simões, J. C. S.; Sarpaki, S.; Papadimitroulas, P.; Therrien, B.; Loudos, G. Conjugated
371 Photosensitizers for Imaging and PDT in Cancer Research. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (23), 14119–
372 14150. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00047>.
- 373 (6) Abrahams, H.; Hamblin, M. R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem J* **2016**,
374 *473* (4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
- 375 (7) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer
376 Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent
377 Smancs. *Cancer Res* **1986**, *46* (12 Part 1), 6387–6392.
- 378 (8) Kumar, A. V. P.; Dubey, S. K.; Tiwari, S.; Puri, A.; Hejmady, S.; Gorain, B.; Kesharwani, P. Recent
379 Advances in Nanoparticles Mediated Photothermal Therapy Induced Tumor Regression. *Int J*
380 *Pharma* **2021**, *606*, 120848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120848>.
- 381 (9) Mesquita, M. Q.; Dias, C. J.; Gamelas, S.; Fardilha, M.; Neves, M. G. P. M. S.; Faustino, M. A. F.
382 An Insight on the Role of Photosensitizer Nanocarriers for Photodynamic Therapy. *An. Acad. Bras.*
383 *Ciênc.* **2018**, *90*, 1101–1130. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170800>.
- 384 (10) Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.-O. Silica-Based
385 Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications. *Nanoscale* **2010**, *2* (7), 1083–1095.
386 <https://doi.org/10.1039/C0NR00096E>.
- 387 (11) García Calavia, P.; Bruce, G.; Pérez-García, L.; Russell, D. A. Photosensitizer-Gold Nanoparticle
388 Conjugates for Photodynamic Therapy of Cancer. *Photochem Photobiol Sci* **2018**, *17* (11), 1534–
389 1552. <https://doi.org/10.1039/c8pp00271a>.
- 390 (12) Li, L.; Huh, K. M. Polymeric Nanocarrier Systems for Photodynamic Therapy. *Biomater Res* **2014**,
391 *18* (1), 19. <https://doi.org/10.1186/2055-7124-18-19>.
- 392 (13) Bouramtane, S.; Bretin, L.; Godard, J.; Pinon, A.; Champavier, Y.; Launay, Y.; Léger, D.; Liagre, B.;
393 Sol, V.; Chaleix, V.; Brégier, F. Design and Synthesis of Triphenylphosphonium-Porphyrin@xylan
394 Nanoparticles for Anticancer Photodynamic Therapy. *Comptes Rendus. Chimie* **2021**, *24* (S3), 1–15.
395 <https://doi.org/10.5802/crchim.108>.
- 396 (14) Bouramtane, S.; Bretin, L.; Pinon, A.; Leger, D.; Liagre, B.; Perez, D. D. S.; Launay, Y.; Brégier, F.;
397 Sol, V.; Chaleix, V. Acetylxylan-Pheophorbide-a Nanoparticles Designed for Tumor-Targeted
398 Photodynamic Therapy. *J Appl Polym Sci* **2021**, *138* (32), 50799. <https://doi.org/10.1002/app.50799>.
- 399 (15) Ndong Ntoutoume, G. M. A.; Granet, R.; Mbakidi, J.-P.; Constantin, E.; Bretin, L.; Léger, D. Y.;
400 Liagre, B.; Chaleix, V.; Brégier, F.; Sol, V. Design and Synthesis of Zinc Protoporphyrin IX-
401 Adamantane/Cyclodextrin/Cellulose Nanocrystals Complexes for Anticancer Photodynamic Therapy.
402 *Bioorg Med Chem Lett* **2021**, *41*, 128024. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128024>.
- 403 (16) Morgan, A. R.; Garbo, G. M.; Kreimer-Birnbaum, M.; Keck, R. W.; Chaudhuri, K.; Selman, S. H.
404 Morphological Study of the Combined Effect of Purpurin Derivatives and Light on Transplantable
405 Rat Bladder Tumors. *Cancer Res* **1987**, *47* (2), 496–498.
- 406 (17) Mironov, A. F.; Levinson, E. G. Synthesis and Properties of Ether-Bonded Porphyrin-Chlorin
407 Dimers. In *Photodynamic Therapy of Cancer II*; SPIE, 1995; Vol. 2325, pp 312–320.
408 <https://doi.org/10.1117/12.199161>.
- 409 (18) Mironov, A. F.; Lebedeva, V. S.; Yakubovskaya, R. I.; Kazachkina, N. I.; Fomina, G. I. Chlorins
410 with Six-Membered Imide Ring as Prospective Sensitizers for Cancer PDT. In *Photochemotherapy of*
411 *Cancer and Other Diseases*; SPIE, 1999; Vol. 3563, pp 59–67. <https://doi.org/10.1117/12.339119>.
- 412 (19) Sharma, S.; Dube, A.; Bose, B.; Gupta, P. K. Pharmacokinetics and Phototoxicity of Purpurin-18 in
413 Human Colon Carcinoma Cells Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Cancer Chemother*
414 *Pharmacol* **2006**, *57* (4), 500–506. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0072-x>.

- 415 (20) Pavlíčková, V.; Škubník, J.; Jurášek, M.; Rimpelová, S. Advances in Purpurin 18 Research: On
416 Cancer Therapy. *Appl Sci* **2021**, *11* (5), 2254. <https://doi.org/10.3390/app11052254>.
- 417 (21) Pavlíčková, V.; Rimpelová, S.; Jurášek, M.; Záruba, K.; Fähnrich, J.; Křížová, I.; Bejček, J.;
418 Rottnerová, Z.; Spiwok, V.; Drašar, P.; Ruml, T. PEGylated Purpurin 18 with Improved Solubility:
419 Potent Compounds for Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules* **2019**, *24* (24), 4477.
420 <https://doi.org/10.3390/molecules24244477>.
- 421 (22) Cui, B. C.; Yoon, I.; Li, J. Z.; Lee, W. K.; Shim, Y. K. Synthesis and Characterization of Novel
422 Purpurinimides as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Int J Mol Sci* **2014**, *15* (5), 8091–
423 8105. <https://doi.org/10.3390/ijms15058091>.
- 424 (23) Zheng, G.; Potter, W. R.; Camacho, S. H.; Missert, J. R.; Wang, G.; Bellnier, D. A.; Henderson, B.
425 W.; Rodgers, M. A. J.; Dougherty, T. J.; Pandey, R. K. Synthesis, Photophysical Properties, Tumor
426 Uptake, and Preliminary in Vivo Photosensitizing Efficacy of a Homologous Series of 3-(1'-
427 Alkyloxy)Ethyl-3-Devinylpurpurin-18-N-Alkylimides with Variable Lipophilicity. *J. Med. Chem.*
428 **2001**, *44* (10), 1540–1559. <https://doi.org/10.1021/jm0005510>.
- 429 (24) Kian, L. K.; Jawaid, M.; Ariffin, H.; Karim, Z. Isolation and Characterization of Nanocrystalline
430 Cellulose from Roselle-Derived Microcrystalline Cellulose. *Int J Biol Macromol* **2018**, *114*, 54–63.
431 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.065>.
- 432 (25) Hachaichi, A.; Kouini, B.; Kian, L. K.; Asim, M.; Fouad, H.; Jawaid, M.; Sain, M. Nanocrystalline
433 Cellulose from Microcrystalline Cellulose of Date Palm Fibers as a Promising Candidate for Bio-
434 Nanocomposites: Isolation and Characterization. *Materials* **2021**, *14* (18), 5313.
435 <https://doi.org/10.3390/ma14185313>.
- 436 (26) Ndong Ntoutoume, G. M. A.; Granet, R.; Mbakidi, J. P.; Brégier, F.; Léger, D. Y.; Fidanzi-Dugas,
437 C.; Lequart, V.; Joly, N.; Liagre, B.; Chaleix, V.; Sol, V. Development of Curcumin-
438 Cyclodextrin/Cellulose Nanocrystals Complexes: New Anticancer Drug Delivery Systems. *Bioorg*
439 *Medl Chem Lett* **2016**, *26* (3), 941–945.
- 440 (27) Granadero, D.; Bordello, J.; Pérez-Alvite, M. J.; Novo, M.; Al-Soufi, W. Host-Guest Complexation
441 Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Adamantane–Cyclodextrin Inclusion. *Int J Mol*
442 *Sci* **2010**, *11* (1), 173–188. <https://doi.org/10.3390/ijms11010173>.
- 443 (28) Drogat, N.; Barrière, M.; Granet, R.; Sol, V.; Krausz, P. High Yield Preparation of Purpurin-18 from
444 *Spirulina Maxima*. *Dyes and Pigments* **2011**, *88* (1), 125–127.
445 <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.05.006>.
- 446 (29) Dong, X. M.; Revol, J.-F.; GRAY, D. G. Effect of Microcrystallite Preparation Conditions on the
447 Formation of Colloid Crystals of Cellulose. *Cellulose* **1998**, *5* (1), 19–32.
448 <https://doi.org/10.1023/A:1009260511939>.
- 449 (30) Su, Y.; Gong, L.; Chen, D. Dispersion Stability and Thermophysical Properties of Environmentally
450 Friendly Graphite Oil–Based Nanofluids Used in Machining. *Adv Mech Eng* **2016**, *8* (1),
451 1687814015627978. <https://doi.org/10.1177/1687814015627978>.
- 452 (31) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *J Controlled*
453 *Release* **2016**, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- 454 (32) Lu, P.; Hsieh, Y.-L. Preparation and Properties of Cellulose Nanocrystals: Rods, Spheres, and
455 Network. *Carbohydr Polym* **2010**, *82* (2), 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.073>.
- 456 (33) Arnata, I. W.; Suprihatin, S.; Fahma, F.; Richana, N.; Sunarti, T. C. Cationic Modification of
457 Nanocrystalline Cellulose from Sago Fronds. *Cellulose* **2020**, *27* (6), 3121–3141.
458 <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02955-3>.
- 459 (34) Chisholm, C. D.; Wenzel, T. J. Enantiomeric Discrimination of Aromatic-Containing Anionic
460 Substrates Using Cationic Cyclodextrins. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22* (1), 62–68.
461 <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.12.001>.
- 462 (35) Bouramtane, S.; Bretin, L.; Pinon, A.; Leger, D.; Liagre, B.; Richard, L.; Brégier, F.; Sol, V.;
463 Chaleix, V. Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles for Anticancer Photodynamic Therapy.
464 *Carbohydr Polym* **2019**, *213*, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.070>.
- 465 (36) Bretin, L.; Pinon, A.; Bouramtane, S.; Ouk, C.; Richard, L.; Perrin, M.-L.; Chaunavel, A.; Carrion,
466 C.; Bregier, F.; Sol, V.; Chaleix, V.; Leger, D. Y.; Liagre, B. Photodynamic Therapy Activity of New
467 Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*
468 (10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101474>.
- 469 (37) Hanif, Z.; Ahmed, F. R.; Shin, S. W.; Kim, Y.-K.; Um, S. H. Size- and Dose-Dependent Toxicity of
470 Cellulose Nanocrystals (CNC) on Human Fibroblasts and Colon Adenocarcinoma. *Colloids Surf, B*
471 **2014**, *119*, 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.018>.

VII.2.1.1. Résultats supplémentaires d'application des NCCs/ β -CD+ dans le traitement du CCR : induction de la mort cellulaire apoptotique par les NCCs/ β -CD+/PIA

L'apoptose est fréquemment observée après un traitement par PDT. Donc, après avoir montré l'effet cytotoxique du PIA seul et du PIA nanovectorisé (NCCs/ β -CD+/PIA) sur les deux lignées de CCR : HCT116 et HT-29, l'expression des protéines liées à l'apoptose a été analysée par Western blot. Pour rappel, le clivage de la pro-caspase-3 provoque son activation, ce qui entraîne à son tour le clivage de la PARP, la rendant ainsi inactive.

Pour cela, les cellules HCT116 ont étéensemencées et cultivées pendant 24 h, puis traitées ou non avec le PIA et les NCCs/ β -CD+/PIA. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été illuminées ou non. Après 48 h d'illumination, l'expression des protéines liées a été évaluée par Western blot.

Les résultats montrent que la photoactivation du PIA et des nanoparticules NCCs/ β -CD+/PIA induit le clivage de la PARP dans les cellules HCT116, avec un très fort clivage observé avec les nanoparticules par rapport au PIA 48 h post-PDT (**Figure 69**). Ces résultats révèlent que ces nanoparticules entraînent l'induction de la mort cellulaire apoptotique dans les cellules HCT116.

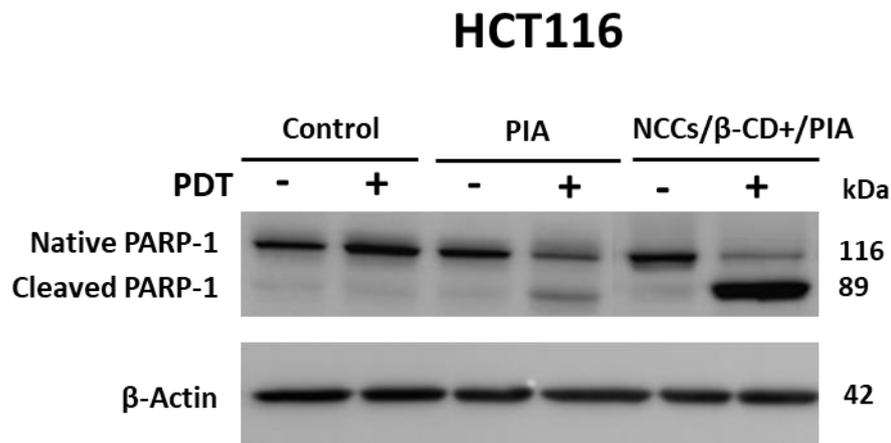


Figure 69. Effets de la photoactivation des NCCs/ β -CD+/PIA et du PIA seul sur l'expression des protéines dans les cellules HCT116. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h, puis traitées avec les composés aux IC_{50} déterminées, avant d'être illuminées. L'expression de la PARP a été évaluée par Western blot 48 h après l'illumination. La β -actine sert comme protéine de référence.

En l'absence de réparation par PARP-1, l'ADN est clivé par des endonucléases. Pour évaluer le processus apoptotique aux stades ultérieurs et examiner les changements nucléaires induits par les NCCs/ β -CD+/PIA, la fragmentation de l'ADN a été réalisée 24 et 48 h après la PDT, par un test ELISA.

Dans les cellules HCT116, les résultats indiquent que les NCCs/ β -CD+/PIA induisent la mort cellulaire avec une forte induction de la fragmentation de l'ADN. On observe une augmentation très significative de 9 fois par rapport à une augmentation de 7 fois avec le PIA, 48 h post-PDT (**Figure 70**).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats confirme l'efficacité photodynamique anticancéreuse de ces nouvelles nanoparticules CNCs/ β -CD+ à base de Pp-18 (IC_{50} = 2,5 et 8,7 nM contre les lignées cellulaires HCT116 et HT-29, respectivement, 48 h après l'illumination).

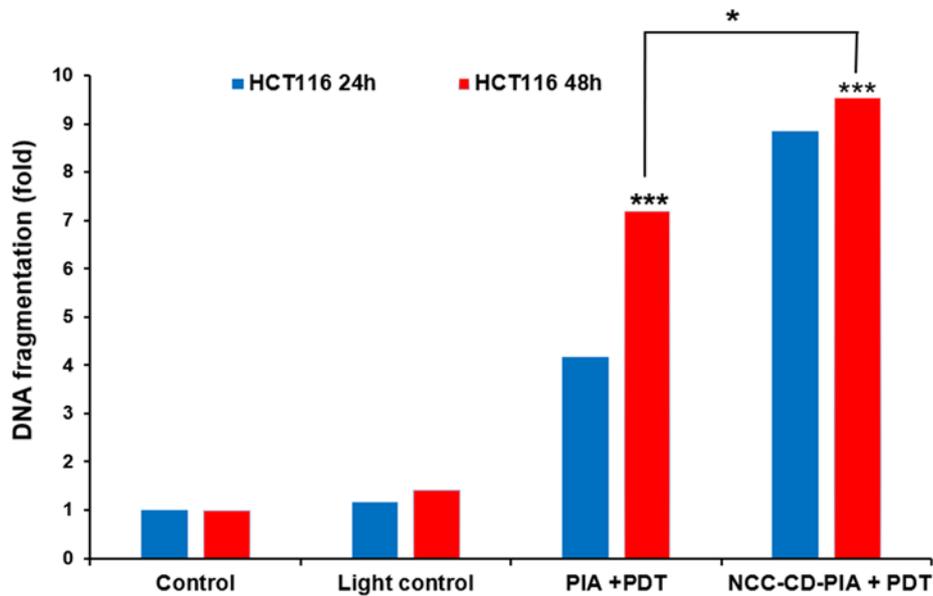


Figure 70. Effets de la photoactivation des NCCs/ β -CD+/PIA et du PIA seul sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116 du CCR. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant d'être traitées ou non avec les composés aux IC_{50} calculées. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été illuminées ou non. La fragmentation de l'ADN 24 et 48 h après l'illumination a été quantifiée à partir d'extraits cytosoliques par un test ELISA. Les résultats sont exprimés en n-fold par rapport au contrôle. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0,05$, et *** $p < 0,001$, par rapport au contrôle.

Discussion et Perspectives

Les différents travaux menés au cours de cette thèse mettent en évidence l'importance de la nanovectorisation en tant que stratégie potentielle pour améliorer l'efficacité et contourner certaines limitations de la PDT. Les traitements conventionnels tels que la chimiothérapie sont limités par le mauvais ciblage des cellules tumorales, ce qui entraîne de nombreux effets secondaires, en particulier dans le cas des cancers. La PDT est basée sur une irradiation locale de la région tumorale, d'où une meilleure sélectivité tumorale et des effets secondaires limités par rapport aux thérapies conventionnelles, permettant ainsi de réduire les dommages causés aux tissus sains. La plupart des PS utilisés en PDT, en particulier les chlorines sont hydrophobes et ils s'agrègent dans les milieux biologiques et ne conviennent pas à une utilisation intraveineuse. Pour contourner cette limitation, l'utilisation des nano-vecteurs tels les nanoparticules organiques ont été étudiées. Ces nanostructures permettent non seulement de surmonter les problèmes de solubilité des PS, mais aussi de s'accumuler sélectivement dans les tissus tumoraux grâce à l'effet EPR. Cet effet repose sur la présence des fenestrations au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral, permettant aux PS de s'accumuler préférentiellement dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux. Avec les FONPs à base de Pp-18 et son dérivé chlorure p6 (Cp6) utilisés dans notre étude, il n'existe aucune preuve de cet effet. Étant donné que l'effet EPR ne peut pas être étudié *in vitro*, il serait donc nécessaire de mener des analyses supplémentaires de biodistribution *in vivo* sur un modèle de xénogreffe sous-cutanée du CCR (déjà réalisé au sein de notre laboratoire) [129]. Cependant, on trouve des études *in vivo* sur des nanoparticules à base de chlorures montrant l'effet EPR. Dans ce contexte, on trouve une étude récente utilisant les nanoparticules d'oxyde de fer couplées avec un agent chimiothérapeutique : la doxorubicine comme vecteur pour délivrer la chlorure e6 (Ce6). De manière intéressante, ces nanoparticules fonctionnalisées ont renforcé la distribution et la rétention de la Ce6 dans les greffes de mélanome sous-cutanées chez la souris et ont amélioré de manière significative l'efficacité de la PDT médiée par la Ce6 [199]. Le ciblage des tumeurs *in vivo* par d'autres nanoparticules contenant de l'albumine (BSA) et de la Ce6 a également été étudié. Ils ont également intégré de l'aluminium sous forme d'hydroxyde d'aluminium dans les nanoparticules afin de renforcer le système immunitaire et de réduire le potentiel d'évasion immunologique des cellules tumorales. Zhu et *al.* ont montré que l'injection intraveineuse de ces nanoparticules (Al-BSA-Ce6) a non seulement détruit efficacement les cellules tumorales, mais a également protégé les souris C57BL/6 porteuses de mélanome contre la récurrence de la tumeur et les métastases en induisant fortement une réponse immunitaire systémique anti-tumorale. De plus, l'imagerie par fluorescence *ex vivo* a montré que 9 h après l'injection, les nanoparticules Al-BSA-Ce6 présentent une accumulation dans les tumeurs 4 fois supérieure que pour la Ce6 libre. Cette accumulation est due à l'effet EPR et au fait que l'albumine contenue dans les nanoparticules peut contribuer à fournir de l'énergie à la tumeur en croissance rapide [200]. Ainsi, la combinaison de l'immunothérapie avec la PDT se développe en tant que nouvelle approche thérapeutique très prometteuse contre le cancer.

La Pp-18 et son dérivé Cp6 étudiés au cours de cette thèse sont des PS fréquemment utilisés en PDT, connus pour avoir une forte hydrophobicité qui entraîne une mauvaise biodistribution et une clairance rapide de ces PS. Par les différents types de nano-vecteurs utilisés, on a pu surmonter cette limitation par la synthèse des nanoparticules montrant une excellente solubilité dans les milieux aqueux et une grande stabilité. Tout d'abord, nous avons évalué la toxicité *in vitro* des FONPs seules sans PS en termes de nano-vecteurs. Nous avons montré que ces nano-vecteurs ne présentent aucune toxicité pour les lignées cellulaires

humaines du CCR en 2D et qu'elles s'accumulent sélectivement dans les cellules cancéreuses, par rapport aux cellules HEK-293 non cancéreuses. Concernant les mécanismes de pénétration dans les cellules cancéreuses, une étude précédente utilisant les FONPs couplées au paclitaxel (agent antinéoplasique hydrophobe) sur des cellules de glioblastome a démontré que les FONPs ne présentent aucune toxicité et qu'elles s'accumulaient préférentiellement dans les cellules de glioblastome, principalement par endocytose médiée par les cavéoles et les radeaux lipidiques. Pour rappel, l'endocytose englobe plusieurs mécanismes divers par lesquels les cellules internalisent des macromolécules et des particules dans des vésicules de transport grâce aux invaginations de la membrane plasmique. L'endocytose se produit par de multiples mécanismes qui se répartissent en deux grandes catégories : la phagocytose et la pinocytose. La pinocytose se produit dans toutes les cellules par au moins quatre mécanismes de base : la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par les cavéoles et l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles (**Figure 71**) [201].

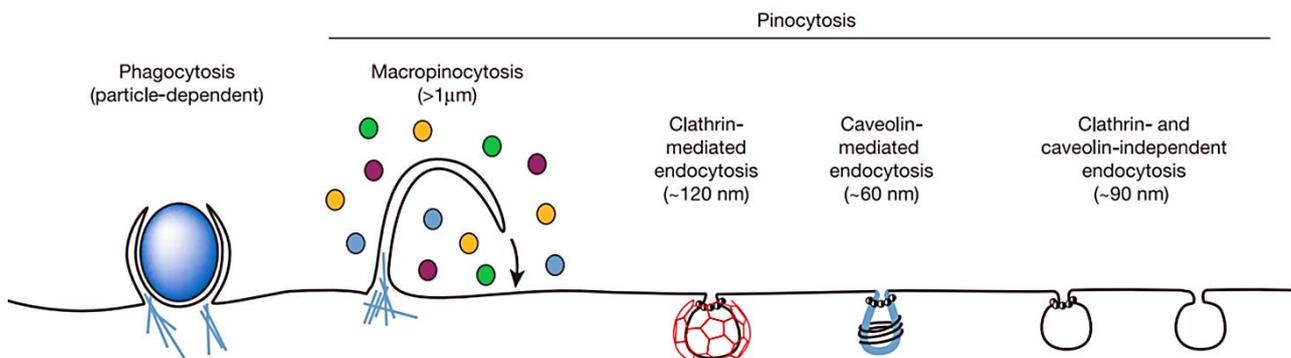


Figure 71. Les voies endocytaires dans la cellule eucaryote.

Les voies d'endocytose diffèrent en fonction de la taille de la vésicule d'endocytose, de la nature des cargos (ligands, récepteurs et lipides) et du mécanisme de formation de la vésicule [201].

De plus, dans une autre étude, la Ce6 encapsulée dans des nanoparticules d'oxyde de fer a été accumulée par endocytose médiée par la clathrine, les cavéoles et le cholestérol. En effet, la taille des nanoparticules joue un rôle essentiel dans la PDT ciblée, car elle peut fortement influencer leur circulation, l'absorption des PS et la biodistribution. Une étude a montré que les nanoparticules de petite taille présentent le potentiel antitumoral le plus élevé. En outre, elles offrent l'avantage d'être mieux localisées et internalisées par les cellules cancéreuses, par comparaison aux nanoparticules de plus grande taille, dans le cadre des applications de PDT [202]. La taille des FONP[Cp6] varie entre 10 et 20 nm avec une faible quantité de nanoparticules d'un diamètre d'environ 25 à 35 nm, donc l'endocytose médiée par les cavéoles est le mécanisme le plus probable, mais ça reste à vérifier par l'inhibition des différentes voies d'endocytose en utilisant par exemple la chlorpromazine (inhibiteur de la clathrine), la génistéine (inhibiteur de la cavéoline), ou la méthyl bêta cyclodextrine (inhibiteur du radeau lipidique).

Parallèlement, la localisation intracellulaire des PS joue un rôle essentiel dans la détermination de l'étendue des dommages cellulaires et des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire. Nos nanoparticules s'accumulent dans le cytoplasme des deux lignées cellulaires colorectales, et jamais dans le noyau. Ces résultats sont cohérents avec une étude précédente, dans laquelle la Pp-18 a été intégrée dans des nanoparticules lipidiques solides

[195]. De plus, il est fréquemment observé que la Pp-18 et les dérivés de la chlorine se localisent dans les organites tels que les lysosomes, les mitochondries et le RE [108][111][120].

Les analyses par microscopie confocale ont montré que les FONP[Cp6] se localisent dans les lysosomes, les mitochondries et le RE. Cette colocalisation a induit une forte génération des ERO intracellulaires ce qui provoque des dommages à la membrane mitochondriale, suivis d'une augmentation du ratio Bax/Bcl-2, induisant ainsi la mort cellulaire apoptotique par la voie intrinsèque mitochondriale. En outre, l'autophagie est souvent déclenchée après la PDT en raison de la production des ERO. Dans notre cas, nous avons montré une forte induction de l'autophagie après la PDT corrélée avec la conversion de LC3. En fait, l'autophagie semble jouer un rôle contradictoire dans le contexte de la PDT. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de l'autophagie peut augmenter la mort cellulaire induite par la PDT [192]. Cependant, d'autres études ont montré que l'inhibition de l'autophagie diminue de manière significative la mort cellulaire induite par la PDT [193]. Dans notre projet, l'utilisation *in vitro* d'inhibiteur de l'autophagie tel que la 3-méthyladénine (3-MA), nous permettrait de voir s'il s'agit d'un rôle inhibiteur ou activateur dans l'apoptose induite par la PDT.

Dans le domaine de la PDT, les modèles de culture cellulaire *in vitro* en 2D sont couramment utilisés pour étudier les mécanismes d'action, et l'activité des PS. Cependant, plusieurs limitations sont associées à ces modèles de culture, telles que l'absence d'interactions entre les cellules et leur environnement. Par conséquent, cela a conduit à l'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* en 3D tels que les sphéroïdes tumoraux multicellulaires. Ces modèles offrent une représentation plus proche des réponses physiologiques et des propriétés réelles des cellules *in vivo*. Les cellules à l'intérieur des sphéroïdes présentent un niveau plus élevé de différenciation par rapport aux cellules en 2D. Ainsi, l'utilisation des sphéroïdes dans le traitement par PDT du CCR est cruciale pour évaluer le potentiel de phototoxicité des PS, permettant de prédire leur performance en clinique [203]. Dans les sphéroïdes tridimensionnels, la présence d'un système nanoparticule-PS a amélioré les résultats thérapeutiques, cependant le nombre de cellules vivantes est souvent plus élevé après le traitement PDT par rapport aux modèles cellulaires 2D, ce qui suggère que les sphéroïdes ont une plus grande résistance aux PS [203]. Dans notre modèle de sphéroïdes de la lignée HT-29, une diminution significative de la viabilité cellulaire a été observée 48 h post-PDT, corrélée à une perturbation des formes des sphéroïdes traités et illuminés par rapport aux sphéroïdes témoins. Il est intéressant de souligner que des concentrations plus élevées de FONPs[Cp6] ont été nécessaires pour induire une cytotoxicité dans les sphéroïdes HT-29 par rapport aux modèles cellulaires 2D. Ceci est attribué à la structure dense des sphéroïdes et à leur résistance connue aux PS. Pour aller plus loin, des analyses supplémentaires des voies de mort cellulaire induites après la PDT dans les sphéroïdes nous permettrait de mieux comprendre l'efficacité anticancéreuse des FONPs[Cp6].

On trouve peu d'études qui ont été menées pour examiner les nanoparticules dans la PDT pour le traitement des sphéroïdes du CCR. Dans ce contexte, on trouve une étude intéressante publiée en Janvier 2024 sur des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des anticorps (anti-guanylyl cyclase, anti-GCC) et chargées avec de la phtalocyanine de zinc pour le traitement en 2D et 3D des cellules Caco-2 de CCR. Les GCC sont des récepteurs transmembranaires surexprimés dans les cellules de CCR, ce qui les rendent des cibles prometteuses qui peuvent être exploitées efficacement pour augmenter l'internalisation cellulaire des PS et améliorer ainsi l'efficacité globale de la PDT [204]. Les auteurs ont montré que des concentrations plus élevées de PS étaient nécessaires pour induire une cytotoxicité dans les sphéroïdes de Caco-

2 par rapport aux modèles cellulaires 2D, que ce soit sous la forme de PS libres ou nanoconjugués. En outre, les résultats révèlent que la PDT médiée par ces nanoparticules fonctionnalisées inhibe de manière significative la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans les cellules Caco-2 cultivées en 2D et, à un degré inférieur, dans les sphéroïdes [203]. Ces résultats basés sur le concept de ciblage actif sont cohérents avec nos résultats obtenus avec les sphéroïdes de HT-29. Par conséquent, l'ensemble de ces données soulignent l'importance de l'évaluation de la PDT à l'aide de modèles de sphéroïdes tumoraux tridimensionnels en tant qu'étape intermédiaire, fournissant des informations essentielles sur l'efficacité de la nanoformulation avant de réaliser des tests pré-cliniques.

La suite de ce projet de recherche se fera sur 4 axes principaux de travail :

- Tout d'abord afin d'améliorer la sélectivité tumorale, les FONPs[Cp6] peuvent être modifiés avec des ligands spécifiques qui sont reconnus par les récepteurs surexprimés sur les cellules du CCR, on parle donc d'un ciblage actif. Parmi les récepteurs largement étudiés et les cibles possibles de la PDT du CCR on trouve le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), les récepteurs de la transferrine, les récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) et la molécule d'adhésion des cellules épithéliales (EpCAM) [79]. Par exemple, le récepteur de la transferrine (CD71) est généralement exprimé pour réguler l'homéostasie du fer dans les cellules humaines normales, mais les tumeurs malignes expriment souvent des niveaux d'expression anormaux du récepteur de la transferrine (CD71), qui peuvent être ciblés par des anticorps dans le cadre de la PDT ciblée [205]. L'administration des nanoparticules-PS médiée par des anticorps peut réduire les effets secondaires indésirables sur les cellules saines et améliorer l'efficacité du ciblage, grâce à la spécificité et à l'affinité élevées des interactions anticorps-antigènes.
- La réalisation d'un modèle *in vivo* de xélogreffe sous-cutanée de CCR chez la souris est indispensable afin de valider les résultats *in vitro*. Donc, afin de confirmer l'efficacité phototoxique des FONPs[Cp6], les cellules HT-29 issues de la lignée la plus résistante dans notre étude, pourraient être injectées à des souris immunodéficientes. Ainsi, la vitesse de croissance des tumeurs dans le temps, la prolifération des cellules tumorales, l'induction de l'apoptose et de l'autophagie, et l'inflammation intra-tumorale seront évaluées à partir des prélèvements tumoraux par des analyses immuno-histochimiques et génétiques.
- Il est bien établi que les tumeurs colorectales présentent une hétérogénéité complexe, ce qui peut constituer un défi pour la majorité des modalités actuelles de traitement. L'établissement de combinaisons de thérapies synergiques présente un intérêt considérable en raison de leurs nombreux avantages par rapport aux monothérapies, notamment leur meilleure efficacité grâce aux effets synergiques et la réduction des effets secondaires [79]. Dans ce contexte, la PDT peut être utilisée en combinaison avec l'immunothérapie. En effet, la PDT a le potentiel d'induire une immunité antitumorale [206]. On sait que la génération de réponses immunitaires antitumorales systémiques efficaces présente un grand potentiel pour éliminer les tumeurs [207]. La PDT peut donc être utilisée en combinaison avec des immunothérapies qui exploitent et renforcent le système immunitaire de l'hôte, comme les anticorps qui bloquent le mécanisme suppressif du point de contrôle immunitaire/les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire (immune checkpoint inhibitors). La stratégie consistant à utiliser les nanoformulations dans l'approche combinée PDT-PD-L1 de blocage des points de contrôle a montré des

effets thérapeutiques prometteurs dans les études cliniques [79]. L'association de la PDT à l'immunothérapie anticancéreuse a permis d'obtenir des résultats synergiques, de favoriser la régression du cancer et même d'obtenir une mémoire immunologique [208]. Ces résultats indiquent que la PDT à base de nanoparticules peut potentialiser l'efficacité systémique des immunothérapies bloquant les points de contrôle en activant les systèmes immunitaires innés et adaptatifs dans le microenvironnement tumoral. A la lumière de ces résultats très prometteurs, nous pourrions proposer plusieurs stratégies en utilisant nos nanoparticules FONPs[Cp6] : le blocage de PD-1/PD-L1 ou CTLA-4 par des anticorps (tels que l'embroлизumab et le nivolumab approuvés par la FDA) permet l'activation des cellules T, et la combinaison de la PDT avec l'administration de cellules dendritiques immatures pourrait présenter un potentiel pour une utilisation clinique entraînant une immunité antitumorale systémique par la stimulation des cellules T et des cellules NK.

- Le ciblage des cellules souches cancéreuses (CSC) à l'aide de stratégies de ciblage actif ou passif médié par la PDT dans le CCR pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante, en particulier dans le cas du CCR métastatique. Par exemple, l'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules de surface spécifiques aux CSC du CCR tels que CD44+, CD47+, CD123+, EpCAM, le récepteur 2 des gangliosides (GD2), et les récepteurs frizzled (FZD) pourrait améliorer le potentiel global de la PDT en prévenant éventuellement les métastases secondaires du CCR.

Références bibliographiques

1. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer Review Evolve Progressively from Normalcy via a Series of Pre; 2000; Vol. 100.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 2011, 144, 646–674.
3. Vigué, Jordi. ; Martín Orte, Emilio.; Valenta, Muriel. Atlas d'anatomie Humaine; Éditions DésIris, 2004; ISBN 2907653946.
4. « <https://enterofytol.be/inconfort-digestif/comprendre-les-intestins/> ».
5. « LES FONDAMENTAUX DE LA PATHOLOGIE DIGESTIVE », CDU-HGE/Éditions Elsevier-Masson - Octobre 2014.
6. Tursi, A. Diverticulosis Today: Unfashionable and Still under-Researched. *Therap Adv Gastroenterol* 2016, 9, 213–228.
7. Banasiewicz, T.; Francuzik, W.; Bobkiewicz, A.; Krokowicz, Ł.; Borejsza-Wysocki, M.; Paszkowski, J.; Studniarek, A.; Krokowicz, P.; Grochowalski, M.; Zastawna, K.; et al. The Influence of Rifaximin on Diverticulitis Rate and Quality of Life in Patients with Diverticulosis. *Polish Journal of Surgery* 2017, 89, 22–31, doi:10.5604/01.3001.0009.6012.
8. Hammerle, C.W.; Surawicz, C.M. Updates on Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *World J Gastroenterol* 2008, 14, 2639–2649.
9. Ford, A.C.; Sperber, A.D.; Corsetti, M.; Camilleri, M. Irritable Bowel Syndrome. *The Lancet* 2020, 396, 1675–1688.
10. Segal, J.P.; Jean-Frédéric LeBlanc, A.; Hart, A.L. Ulcerative Colitis: An Update. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London* 2021, 21, 135–139, doi:10.7861/CLINMED.2021-0080.
11. Le Berre, C.; Honap, S.; Peyrin-Biroulet, L. Ulcerative Colitis; 2023; Vol. 402.
12. Baumgart, D.C.; Sandborn, W.J. Crohn's Disease. In *Proceedings of the The Lancet*; Elsevier B.V., 2012; Vol. 380, pp. 1590–1605.
13. Kim, E.R.; Chang, D.K. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: The Risk, Pathogenesis, Prevention and Diagnosis. *World J Gastroenterol* 2014, 9872–9881.
14. Sawicki, T.; Ruszkowska, M.; Danielewicz, A.; Niedźwiedzka, E.; Arłukowicz, T.; Przybyłowicz, K.E. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)* 2021, 13.
15. Hossain, M.S.; Karuniawati, H.; Jairoun, A.A.; Urbi, Z.; Ooi, D.J.; John, A.; Lim, Y.C.; Kaderi Kibria, K.M.; Mohiuddin, A.K.M.; Ming, L.C.; et al. Colorectal Cancer: A Review of

Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)* 2022, 14.

16. Douaiher, J.; Ravipati, A.; Grams, B.; Chowdhury, S.; Alatise, O.; Are, C. Colorectal Cancer—Global Burden, Trends, and Geographical Variations. *J Surg Oncol* 2017, 115, 619–630, doi:10.1002/jso.24578.
17. Koc, M.A.; Celik, S.U.; Akyol, C. Colon Cancer. In *Current Trends in Cancer Management*; Streba, L., Gheonea, D.I., Schenker, M., Eds.; IntechOpen: Rijeka, 2019.
18. Panorama des cancers en France, Édition 2023.
19. Kuipers, E.J.; Grady, W.M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T.; Sung, J.J.; Boelens, P.G.; Van De Velde, C.J.H.; Watanabe, T. Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2015, 1, doi:10.1038/nrdp.2015.65.
20. Valle, L.; Vilar, E.; Tavtigian, S. V.; Stoffel, E.M. Genetic Predisposition to Colorectal Cancer: Syndromes, Genes, Classification of Genetic Variants and Implications for Precision Medicine. *Journal of Pathology* 2019, 247, 574–588.
21. Kolligs, F.T. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visc Med* 2016, 32, 158–164.
22. Dépistage du cancer colorectal Programme National de Dépistage Organisé ; 2023.
23. Mathews, A.A.; Draganov, P. V; Yang, D. Endoscopic Management of Colorectal Polyps: From Benign to Malignant Polyps. *World J Gastrointest Endosc* 2021, 13, 356–370, doi:10.4253/wjge.v13.i9.356.
24. Abedizadeh, R.; Majidi, F.; Khorasani, H.R.; Abedi, H.; Sabour, D. Colorectal Cancer: A Comprehensive Review of Carcinogenesis, Diagnosis, and Novel Strategies for Classified Treatments. *Cancer and Metastasis Reviews* 2024, 43, 729–753.
25. Bateman, A.C. Pathology of Colorectal Polyps and Cancer; Surgery (Oxford) 2023, 41, 15–21.
26. Fleming, M.; Ravula, S.; Tatishchev, S.F.; Wang, H.L. Colorectal Carcinoma: Pathologic Aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012, 3, 153–173.
27. Shussman, N.; Wexner, S.D. Colorectal Polyps and Polyposis Syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2014, 2, 1–15.
28. Pin-Vieito, N.; Iglesias, M.J.; Remedios, D.; Álvarez-Sánchez, V.; Fernández-Bañares, F.; Boadas, J.; Martínez-Bauer, E.; Campo, R.; Bujanda, L.; Ferrández, Á.; et al. Predictive Value of Carcinoembryonic Antigen in Symptomatic Patients without Colorectal Cancer: A Post-Hoc Analysis within the Colonpredict Cohort. *Diagnostics* 2020, 10, doi:10.3390/diagnostics10121036.

29. Barták, B.K.; Kalmár, A.; Péterfia, B.; Patai, Á. V.; Galamb, O.; Valcz, G.; Spisák, S.; Wichmann, B.; Nagy, Z.B.; Tóth, K.; et al. Colorectal Adenoma and Cancer Detection Based on Altered Methylation Pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in Plasma Samples. *Epigenetics* 2017, 12, 751–763, doi:10.1080/15592294.2017.1356957.
30. Amin, M.B.; Greene, F.L.; Edge, S.B.; Compton, C.C.; Gershenwald, J.E.; Brookland, R.K.; Meyer, L.; Gress, D.M.; Byrd, D.R.; Winchester, D.P. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge from a Population-based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging. *CA Cancer J Clin* 2017, 67, 93–99, doi:10.3322/caac.21388.
31. Labianca, R.; Beretta, G.D.; Kildani, B.; Milesi, L.; Merlin, F.; Mosconi, S.; Pessi, M.A.; Prochilo, T.; Quadri, A.; Gatta, G.; et al. Colon Cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010, 74, 106–133.
32. Centelles, J.J. General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncol* 2012, 2012, 1–19, doi:10.5402/2012/139268.
33. Nompumelelo Simelane, N.W.; Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Photodynamic Diagnosis and Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer: In Vitro and in Vivo. *RSC Adv* 2020, 10, 41560–41576.
34. Abedizadeh, R.; Majidi, F.; Khorasani, H.R.; Abedi, H.; Sabour, D. Colorectal Cancer: A Comprehensive Review of Carcinogenesis, Diagnosis, and Novel Strategies for Classified Treatments. *Cancer and Metastasis Reviews* 2024, 43, 729–753.
35. Longley, D.B.; Harkin, D.P.; Johnston, P.G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat Rev Cancer* 2003, 3, 330–338.
36. Lewis, C.; Xun, P.; He, K. Effects of Adjuvant Chemotherapy on Recurrence, Survival, and Quality of Life in Stage II Colon Cancer Patients: A 24-Month Follow-Up. *Supportive Care in Cancer* 2016, 24, 1463–1471, doi:10.1007/s00520-015-2931-2.
37. Lumish, M.A.; Cercek, A. Immunotherapy for the Treatment of Colorectal Cancer. *J Surg Oncol* 2021, 123, 760–774.
38. Dai, Y.; Zhao, W.; Yue, L.; Dai, X.; Rong, D.; Wu, F.; Gu, J.; Qian, X. Perspectives on Immunotherapy of Metastatic Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2021, 11.
39. Hossain, M.S.; Karuniawati, H.; Jairoun, A.A.; Urbi, Z.; Ooi, D.J.; John, A.; Lim, Y.C.; Kaderi Kibria, K.M.; Mohiuddin, A.K.M.; Ming, L.C.; et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)* 2022, 14.
40. Rodrigues, J.A.; Correia, J.H. Photodynamic Therapy for Colorectal Cancer: An Update and a Look to the Future. *Int J Mol Sci* 2023, 24.

41. Lee, Y.T.; Tan, Y.J.; Oon, C.E. Molecular Targeted Therapy: Treating Cancer with Specificity. *Eur J Pharmacol* 2018, 834, 188–196.
42. Piawah, S.; Venook, A.P. Targeted Therapy for Colorectal Cancer Metastases: A Review of Current Methods of Molecularly Targeted Therapy and the Use of Tumor Biomarkers in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer* 2019, 125, 4139–4147.
43. Dechant, M.; Weisner, W.; Berger, S.; Peipp, M.; Beyer, T.; Schneider-Merck, T.; Lammerts Van Bueren, J.J.; Bleeker, W.K.; Parren, P.W.H.I.; Van De Winkel, J.G.J.; et al. Complement-Dependent Tumor Cell Lysis Triggered by Combinations of Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies. *Cancer Res* 2008, 68, 4998–5003, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6226.
44. Van Der Jeught, K.; Xu, H.C.; Li, Y.J.; Lu, X. Bin; Ji, G. Drug Resistance and New Therapies in Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol* 2018, 24, 3834–3848.
45. Xie, Y.-H.; Chen, Y.-X.; Fang, J.-Y. Comprehensive Review of Targeted Therapy for Colorectal Cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2020, 5, 22, doi:10.1038/s41392-020-0116-z.
46. Van Cutsem, E.; Cervantes, A.; Nordlinger, B.; Arnold, D. Metastatic Colorectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up † *Annals of Oncology* 2014, 25, iii1–iii9, doi:10.1093/annonc/mdu260.
47. De Falco, V.; Napolitano, S.; Roselló, S.; Huerta, M.; Cervantes, A.; Ciardiello, F.; Troiani, T. How We Treat Metastatic Colorectal Cancer. *ESMO Open* 2019, 4, doi:10.1136/esmoopen-2020-000813.
48. Wang, Q.; Shen, X.; Chen, G.; Du, J. Drug Resistance in Colorectal Cancer: From Mechanism to Clinic. *Cancers (Basel)* 2022, doi:10.3390/cancers.
49. Soong, R.; Shah, N.; Salto-Tellez, M.; Tai, B.C.; Soo, R.A.; Han, H.C.; Ng, S.S.; Tan, W.L.; Zeps, N.; Joseph, D.; et al. Prognostic Significance of Thymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase and Thymidine Phosphorylase Protein Expression in Colorectal Cancer Patients Treated with or without 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *Annals of Oncology* 2008, 19, 915–919, doi:10.1093/annonc/mdm599.
50. Takechi, T.; Fujioka, A.; Matsushima, E.; Fukushima, M. Enhancement of the Antitumour Activity of 5-Fluorouracil (5-FU) by Inhibiting Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity (DPD) Using 5-Chloro-2,4-Dihydroxypyridine (CDHP) in Human Tumour Cells;
51. Hammond, W.A.; Swaika, A.; Mody, K. Pharmacologic Resistance in Colorectal Cancer: A Review. *Ther Adv Med Oncol* 2015, 8, 57–84, doi:10.1177/1758834015614530.
52. Esposito, C.; Rachiglio, A.M.; La Porta, M.L.; Sacco, A.; Roma, C.; Iannaccone, A.; Tatangelo, F.; Forgione, L.; Pasquale, R.; Barbaro, A.; et al. The S492R EGFR Ectodomain Mutation Is Never Detected in KRAS Wild-Type Colorectal Carcinoma before Exposure to EGFR Monoclonal Antibodies. *Cancer Biol Ther* 2013, 14, 1143–1146, doi:10.4161/cbt.26340.

53. Lee, C.N.; Hsu, R.; Chen, H.; Wong, T.W. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. *Molecules* 2020, 25.
54. Urbach F; Forbes PD; Davies RE; Berger D. Cutaneous photobiology: past, present and future. *J Invest Dermatol.* 1976, 67(1), 209-224.
55. Mitton, D.; Ackroyd, R. A Brief Overview of Photodynamic Therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008, 5, 103–111, doi:10.1016/j.pdpdt.2008.04.004.
56. 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.
57. Didamson, O.C.; Abrahamse, H. Targeted Photodynamic Diagnosis and Therapy for Esophageal Cancer: Potential Role of Functionalized Nanomedicine. *Pharmaceutics* 2021, 13.
58. Olszowy, M.; Nowak-Perlak, M.; Woźniak, M. Current Strategies in Photodynamic Therapy (PDT) and Photodynamic Diagnostics (PDD) and the Future Potential of Nanotechnology in Cancer Treatment. *Pharmaceutics* 2023, 15.
59. Lucie Paulus. Nouveaux photosensibilisateurs fonctionnalisés par des complexes arène-ruthénium actifs en thérapie photodynamique : signalisation intracellulaire et évaluation in vitro sur des modèles de cancer prostatique. Université de Limoges, 2023.
60. Yoshida, T.; Murota, T.; Matsuzaki, T.; Nakao, K.; Ohe, C.; Matsuda, T.; Kinoshita, H. Photodynamic Diagnosis–Guided Dual Laser Ablation for Upper Urinary Tract Carcinoma: Preoperative Preparation, Surgical Technique, and Clinical Outcomes. *Eur Urol Open Sci* 2021, 28, 17–25, doi:10.1016/j.euros.2021.03.009.
61. Dougherty TJ; Marcus SL. Photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 1992, 28A(10),1734-1742.
62. Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One - Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2004, 1, 279–293.
63. Correia, J.H.; Rodrigues, J.A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* 2021, 13, doi:10.3390/pharmaceutics13091332.
64. Verger, A.; Brandhonneur, N.; Molard, Y.; Cordier, S.; Kowouvi, K.; Amela-Cortes, M.; Dollo, G. From Molecules to Nanovectors: Current State of the Art and Applications of Photosensitizers in Photodynamic Therapy. *Int J Pharm* 2021, 604.
65. Gunaydin, G.; Gedik, M.E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem* 2021, 9.

66. Kessel, D. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* 2019, 95, 119–125.
67. François, A.; Marchal, S.; Guillemain, F.; Bezdetsnaya, L. MTHPC-Based Photodynamic Therapy Induction of Autophagy and Apoptosis in Cultured Cells in Relation to Mitochondria and Endoplasmic Reticulum Stress. *Int J Oncol* 2011, 39, 1537–1543, doi:10.3892/ijo.2011.1174.
68. Fitzgerald, F. *Photodynamic Therapy (PDT): Principles, Mechanisms and Applications*; 2017.
69. Yoon, I.; Li, J.Z.; Shim, Y.K. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin Endosc* 2013, 46, 7–23, doi:10.5946/ce.2013.46.1.7.
70. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K.A.; Foster, T.H.; Girotti, A.W.; Gollnick, S.O.; Hahn, S.M.; Hamblin, M.R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin* 2011, 61, 250–281, doi:10.3322/caac.20114.
71. Cantisani, C.; Paolino, G.; Pellacani, G.; Didona, D.; Scarno, M.; Faina, V.; Gobello, T.; Calvieri, S. MAL Daylight Photodynamic Therapy for Actinic Keratosis: Clinical and Imaging Evaluation by 3D Camera. *Int J Mol Sci* 2016, 17, doi:10.3390/ijms17071108.
72. Algorri, J.F.; López-Higuera, J.M.; Rodríguez-Cobo, L.; Cobo, A. Advanced Light Source Technologies for Photodynamic Therapy of Skin Cancer Lesions. *Pharmaceutics* 2023, 15, doi:10.3390/pharmaceutics15082075.
73. Juvekar, V.; Joon Lee, D.; Gwan Park, T.; Samanta, R.; Kasar, P.; Kim, C.; Rotermund, F.; Kim, H.M. Two-Photon Excitation Photosensitizers for Photodynamic Therapy: From Small-Molecules to Nano-Complex Systems. *Coord Chem Rev* 2024, 506, 215711, doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2024.215711.
74. Timothy J Kinsella Valdir C Colussi, N.L.O.; Sibata, C.H. Photodynamic Therapy in Oncology. *Expert Opin Pharmacother* 2001, 2, 917–927, doi:10.1517/14656566.2.6.917.
75. Morton, C.A.; Szeimies, R.M.; Basset-Séguin, N.; Calzavara-Pinton, P.G.; Gilaberte, Y.; Hædersdal, M.; Hofbauer, G.F.L.; Hunger, R.E.; Karrer, S.; Piaserico, S.; et al. European Dermatology Forum Guidelines on Topical Photodynamic Therapy 2019 Part 2: Emerging Indications – Field Cancerization, Photorejuvenation and Inflammatory/Infective Dermatoses. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2020, 34, 17–29, doi:10.1111/jdv.16044.
76. Abrahamse, H.; Hamblin, M.R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochemical Journal* 2016, 473, 347–364.
77. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzińska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2018, 106, 1098–1107.

78. Yoon, I.; Li, J.Z.; Shim, Y.K. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin Endosc* 2013, 46, 7–23, doi:10.5946/ce.2013.46.1.7.
79. Simelane, N.W.N.; Abrahamse, H. Nanoparticle-Mediated Delivery Systems in Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2021, 22.
80. Dos Santos, A.F.; Arini, G.S.; de Almeida, D.R.Q.; Labriola, L. Nanophotosensitizers for Cancer Therapy: A Promising Technology? *JPhys Materials* 2021, 4.
81. Calixto, G.M.F.; Bernegossi, J.; De Freitas, L.M.; Fontana, C.R.; Chorilli, M.; Grumezescu, A.M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* 2016, 21.
82. Atif, M.; Zellweger, M.; Wagnières, Georges. Review of the role played by the photosensitizer's photobleaching during photodynamic therapy, 2016, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. 18. 338-350.
83. Diaspro, A.; Chirico, G.; Usai, C.; Ramoino, P.; Dobrucki, J. Photobleaching. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy: Third Edition*; Springer US, 2006; pp. 690–702 ISBN 038725921X.
84. Shirasu, N.; Nam, S.O.U.K.; Kuroki, M. Tumor-Targeted Photodynamic Therapy. *Anticancer Res* 2013, 33, 2823.
85. Peer D; Karp JM; Hong S, Farokhzad OC; Margalit R; Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007, 2(12), 751-760.
86. Rosenkranz, A.A.; Jans, D.A.; Sobolev, A.S. Targeted Intracellular Delivery of Photosensitizers to Enhance Photodynamic Efficiency. In *Proceedings of the Immunology and Cell Biology*; 2000; Vol. 78, pp. 452–464.
87. Ganoth, A.; Merimi, K.C.; Peer, D. Overcoming Multidrug Resistance with Nanomedicines. *Expert Opin Drug Deliv* 2015, 12, 223–238.
88. Calixto, G.M.F.; Bernegossi, J.; De Freitas, L.M.; Fontana, C.R.; Chorilli, M.; Grumezescu, A.M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* 2016, 21.
89. Algorri, J.F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; Miguel López-Higuera, J. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers (Basel)* 2021, doi:10.3390/cancers.
90. Sun, B.; Li, W.; Liu, N. Curative Effect of the Recent Photofrin Photodynamic Adjuvant Treatment on Young Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Oncol Lett* 2016, 11, 2071–2074, doi:10.3892/ol.2016.4179.
91. Kou, J.; Dou, D.; Yang, L. Porphyrin Photosensitizers in Photodynamic Therapy and Its Applications; 2017; Vol. 8.

92. Janas, K.; Boniewska-Bernacka, E.; Dyrda, G.; Słota, R. Porphyrin and Phthalocyanine Photosensitizers Designed for Targeted Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer. *Bioorg Med Chem* 2021, 30, doi:10.1016/j.bmc.2020.115926.
93. Li, Y.; Yu, Y.; Kang, L.; Lu, Y. Original Article Effects of Chlorin E6-Mediated Photodynamic Therapy on Human Colon Cancer SW480 Cells; 2014; Vol. 7.
94. Janas, K.; Boniewska-Bernacka, E.; Dyrda, G.; Słota, R. Porphyrin and Phthalocyanine Photosensitizers Designed for Targeted Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer. *Bioorg Med Chem* 2021, 30, 115926, doi:https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115926.
95. Wu, R.W.K.; Chu, E.S.M.; Huang, Z.; Olivo, M.C.; Ip, D.C.W.; Yow, C.M.N. An in Vitro Investigation of Photodynamic Efficacy of FosPeg□ on Human Colon Cancer Cells. *J Innov Opt Health Sci* 2015, 08, 1550027, doi:10.1142/S1793545815500273.
96. Hanlon, J.G.; Adams, K.; Rainbow, A.J.; Gupta, R.S.; Singh, G. Induction of Hsp60 by Photofrin-Mediated Photodynamic Therapy; 2001; Vol. 64.
97. Chiu, S.-M.; Xue, L.-Y.; Azizuddin, K.; Oleinick, N.L. Photodynamic Therapy-Induced Death of HCT 116 Cells: Apoptosis with or without Bax Expression. *Apoptosis* 2005, 10, 1357–1368, doi:10.1007/s10495-005-2217-0.
98. Simon, V.; Devaux, C.; Darmon, A.; Donnet, T.; Thiénot, E.; Germain, M.; Honnorat, J.; Duval, A.; Pottier, A.; Borghi, E.; et al. Pp IX Silica Nanoparticles Demonstrate Differential Interactions with in Vitro Tumor Cell Lines and in Vivo Mouse Models of Human Cancers. *Photochem Photobiol* 2010, 86, 213–222, doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00620.x.
99. Li, P.-T.; Ke, E.-S.; Chiang, P.-C.; Tsai, T. ALA- or Ce6-PDT Induced Phenotypic Change and Suppressed Migration in Surviving Cancer Cells. *J Dent Sci* 2015, 10, 74–80, doi:https://doi.org/10.1016/j.jds.2013.10.005.
100. Ziółkowska, B.; Woźniak, M.; Ziółkowski, P. Co-Expression of Autophagic Markers Following Photodynamic Therapy in SW620 Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Mol Med Rep* 2016, 14, 2548–2554, doi:10.3892/mmr.2016.5541.
101. Ding, D.; Zhong, H.; Liang, R.; Lan, T.; Zhu, X.; Huang, S.; Wang, Y.; Shao, J.; Shuai, X.; Wei, B. Multifunctional Nanodrug Mediates Synergistic Photodynamic Therapy and MDSCs-Targeting Immunotherapy of Colon Cancer. *Advanced Science* 2021, 8, 2100712, doi:https://doi.org/10.1002/adv.202100712.
102. Pavlíčková, V.; Škubník, J.; Jurášek, M.; Rimpelová, S. Advances in Purpurin 18 Research: On Cancer Therapy. *Applied Sciences (Switzerland)* 2021, 11, 1–25.
103. Zenkevich, E.; Sagun, E.; Knyuksho, V.; Shulga, A.; Mironov, A.; Efremova, O.; Bonnett, R.; Songca, S.P.; Kassem, M. Photophysical and Photochemical Properties of Potential Porphyrin and Chlorin Photosensitizers for PDT. *J Photochem Photobiol B* 1996, 33, 171–180, doi:https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07241-1.

104. Zhou, J.; Gao, Z.-J.; Cai, J.-Q.; Li, L.-L.; Wang, H. Synthesis and Self-Assembly Behavior of Chlorophyll Derivatives for Ratiometric Photoacoustic Signal Optimization. *Langmuir* 2020, 36, 1559–1568, doi:10.1021/acs.langmuir.9b03652.
105. Zhang, D.; Qi, G.-B.; Zhao, Y.-X.; Qiao, S.-L.; Yang, C.; Wang, H. In Situ Formation of Nanofibers from Purpurin18-Peptide Conjugates and the Assembly Induced Retention Effect in Tumor Sites. *Advanced Materials* 2015, 27, 6125–6130, doi:https://doi.org/10.1002/adma.201502598.
106. Drogat, N.; Barrière, M.; Granet, R.; Sol, V.; Krausz, P. High Yield Preparation of Purpurin-18 from *Spirulina Maxima*. *Dyes and Pigments* 2011, 88, 125–127, doi:10.1016/j.dyepig.2010.05.006.
107. Hooper, J.K.; Sery, T.W.; Yamamoto, N. Photodynamic sensitizers from chlorophyll: purpurin–18 and chlorine. *Photochem Photobiol* 1988, 48, 579–582, doi:https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02867.x.
108. Huang, P.; Zhang, B.; Yuan, Q.; Zhang, X.; Leung, W.; Xu, C. Photodynamic Treatment with Purpurin 18 Effectively Inhibits Triple Negative Breast Cancer by Inducing Cell Apoptosis. *Lasers Med Sci* 2021, 36, 339–347, doi:10.1007/s10103-020-03035-w.
109. Ghodarzi, R.; Changizi, V.; Montazerabadi, A.R.; Eyvazzadaeh, N. Assessing of Integration of Ionizing Radiation with Radachlorin-PDT on MCF-7 Breast Cancer Cell Treatment. *Lasers Med Sci* 2016, 31, 213–219, doi:10.1007/s10103-015-1844-0.
110. Bae, S.M.; Kim, Y.W.; Lee J.M., Namkoong, S.E; Han, S.J.; Kim, J.K.; Lee, C.H.; Chun, H.J.; Jin, H.S; and Ahn, W.S. (2004) Photodynamic Effects of Radachlorin® on Cervical Cancer Cells. *Cancer Research and Treatment*, 36, 389-394.
111. Pavlíčková, V.; Rimpelová, S.; Jurášek, M.; Záruba, K.; Fährnich, J.; Křížová, I.; Bejček, J.; Rottnerová, Z.; Spiwok, V.; Drašar, P.; et al. PEGylated Purpurin 18 with Improved Solubility: Potent Compounds for Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules* 2019, 24, doi:10.3390/molecules24244477.
112. Kang, E.S.; Lee, T.H.; Liu, Y.; Han, K.H.; Lee, W.K.; Yoon, I. Graphene Oxide Nanoparticles Having Long Wavelength Absorbing Chlorins for Highly-Enhanced Photodynamic Therapy with Reduced Dark Toxicity. *Int J Mol Sci* 2019, 20, doi:10.3390/ijms20184344.
113. Pivetta, T.P.; Botteon, C.E.A.; Ribeiro, P.A.; Marcato, P.D.; Raposo, M. Nanoparticle Systems for Cancer Phototherapy: An Overview. *Nanomaterials* 2021, 11.
114. Bovis, M.J.; Woodhams, J.H.; Loizidou, M.; Scheglmann, D.; Bown, S.G.; MacRobert, A.J. Improved in Vivo Delivery of M-THPC via Pegylated Liposomes for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Controlled Release* 2012, 157, 196–205, doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.085.

115. Gaio, E.; Scheglmann, D.; Reddi, E.; Moret, F. Uptake and Photo-Toxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in Multicellular Tumor Spheroids. *J Photochem Photobiol B* 2016, 161, 244–252, doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.05.011.
116. Debele, T.A.; Peng, S.; Tsai, H.C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2015, 16, 22094–22136.
117. Langer, R.; Folkman, J. Polymers for the Sustained Release of Proteins and Other Macromolecules. *Nature* 1976, 263, 797–800, doi:10.1038/263797a0.
118. Yu, Z.; Li, H.; Zhang, L.-M.; Zhu, Z.; Yang, L. Enhancement of Phototoxicity against Human Pancreatic Cancer Cells with Photosensitizer-Encapsulated Amphiphilic Sodium Alginate Derivative Nanoparticles. *Int J Pharm* 2014, 473, 501–509, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.046.
119. Yuan, Y.; Liu, B. Self-Assembled Nanoparticles Based on PEGylated Conjugated Polyelectrolyte and Drug Molecules for Image-Guided Drug Delivery and Photodynamic Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014, 6, 14903–14910, doi:10.1021/am5020925.
120. Liu, Y.; Lee, T.H.; Lee, S.H.; Li, J.; Lee, W.K.; Yoon, I. Mitochondria-Targeted Water-Soluble Organic Nanoparticles of Chlorin Derivatives for Biocompatible Photodynamic Therapy. *ChemNanoMat* 2020, 6, 610–617, doi:10.1002/cnma.201900664.
121. Davis, M.E.; Brewster, M.E. Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3, 1023–1035, doi:10.1038/nrd1576.
122. Nikitenko, N.A.; Prassolov, V.S. Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. *Acta Naturae* 2013, 5, 35–53.
123. Lourenço, L.M.O.; Pereira, P.M.R.; Maciel, E.; Válega, M.; Domingues, F.M.J.; Domingues, M.R.M.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Fernandes, R.; Tomé, J.P.C. Amphiphilic Phthalocyanine–Cyclodextrin Conjugates for Cancer Photodynamic Therapy. *Chemical Communications* 2014, 50, 8363–8366, doi:10.1039/C4CC02226B.
124. Semeraro, P.; Chimienti, G.; Altamura, E.; Fini, P.; Rizzi, V.; Cosma, P. Chlorophyll a in Cyclodextrin Supramolecular Complexes as a Natural Photosensitizer for Photodynamic Therapy (PDT) Applications. *Materials Science and Engineering: C* 2018, 85, 47–56, doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.012.
125. Conte, C.; Scala, A.; Siracusano, G.; Leone, N.; Patanè, S.; Ungaro, F.; Miro, A.; Sciortino, M.T.; Quaglia, F.; Mazzaglia, A. Nanoassembly of an Amphiphilic Cyclodextrin and Zn(II)-Phthalocyanine with the Potential for Photodynamic Therapy of Cancer. *RSC Adv.* 2014, 4, 43903–43911, doi:10.1039/C4RA07847K.
126. Lourenço, L.M.O.; Pereira, P.M.R.; Maciel, E.; Válega, M.; Domingues, F.M.J.; Domingues, M.R.M.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Fernandes, R.; Tomé, J.P.C. Amphiphilic Phthalocyanine–Cyclodextrin Conjugates for Cancer Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* 2014, 50, 8363–8366, doi:10.1039/C4CC02226B.

127. Liu, Y.; Liu, X.; Xiao, Y.; Chen, F.; Xiao, F. A Multifunctional Nanoplatform Based on Mesoporous Silica Nanoparticles for Imaging-Guided Chemo/Photodynamic Synergetic Therapy. *RSC Adv.* 2017, 7, 31133–31141, doi:10.1039/C7RA04549B.
128. Lin, X.; Wu, M.; Li, M.; Cai, Z.; Sun, H.; Tan, X.; Li, J.; Zeng, Y.; Liu, X.; Liu, J. Photo-Responsive Hollow Silica Nanoparticles for Light-Triggered Genetic and Photodynamic Synergistic Therapy. *Acta Biomater* 2018, 76, 178–192, doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.007.
129. Bretin, L.; Pinon, A.; Bouramtane, S.; Ouk, C.; Richard, L.; Perrin, M.L.; Chaunavel, A.; Carrion, C.; Bregier, F.; Sol, V.; et al. Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2019, 11, doi:10.3390/cancers11101474.
130. Mendes, R.; Pedrosa, P.; Lima, J.C.; Fernandes, A.R.; Baptista, P. V Photothermal Enhancement of Chemotherapy in Breast Cancer by Visible Irradiation of Gold Nanoparticles. *Sci Rep* 2017, 7, 10872, doi:10.1038/s41598-017-11491-8.
131. Wang, R.; Deng, J.; He, D.; Yang, E.; Yang, W.; Shi, D.; Jiang, Y.; Qiu, Z.; Webster, T.J.; Shen, Y. PEGylated Hollow Gold Nanoparticles for Combined X-Ray Radiation and Photothermal Therapy in Vitro and Enhanced CT Imaging in Vivo. *Nanomedicine* 2019, 16, 195–205, doi:https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.12.005.
132. Golombek, S.K.; May, J.-N.; Theek, B.; Appold, L.; Drude, N.; Kiessling, F.; Lammers, T. Tumor Targeting via EPR: Strategies to Enhance Patient Responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2018, 130, 17–38, doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007.
133. Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Targeted Photodynamic Therapy as Potential Treatment Modality for the Eradication of Colon Cancer. In *Multidisciplinary Approach for Colorectal Cancer*; Jeong, K.-Y., Ed.; IntechOpen: Rijeka, 2019; p. Ch. 4 ISBN 978-1-78984-400-9.
134. Sardoiwala, M.N.; Kushwaha, A.C.; Dev, A.; Shrimali, N.; Guchhait, P.; Karmakar, S.; Roy Choudhury, S. Hypericin-Loaded Transferrin Nanoparticles Induce PP2A-Regulated BMI1 Degradation in Colorectal Cancer-Specific Chemo-Photodynamic Therapy. *ACS Biomater Sci Eng* 2020, 6, 3139–3153, doi:10.1021/acsbomaterials.9b01844.
135. Wang, K.; Zhang, Y.; Wang, J.; Yuan, A.; Sun, M.; Wu, J.; Hu, Y. Self-Assembled IR780-Loaded Transferrin Nanoparticles as an Imaging, Targeting and PDT/PTT Agent for Cancer Therapy. *Sci Rep* 2016, 6, 27421, doi:10.1038/srep27421.
136. Tiwari, H.; Rai, N.; Singh, S.; Gupta, P.; Verma, A.; Singh, A.K.; Kajal; Salvi, P.; Singh, S.K.; Gautam, V. Recent Advances in Nanomaterials-Based Targeted Drug Delivery for Preclinical Cancer Diagnosis and Therapeutics. *Bioengineering* 2023, 10, doi:10.3390/bioengineering10070760.
137. Cisterna, B.A.; Kamaly, N.; Choi, W. II; Tavakkoli, A.; Farokhzad, O.C.; Vilos, C. Targeted Nanoparticles for Colorectal Cancer. *Nanomedicine* 2016, 11, 2443–2456, doi:10.2217/nnm-2016-0194.

138. Samuelsson, E.; Shen, H.; Blanco, E.; Ferrari, M.; Wolfram, J. Contribution of Kupffer Cells to Liposome Accumulation in the Liver. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017, 158, 356–362, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.014.
139. Yu, D.-H.; Lu, Q.; Xie, J.; Fang, C.; Chen, H.-Z. Peptide-Conjugated Biodegradable Nanoparticles as a Carrier to Target Paclitaxel to Tumor Neovasculature. *Biomaterials* 2010, 31 8, 2278–2292.
140. Tiernan, J.P.; Perry, S.L.; Verghese, E.T.; West, N.P.; Yeluri, S.; Jayne, D.G.; Hughes, T.A. Carcinoembryonic Antigen Is the Preferred Biomarker for in Vivo Colorectal Cancer Targeting. *Br J Cancer* 2013, 108, 662–667, doi:10.1038/bjc.2012.605.
141. dos Santos, A.F.; de Almeida, D.R.Q.; Terra, L.F.; Baptista, M.S.; Labriola, L. Photodynamic Therapy in Cancer Treatment - an Update Review. *J Cancer Metastasis Treat* 2019, 5, doi:10.20517/2394-4722.2018.83.
142. Li, J.; Wang, S.; Fontana, F.; Tapeinos, C.; Shahbazi, M.A.; Han, H.; Santos, H.A. Nanoparticles-Based Phototherapy Systems for Cancer Treatment: Current Status and Clinical Potential. *Bioact Mater* 2023, 23, 471–507.
143. Merlin, J.P.J.; Crous, A.; Abrahamse, H. Nano-Phototherapy: Favorable Prospects for Cancer Treatment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2024, 16.
144. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337.
145. O'Brien, M.A.; Kirby, R. Apoptosis: A Review of pro-Apoptotic and Anti-Apoptotic Pathways and Dysregulation in Disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2008, 18, 572–585.
146. Donohoe, C.; Senge, M.O.; Arnaut, L.G.; Gomes-da-Silva, L.C. Cell Death in Photodynamic Therapy: From Oxidative Stress to Anti-Tumor Immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019, 1872.
147. Axay, J.; Haque, N.; Lateef, A.; Patel, A.; Patel, P. Apoptosis and Its Role in Physiology. *International Journal of Livestock Research* 2017, 1, doi:10.5455/ijlr.20170624054330.
148. Farin, H.F.; Lüdtke, T.H.-W.; Schmidt, M.K.; Placzko, S.; Schuster-Gossler, K.; Petry, M.; Christoffels, V.M.; Kispert, A. Tbx2 Terminates Shh/Fgf Signaling in the Developing Mouse Limb Bud by Direct Repression of Gremlin1. *PLoS Genet* 2013, 9, e1003467-.
149. Denecker, G.; Hoste, E.; Gilbert, B.; Hochepeid, T.; Ovaere, P.; Lippens, S.; Van den Broecke, C.; Van Damme, P.; D'Herde, K.; Hachem, J.P.; et al. Caspase-14 Protects against Epidermal UVB Photodamage and Water Loss. *Nat Cell Biol* 2007, 9, 666–674, doi:10.1038/ncb1597.
150. Lavrik, I.N.; Golks, A.; Krammer, P.H. Caspase: Pharmacological Manipulation of Cell Death. *Journal of Clinical Investigation* 2005, 115, 2665–2672.

151. Couzinet, A.; Hérincs, Z.; Hueber, A.O. Programmed Cell Death' Regulation: Towards a More Dynamic Conception. *Medecine/Sciences* 2002, 18, 841–852.
152. Nicholson, D.W. Caspase Structure, Proteolytic Substrates, and Function during Apoptotic Cell Death;
153. "<https://bcgdevelop.fr/lapoptose/>."
154. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 1997, 91, 479–489, doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1).
155. Susin, S.A.; Daugas, E.; Ravagnan, L.; Samejima, K.; Zamzami, N.; Loeffler, M.; Costantini, P.; Ferri, K.F.; Irinopoulou, T.; Prévost, M.-C.; et al. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 2000, 192, 571–580, doi:10.1084/jem.192.4.571.
156. Caroline Pirou. Etude de la voie d'action intracrine et nucléaire du Fibroblast Growth Factor 1 dans des cellules de type neuronal. *Interactions cellulaires [q-bio.CB]*. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français.
157. « https://rnbio.upmc.fr/voies_signalisation_apoptose. »
158. Delbridge, A.R.D.; Grabow, S.; Strasser, A.; Vaux, D.L. Thirty Years of BCL-2: Translating Cell Death Discoveries into Novel Cancer Therapies. *Nat Rev Cancer* 2016, 16, 99–109, doi:10.1038/nrc.2015.17.
159. Li, J.; Yuan, J. Caspases in Apoptosis and Beyond. *Oncogene* 2008, 27, 6194–6206, doi:10.1038/onc.2008.297.
160. Jan, R.; Chaudhry, G. e. S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull* 2019, 9, 205–218.
161. Kessel, D.; Oleinick, N.L. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochem Photobiol* 2018, 94, 213–218, doi:<https://doi.org/10.1111/php.12857>.
162. Kaneko, T.; Chiba, H.; Yasuda, T.; Kusama, K. Detection of Photodynamic Therapy-Induced Early Apoptosis in Human Salivary Gland Tumor Cells in Vitro and in a Mouse Tumor Model. *Oral Oncol* 2004, 40, 787–792, doi:10.1016/j.oraloncology.2004.01.007.
163. Kowaltowski, A.J.; Turin, J.; Indig, G.L.; Vercesi, A.E. Mitochondrial Effects of Triarylmethane Dyes; 1999; Vol. 31.
164. Granville, D.J.; Carthy, C.M.; Jiang, H.J.; Levy, J.G.; McManus, B.; Matroule, J.Y.; Piette, J.; Hunt, D.W.C. Nuclear Factor-KappaB Activation by the Photochemotherapeutic Agent Verteporfin. *Blood* 2000, 95 1, 256–262.

165. Chiu, S.M.; Xue, L.Y.; Usuda, J.; Azizuddin, K.; Oleinick, N.L. Bax Is Essential for Mitochondrion-Mediated Apoptosis but Not for Cell Death Caused by Photodynamic Therapy. *Br J Cancer* 2003, 89, 1590–1597, doi:10.1038/sj.bjc.6601298.
166. Ferenc, P.; Solár, P.; Kleban, J.; Mikeš, J.; Fedoročko, P. Down-Regulation of Bcl-2 and Akt Induced by Combination of Photoactivated Hypericin and Genistein in Human Breast Cancer Cells. *J Photochem Photobiol B* 2010, 98, 25–34, doi:https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.10.004.
167. Hu, J.; Song, J.; Tang, Z.; Wei, S.; Chen, L.; Zhou, R. Hypericin-Mediated Photodynamic Therapy Inhibits Growth of Colorectal Cancer Cells via Inducing S Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2021, 900, 174071, doi:https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174071.
168. Ichimiya, T.; Yamakawa, T.; Hirano, T.; Yokoyama, Y.; Hayashi, Y.; Hirayama, D.; Wagatsuma, K.; Itoi, T.; Nakase, H. Autophagy and Autophagy-related Diseases: A Review. *Int J Mol Sci* 2020, 21, 1–21.
169. Saikia, R.; Joseph, J. AMPK: A Key Regulator of Energy Stress and Calcium-Induced Autophagy. *J Mol Med* 2021, 99, 1539–1551.
170. Li, W.W.; Li, J.; Bao, J.K. Microautophagy: Lesser-Known Self-Eating. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2012, 69, 1125–1136.
171. Tasset, I.; Cuervo, A.M. Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Metabolism. *FEBS Journal* 2016, 2403–2413.
172. Mizushima N; Yoshimori T; Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011, 27, 107–132.
173. Fidanzi-Dugas, C. Utilisation de Nouveaux Photosensibilisateurs Pour Le Traitement Du Cancer de La Prostate Par Photothérapie Dynamique : Etude in Vitro et in Vivo, 2016.
174. Pyo, J.-O.; Nah, J.; Jung, Y.-K. Molecules and Their Functions in Autophagy. *Exp Mol Med* 2012, 44, 73–80, doi:10.3858/emm.2012.44.2.029.
175. You, L.; Jin, S.; Li, Z.; Qian, W. Autophagy, Autophagy-Associated Adaptive Immune Responses and Its Role in Hematologic Malignancies; 2017; Vol. 8.
176. Brech, A.; Ahlquist, T.; Lothe, R.A.; Stenmark, H. Autophagy in Tumour Suppression and Promotion. *Mol Oncol* 2009, 3, 366–375, doi:https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.05.007.
177. Zdanowicz, A.; Grosicka-Maciąg, E. The Interplay between Autophagy and Mitochondria in Cancer. *Int J Mol Sci* 2024, 25.

178. Brech, A.; Ahlquist, T.; Lothe, R.A.; Stenmark, H. Autophagy in Tumour Suppression and Promotion. *Mol Oncol* 2009, 3, 366–375, doi:<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.05.007>.
179. Mathew, R.; Karantza-Wadsworth, V.; White, E. Role of Autophagy in Cancer. *Nat Rev Cancer* 2007, 7, 961–967, doi:10.1038/nrc2254.
180. Liu, E.Y.; Ryan, K.M. Autophagy and Cancer – Issues We Need to Digest. *J Cell Sci* 2012, 125, 2349–2358, doi:10.1242/jcs.093708.
181. White, E.; DiPaola, R.S. The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clinical Cancer Research* 2009, 15, 5308–5316.
182. CHO, D.-H.; JO, Y.K.; KIM, S.C.; PARK, I.N.J.A.; KIM, J.I.N.C. Down-Regulated Expression of ATG5 in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2012, 32, 4091–4096.
183. AHN, C.H.; JEONG, E.U.N.G.O.O.; LEE, J.W.O.O.; KIM, M.I.N.S.; KIM, S.H.E.E.; KIM, S.S.O.O.; YOO, N.A.M.J.I.N.; LEE, S.U.G.H. Expression of Beclin-1, an Autophagy-Related Protein, in Gastric and Colorectal Cancers. *APMIS* 2007, 115, 1344–1349, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.00858.x>.
184. Jae Myung Park Shengbing Huang, T.-T.W.N.R.F.; Sinicrope, F.A. Prognostic Impact of Beclin 1, P62/Sequestosome 1 and LC3 Protein Expression in Colon Carcinomas from Patients Receiving 5-Fluorouracil as Adjuvant Chemotherapy. *Cancer Biol Ther* 2013, 14, 100–107, doi:10.4161/cbt.22954.
185. Zeh, H.J.; Bahary, N.; Boone, B.A.; Singhi, A.D.; Miller-Ocuin, J.L.; Normolle, D.P.; Zureikat, A.H.; Hogg, M.E.; Bartlett, D.L.; Lee, K.K.; et al. A Randomized Phase II Preoperative Study of Autophagy Inhibition with High-Dose Hydroxychloroquine and Gemcitabine/Nab-Paclitaxel in Pancreatic Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2020, 26, 3126–3134, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-4042.
186. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzińska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2018, 106, 1098–1107.
187. Donohoe, C.; Senge, M.O.; Arnaut, L.G.; Gomes-da-Silva, L.C. Cell Death in Photodynamic Therapy: From Oxidative Stress to Anti-Tumor Immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2019, 1872, 188308, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>.
188. Chilakamarthi, U.; Giribabu, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *The Chemical Record* 2017, 17, 775–802, doi:<https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>.
189. Garg, A.D.; Nowis, D.; Golab, J.; Agostinis, P. Photodynamic Therapy: Illuminating the Road from Cell Death towards Anti-Tumour Immunity. *Apoptosis* 2010, 15, 1050–1071, doi:10.1007/s10495-010-0479-7.

190. Van Straten, D.; Mashayekhi, V.; De Bruijn, H.S.; Oliveira, S.; Robinson, D.J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel)* 2017, 9, doi:10.3390/cancers9020019.
191. Xue, Q.; Wang, X.; Wang, P.; Zhang, K.; Liu, Q. Role of P38MAPK in Apoptosis and Autophagy Responses to Photodynamic Therapy with Chlorin E6. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2015, 12, 84–91, doi:10.1016/j.pdpdt.2014.12.001.
192. Xiong, L.; Liu, Z.; Ouyang, G.; Lin, L.; Huang, H.; Kang, H.; Chen, W.; Miao, X.; Wen, Y. Autophagy Inhibition Enhances Photocytotoxicity of Photosan-II in Human Colorectal Cancer Cells. *Oncotarget* 2017, 8, 6419–6432.
193. Zhu, J.; Tian, S.; Li, K.T.; Chen, Q.; Jiang, Y.; Lin, H.D.; Yu, L.H.; Bai, D.Q. Inhibition of Breast Cancer Cell Growth by Methyl Pyropheophenylchlorin Photodynamic Therapy Is Mediated Through Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Autophagy in Vitro and Vivo. *Cancer Med* 2018, 7, 1908–1920, doi:10.1002/cam4.1418.
194. Puyal, J.; Ginet, V.; Vaslin, A.; Truttmann, A.C.; Clarke, P.G.H. Les Deux Visages de l'autophagie Dans Le Système Nerveux. *Medecine/Sciences* 2009, 25, 383–390.
195. Yeo, S.; Song, H.H.; Kim, M.J.; Hong, S.; Yoon, I.; Lee, W.K. Synthesis and Design of Purpurin-18-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improved Anticancer Efficiency of Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* 2022, 14, doi:10.3390/pharmaceutics14051064.
196. Sasaki, I.; Brégier, F.; Chemin, G.; Daniel, J.; Couvez, J.; Chkair, R.; Vaultier, M.; Sol, V.; Blanchard-Desce, M. Hydrophilic Biocompatible Fluorescent Organic Nanoparticles as Nanocarriers for Biosourced Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Nanomaterials* 2024, 14, doi:10.3390/nano14020216.
197. Riss, T.; Niles, A.; Minor, L. *Cell Viability Assays Assay Guidance Manual*. Assay Guid. Man. 2004, 1–23.
198. Daniel, J.; Montaleytang, M.; Nagarajan, S.; Picard, S.; Clermont, G.; Lazar, A.N.; Dumas, N.; Correard, F.; Braguer, D.; Blanchard-Desce, M.; et al. Hydrophilic Fluorescent Nanoprodrug of Paclitaxel for Glioblastoma Chemotherapy. *ACS Omega* 2019, 4, 18342–18354, doi:10.1021/acsomega.9b02588.
199. Li, T.F.; Xu, H.Z.; Xu, Y.H.; Yu, T.T.; Tang, J.M.; Li, K.; Wang, C.; Peng, X.C.; Li, Q.R.; Sang, X.Y.; et al. Efficient Delivery of Chlorin E6 by Polyglycerol-Coated Iron Oxide Nanoparticles with Conjugated Doxorubicin for Enhanced Photodynamic Therapy of Melanoma. *Mol Pharm* 2021, 18, 3601–3615, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.1c00510.
200. Zhu, Y.; Xue, J.; Chen, W.; Bai, S.; Zheng, T.; He, C.; Guo, Z.; Jiang, M.; Du, G.; Sun, X. Albumin-Biomimetic Nanoparticles to Synergize Phototherapy and Immunotherapy against Melanoma. *Journal of Controlled Release* 2020, 322, 300–311, doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.045.
201. Conner, S.D.; Schmid, S.L. Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* 2003.

202. Kumar, D.; Mutreja, I.; Chitcholtan, K.; Sykes, P. Cytotoxicity and Cellular Uptake of Different Sized Gold Nanoparticles in Ovarian Cancer Cells. *Nanotechnology* 2017, 28, doi:10.1088/1361-6528/aa935e.
203. Simelane, N.W.N.; Abrahamse, H. Zinc Phthalocyanine Loaded- Antibody Functionalized Nanoparticles Enhance Photodynamic Therapy in Monolayer (2-D) and Multicellular Tumour Spheroid (3-D) Cell Cultures. *Front Mol Biosci* 2023, 10, doi:10.3389/fmolb.2023.1340212.
204. Simelane, N.W.N.; Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Targeted Nanoparticle Photodynamic Diagnosis and Therapy of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2021, 22, doi:10.3390/ijms22189779.
205. Sardoiwala, M.N.; Kushwaha, A.C.; Dev, A.; Shrimali, N.; Guchhait, P.; Karmakar, S.; Roy Choudhury, S. Hypericin-Loaded Transferrin Nanoparticles Induce PP2A-Regulated BMI1 Degradation in Colorectal Cancer-Specific Chemo-Photodynamic Therapy. *ACS Biomater Sci Eng* 2020, 6, 3139–3153, doi:10.1021/acsbiomaterials.9b01844.
206. Canti, G.; Calastretti, A.; Bevilacqua, A.; Reddi, E.; Palumbo, G.; Nicolini, A. Combination of Photodynamic Therapy + Immunotherapy + Chemotherapy in Murine Leukemia. *Neoplasma* 2010, 57, 184–188, doi:10.4149/neo_2010_02_184.
207. Gunaydin, G.; Gedik, M.E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. *Front Chem* 2021, 9.
208. Ng, C.W.; Li, J.; Pu, K. Recent Progresses in Phototherapy-Synergized Cancer Immunotherapy. *Adv Funct Mater* 2018, 28, 1804688, doi:https://doi.org/10.1002/adfm.201804688.

Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs innovant en thérapie photodynamique anticancéreuse dans le traitement du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est l'une des tumeurs malignes les plus diagnostiquées au monde, et les modalités thérapeutiques conventionnelles actuelles sont souvent invasives, résistantes et induisent des effets secondaires toxiques sur les tissus sains. C'est pourquoi de nouvelles approches thérapeutiques ciblées se développent. Dans cette optique, on trouve la thérapie photodynamique (PDT) qui présente plusieurs avantages évidents par rapport aux modalités classiques, telles qu'une invasivité minimale, une grande sélectivité vis-à-vis des tissus cancéreux et moins d'effets secondaires. La PDT est une alternative thérapeutique approuvée cliniquement et actuellement utilisée pour plusieurs tumeurs solides, déclenchant la mort cellulaire par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cependant, la nature hydrophobe de la plupart des photosensibilisateurs (PS) utilisés, tels que les chlorines, limite l'efficacité globale de la PDT. Pour surmonter cette limitation, l'utilisation de nanovecteurs semble être une approche puissante. Dans cette perspective, nous avons récemment développé des nanoparticules organiques fluorescentes (FONP) solubles dans l'eau et biocompatibles, fonctionnalisées avec de la purpurine-18 (Pp-18) et son dérivé, la chlorine p6 (Cp6), en tant que nouveaux agents de PDT. L'objectif de cette étude a été de déterminer *in vitro* le potentiel phototoxique des FONPs[Cp6] dans le traitement des modèles cellulaires 2D et 3D de lignées du CCR. Nos résultats montrent des effets phototoxiques importants des FONPs[Cp6], médiés par la génération des ERO intracellulaires dans les cellules de CCR HCT116 et HT-29. En outre après la PDT, nous avons prouvé que les FONPs[Cp6] induisent l'apoptose par la voie mitochondriale intrinsèque, mais également l'autophagie. Notre travail démontre l'activité photodynamique de ces nanoparticules, ce qui en fait des candidats prometteurs pour le traitement du CCR.

Mots-clés : Cancer Colorectal, Thérapie Photodynamique, Purpurine-18, Nanovecteurs, FONPs, Apoptose, Autophagie

Use of new photosensitizers in anticancer photodynamic therapy for the treatment of colorectal cancer

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequently diagnosed malignancies worldwide, and current conventional therapeutic modalities are often invasive, resistant, and induce toxic side effects on healthy tissue. This is why new targeted therapeutic approaches are being developed. One such approach is photodynamic therapy (PDT), which offers several advantages over conventional modalities, such as minimal invasiveness, high selectivity towards cancerous tissue, and fewer side effects. PDT is a clinically-approved therapeutic alternative currently used for several solid tumors, triggering cell death through the generation of reactive oxygen species (ROS). However, the hydrophobic nature of most of the photosensitizers (PS) used, such as chlorines, limits the overall efficacy of PDT. To overcome this limitation, the use of nanovectors appears to be a powerful approach. With this in mind, we have recently developed water-soluble and biocompatible fluorescent organic nanoparticles (FONPs) functionalized with purpurin-18 (Pp-18) and its derivative, chlorin p6 (Cp6), as novel PDT agents. This study aimed to determine *in vitro* the phototoxic potential of FONPs[Cp6] in the treatment of 2D and 3D cell models of CRC lines. Our results show significant phototoxic effects of FONPs[Cp6], mediated by the generation of intracellular ROS in HCT116 and HT-29 CRC cells. Furthermore, after PDT, we demonstrated that FONPs[Cp6] induce apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway and autophagy. Our work demonstrates the photodynamic activity of these nanoparticles, making them promising candidates for the treatment of CRC.

Keywords : Colorectal Cancer, Photodynamic Therapy, Purpurin-18, Nanocarriers, FONPs, Apoptosis, Autophagy

