

Université de Limoges
ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)
LABC*i*S, 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
Lucie Paulus

Le 7 décembre 2023

**Nouveaux photosensibilisateurs fonctionnalisés par
des complexes arène-ruthénium actifs en thérapie
photodynamique : signalisation intracellulaire et
évaluation *in vitro* sur des modèles de cancer
prostatique**

Thèse dirigée par :

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

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

JURY :

Président du jury

M. **Jean-Michel PETIT**, Professeur des Universités, Université de Limoges, France

Rapporteurs

Mme **Pascale COHEN**, Professeur des Universités, Université de Lyon 1, France

Mme **Maité SYLLA**, Professeur des Universités, CNAM Paris, France

Examineurs

M. **Bruno THERRIEN**, Professeur des Universités, Université de Neuchâtel, Suisse



A mes grands-parents

*Le plus grand secret de la réussite, c'est de se fixer un but et de ne
le perdre jamais de vue*

Christine de Suède, reine de Suède

Remerciements

A M. le Professeur Jean-Michel PETIT

Professeur des Universités

**Université de Limoges – Faculté des Sciences et Techniques – Laboratoire LABCiS,
UR22722**

Je suis énormément touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être le Président du Jury de ma soutenance de thèse. Après tant d'années parcourues, pour vous comme pour moi s'ouvre un nouveau chapitre. Soyez assuré, Monsieur, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Mme le Professeur Pascale COHEN

Professeur des Universités

Université Claude Bernard Lyon 1 – Faculté de Médecine - INSERM UMR U1033

Veillez 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 rapporteur. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de tout mon respect.

A Mme le Professeur Maité SYLLA

Professeur des Universités

**HESAM Université - Conservatoire National des Arts et Métiers – Laboratoire BCM,
EA7528**

Veillez 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 rapporteur. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de tout mon respect.

A M. le Professeur Bruno THERRIEN

Professeur des Universités

Université de Neuchâtel – Institut de Chimie – Suisse

Je tenais sincèrement à vous remercier de me faire l'honneur d'être membre de ce jury et d'accepter d'examiner mes travaux de thèse. Sans vous, ainsi que Bertrand, ce projet n'aurait pu voir le jour. Merci infiniment pour votre implication au cours de la publication de mon article et de votre expertise. Merci d'avoir permis à Manuel de synthétiser ces différents complexes au sein de votre laboratoire. Je vous exprime ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

A M. le Professeur Bertrand LIAGRE

Professeur des Universités

Université de Limoges – Faculté de Pharmacie – Laboratoire LABC*i*S UR 22722

Je tenais à vous remercier pour ces quatre années d'accompagnement. Dans un premier temps, merci d'avoir permis à ce projet de voir le jour de par votre implication au sein du laboratoire et des divers projets existants. Merci pour votre disponibilité à toute épreuve malgré vos nombreuses fonctions. Merci pour vos conseils, ainsi que vos encouragements au cours de nos échanges. Merci également pour ces deux congrès auxquels sans vous je n'aurais pas pu participer. Soyez assuré Bertrand, de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

A M. le Docteur David Yannick LEGER

Maître de Conférences

Université de Limoges – Faculté de Pharmacie – Laboratoire LABC*i*S UR 22722

David, un grand merci pour ton accompagnement tout au long de cette thèse malgré tes fonctions de Vice-Doyen. Merci pour ton implication scientifique ainsi que tes bons conseils. Nos échanges ont toujours été une source de savoir pour moi afin d'avancer mes travaux de recherche. Soit assuré, David, de toute ma reconnaissance et mon respect.

A M. le Professeur Vincent SOL

Professeur des Universités

Université de Limoges – Faculté des Sciences et Techniques – Laboratoire LABC*i*S, UR22722

Je tenais à vous remercier de m'avoir permis d'intégrer votre équipe au début de ma thèse. Merci également pour nos échanges lors du congrès à Nancy.

A Aline PINON,

J'étais obligée de démarrer avec toi ma bonne dame ! Comment te remercier, toi qui tous les jours cours dans les couloirs au détriment de ton genou. Merci pour toutes les commandes passées à la hâte, pour cette gestion et cette organisation qui te caractérisent. J'espère que tu te rends compte à quel point tu es indispensable à cette équipe. Merci pour ta disponibilité à toute heure, ton implication et ta bonne humeur.

A Frédérique MARTIN,

Merci à toi Fred, toujours là pour m'écouter, parler ou me prodiguer de bons conseils. Bien que tu penses avoir la réputation d'être « ronchon », j'ai trouvé nos échanges plutôt sympathiques ! Notre passion des chats nous a bien évidemment rapproché, mais je retiendrais avant tout ta gentillesse.

A M. le Docteur Guillaume CHEMIN,

Je n'ai pas eu énormément l'occasion d'échanger avec toi bien que ton bureau soit juste à côté. Je te remercie pour ces quelques échanges et tes conseils.

A M. le Docteur Manuel GALLARDO-VILLAGRÀN

Sans toi tout ceci aurait été impossible. Je te remercie pour ton implication dans notre collaboration, dans nos projets de thèse respectifs. Merci d'avoir toujours eu le bon mot même en étant loin. Désolée de toujours écorcher ton nom de famille mon espagnol n'étant pas toujours bon... Merci d'être toujours là même si tu as fini depuis plus d'un an.

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

Merci à toi **Mme Catherine OUK** pour nos nombreux échanges sur ce fameux Cytoflex. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer le retraitement des datas, merci de ton implication. Et à toi **Mme Claire CARRION**, mon Dieu que d'heures passées en microscopie avec toi pour notre plus grand bonheur. Ces petites parenthèses du vendredi ont aiguayé ma thèse. Merci pour ton analyse pointue, ta bonne humeur, ton rire et tes petites chansons qui restent en tête. Je suis sûre que la plateforme de microscopie est bien triste sans mes venues haha.

Aux doctorants du Laboratoire,

A Hind, Valentin, Suzan, Rayan, Jacquie, Soufiane, je vous remercie pour nos moments d'échanges ensemble, cela a été un plaisir de faire votre connaissance.

A Ludo, même si je t'ai rencontré brièvement au sein de ta thèse, c'est surtout après que nous avons échangé toi et moi. Merci pour tout aussi bien sur le plan scientifique que personnel tu as été d'un grand soutien.

A Mme Léa GIBOT-LECLERC

Je ne pouvais pas passer à côté de toi. Comme dirait Bertrand si on en cherche une ou trouvera l'autre ! Merci d'avoir été là au sein du laboratoire et pas que... Crois en tes capacités, regarde tout ce que tu accomplis et tu verras que tu es un élément central de ton unité. Ne change rien, merci pour tout.

Aux membres de l'UR22722 LABCiS

Je tiens à remercier **M. le Docteur Sébastien LEGARDINIER** sans qui je pense je n'en serais pas là. Merci de m'avoir donné ce goût de la science au cours de mes stages de M1 et M2. Merci pour votre bonne humeur et votre humour légendaire. Merci à **Mme Sylvie POIRIER** pour sa disponibilité à toute épreuve lors de mes déplacements et autres petits papiers administratifs !

Aux membres de l'équipe pédagogique

Merci tout particulièrement à Sabine LHERNOULD pour sa gentillesse et sa disponibilité pendant mon année d'ATER. Merci également à Stéphanie DURAND et Fabrice DUPUY pour nos différents échanges au cours de cette thèse. Merci également à tout le personnel technique notamment ma petite Nelly VALLAT avec sa bonne humeur quotidienne et son sourire ravageur.

Aux doctorants rencontrés au cours de cette thèse

J'en retiens particulièrement 2 hahah. Merci à vous Stecy et Léa ce duo de choc ! Merci à toi ma Moule et à toi Lélé, vraiment sans vous et votre soutien sans faille je ne sais pas où j'en serais. Dire que tout a démarré par notre élection en représentantes des docs. Vous me manquez mais heureusement que j'ai de vos nouvelles quasi quotidiennement. Merci pour tout.

A mon Chaton

Merci d'avoir toujours été là. M'avoir écouté et donné les meilleurs conseils possibles. Merci de m'avoir écouté râler (beaucoup).

A mes amis de toujours, Laura, Eloïse et Emeline

Merci d'avoir toujours fait partie des quatre fantastiques. D'avoir toujours été là et d'avoir accepté toutes mes planifications de WE ! Vous êtes sans aucun doute mes meilleures amies. Emeline tu as une place toute particulière depuis le temps déjà 21 ans à me supporter...

A Katy et Théo

Vous ayant rencontré en master je vous mets ensemble ! Merci pour tout, d'avoir toujours été là peu importe les épreuves. Merci d'être toujours là 6 ans après.

A ma famille,

A mes parents, sans qui évidemment tout cela ne serait pas possible. Merci d'avoir toujours cru en moi, m'avoir toujours aidé et soutenu pendant toutes ces années. Votre petite fille a bien grandi. Merci d'être mon pilier. Je vous aime.

A ma sœur et mon beau-frère, merci d'avoir toujours été présents. Merci de m'avoir permis d'être la tata la plus cool de l'univers. Merci de m'avoir beaucoup (trop) écouté, de m'avoir vu probablement dans tous mes états. Vous êtes géniaux, ne changer rien, vous comptez beaucoup pour moi (oui même toi Romain). Hâte de voir Charles grandir. Je vous aime.

A Antoine,

Je ne sais pas vraiment comment tu as fait pour me supporter lors de cette dernière année mais apparemment ça te plaît. Merci d'être là, encore et toujours à mes côtés. Merci de prendre soin de moi quand je ne le fais pas. Merci de m'avoir permis de rire même quand le moral n'y était pas. On forme désormais une équipe, j'ai hâte de voir où nous irons. Je vais faire bref, tu sais déjà tout, je t'aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	4
Liste des abréviations	17
Introduction	21
Partie I. Le cancer de la prostate	22
I.1. La prostate	22
I.1.1. Localisation et fonctions de la prostate	22
I.1.2. Structure de la prostate	23
I.1.2.1. L'épithélium prostatique	23
I.1.2.2. Stroma prostatique	23
I.1.3. Histologie de la prostate	24
I.1.4. Pathologies associées à la prostate	25
I.1.4.1. La prostatite	25
I.1.4.2. L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP)	26
I.1.4.3. Le cancer	26
I.2. Le cancer de la prostate	27
I.2.1. Epidémiologie du cancer de la prostate	27
I.2.2. Anatomopathologie	28
I.2.2.1. Histologie du cancer de la prostate	28
I.2.2.2. La classification TNM	28
I.2.2.3. Score de Gleason	31
I.2.2.4. AJCC : stadification multicritères (TNM, Score de Gleason et PSA)	33
I.2.3. Facteurs de risques	33
I.2.3.1. L'âge	34
I.2.3.2. Prédisposition génétique	34
I.2.3.3. Ethnie	35
I.2.3.4. Obésité et syndrome métabolique	35
I.2.3.5. Tabagisme et alcool	35
I.2.3.6. Activité physique, régime alimentaire et nutrition	35
I.2.3.7. Médicaments	35
I.2.4. Diagnostic du cancer de la prostate	36
I.2.4.1. Toucher rectal	36
I.2.4.2. Biopsie	36
I.2.4.3. Le PSA (Prostate Specific Antigen)	36
I.2.4.4. Biomarqueurs urinaires	38
I.3. L'Androgéno-dépendance	38
I.3.1. Structure et fonction du récepteur des androgènes	38
I.3.2. La résistance à la castration	40
I.3.3. Mutations ponctuelles du récepteur aux androgènes (RA)	40
I.3.4. Mutations non-sens et variants d'épissage du RA	41
I.4. Les traitements	41
I.4.1. La surveillance active	42
I.4.2. La prostatectomie radicale	43
I.4.3. La radiothérapie externe	43
I.4.4. La curiethérapie	44

I.4.5. L'hormonothérapie.....	44
I.4.5.1. Orchidectomie (castration chirurgicale)	45
I.4.5.2. Les agonistes de la LH-RH	45
I.4.5.3. Les antagonistes de la LH-RH.....	45
I.4.5.3.1. L'Abiratérone.....	45
I.4.5.3.2. Le Kétoconazole.....	46
I.4.6. La chimiothérapie	46
I.4.7. L'immunothérapie	46
I.4.8. La thérapie focale	46
I.4.8.1. Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (HIFU).....	46
I.4.8.2. La cryothérapie	47
I.4.8.3. La radiofréquence interstitielle (RITA)	48
I.4.8.4. L'électroporation irréversible (IRE)	48
I.4.8.5. La thérapie laser	49
Partie II. L'apoptose	50
II.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose.....	51
II.2. Les voies d'induction de l'apoptose	52
II.2.1. Les acteurs majeurs de l'apoptose : les caspases	52
II.2.1.1. Structure des caspases.....	52
II.2.1.2. L'activation des caspases	53
II.2.1.2.1. L'activation des caspases initiatrices	53
II.2.1.2.2. L'activation des caspases effectrices.....	54
II.2.1.3. L'action des caspases	54
II.2.2. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale	55
Partie III. La thérapie photodynamique	59
III.1. Historique.....	59
III.2. Principe et mécanisme d'action.....	60
III.2.1. Principe	60
III.2.2. Mécanisme de la PDT	60
III.3. Les réactions photochimiques.....	64
III.3.1. Les réactions photochimiques de type I.....	65
III.3.2. Les réactions photochimiques de type II.....	66
III.4. Le photo-blanchiment des photosensibilisateurs	67
III.5. Les photosensibilisateurs	67
III.5.1. Les PS non tétrapyrroliques.....	68
III.5.1.1. L'hypericine	68
III.5.1.2. La curcumine	69
III.5.1.3. Le bleu de méthylène	69
III.5.1.4. Le rose bengale	69
III.5.2. Les PS tétrapyrroliques	70
III.5.2.1. Les photosensibilisateurs de première génération	70
III.5.2.2. Les photosensibilisateurs de deuxième génération	72
III.5.2.2.1. Le Foscan®.....	73
III.5.2.2.2. Le Vertéporfine	73
III.5.2.2.3. Le Tookad®.....	74
III.5.2.2.4. La Talaporfine.....	75

III.5.2.2.5. Le Levulan®	75
III.5.2.3. Les photosensibilisateurs de troisième génération	77
III.5.2.3.1. Les PS couplés aux stéroïdes sexuels.....	77
III.5.2.3.2. Les PS polyaminés	78
III.5.2.3.3. Les PS couplés aux anticorps monoclonaux.....	79
III.5.2.3.4. Les PS nanovectorisés	79
III.5.3. PDT et cancer de la prostate	81
Partie IV. Utilisation des métaux dans les traitements contre le cancer.....	83
IV.1. Historique	83
IV.2. Les médicaments anti-tumoraux à base de platine	83
IV.2.1. Mécanisme moléculaire du cisplatine	84
IV.3. Une alternative au platine : le ruthénium.....	85
IV.3.1. Le ruthénium comme agent anticancéreux.....	86
IV.3.1.1. NAMI-A.....	86
IV.3.1.2. KP1019.....	87
IV.3.2. Les complexes arène-ruthénium dans le traitement anticancéreux	88
IV.3.2.1. RM175.....	89
IV.3.2.2. ONCO4417.....	89
IV.3.2.3. Les ruthplatines	90
IV.3.3. Complexe arène-Ru (II) en essais cliniques	90
IV.3.4. Les complexes arène-ruthénium en tant que vecteurs pour le transport intracellulaire de PS	91
Objectifs de thèse.....	95
Résultats	96
Partie V. Application de complexes arène-ruthénium dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde	97
V.1. Article 1	97
V.2. Article 2	115
V.3. Article 3	125
Partie VI. Application des complexes arène-ruthénium dans le traitement du CaP	136
VI.1. Article 4	136
VI.2. Résultats complémentaires sur le CaP	153
VI.2.1. Etude de la viabilité cellulaire	153
VI.2.2. Effet phototoxique médié par la production d'ERO	155
VI.2.3. Localisation des composés	156
VI.2.4. Induction de l'apoptose	159
VI.2.5. Conclusion	162
Partie VII. Application des complexes arène-ruthénium dans le traitement d'autres cancers	163
VII.1. Article 5	163
VII.2. Article 6	174
Discussion générale et perspectives	197
Références bibliographiques	201

Table des illustrations

Figure 1 : Localisation de la prostate	22
Figure 2 : Structures cellulaires de la prostate	23
Figure 3 : Représentation des différentes zones de la prostate	25
Figure 4 : Représentation d'une hypertrophie bénigne de la prostate (HBP)	26
Figure 5 : Epidémiologie du cancer de la prostate	27
Figure 6 : Estimation des taux bruts d'incidence du cancer de la prostate en 2020	34
Figure 7 : Représentation d'une biopsie de la prostate	36
Figure 8 : Structure moléculaire de la protéine codant le récepteur des androgènes (RA)	39
Figure 9 : Voie de signalisation génomique (A) et non génomique (B) du récepteur aux androgènes (RA)	40
Figure 10 : Variants actifs du récepteur des androgènes (RA)	41
Figure 11 : Schéma anatomique avant et après prostatectomie	43
Figure 12 : La radiothérapie externe et le cancer de la prostate	44
Figure 13 : Schéma traitement HIFU et cancer de la prostate.....	47
Figure 14 : Schéma cryothérapie et cancer de la prostate	48
Figure 15 : Comparaison du phénomène d'apoptose et de nécrose.....	50
Figure 16 : Activité apoptotique défectueuse lors de la différenciation des membres chez la souris.	51
Figure 17 : Structure des domaines et classification fonctionnelle des caspases chez l'homme.....	53
Figure 18 : Mécanismes d'activation des caspases initiatrices et effectrices.....	54
Figure 19 : Représentation de l'assemblage de l'apoptosome.....	55
Figure 20 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	56
Figure 21 : Interaction des deux voies entre elles.	57
Figure 22 : Voie des récepteurs de mort de l'apoptose	58
Figure 23 : Chronologie sur l'histoire de la photothérapie dynamique (1900 à aujourd'hui) ...	59
Figure 24 : Principe de la PDT.....	60
Figure 25 : Représentation de la photothérapie dynamique et du photodiagnostic	61
Figure 26 : Intervention pour l'ablation de tumeurs pelviennes rénales par photodiagnostic.	62
Figure 27 : Détection de lésion cancéreuse au niveau de la vessie	63
Figure 28 : Principe général de la PDT	64
Figure 29 : Diagramme de Jablonski	65

Figure 30 : Les réactions photochimiques de type I	66
Figure 31 : Les réactions photochimiques de type II	66
Figure 32 : Relation entre la durée de vie, la réactivité et la distance de diffusion des ERO .	66
Figure 33 : Structure chimique de l'hypericine	68
Figure 34 : Structure chimique de la curcumine	69
Figure 35 : Structure chimique du bleu de méthylène	69
Figure 36 : Structure chimique du rose bengale.....	70
Figure 37 : Structure du Photofrin®	72
Figure 38 : Structure du Foscan®.....	73
Figure 39 : Structure de la Vertéporfine	74
Figure 40 : Structure du Tookad®	74
Figure 41 : Structure de la Talaporfine.....	75
Figure 42 : Structure du 5-ALA et de la PpIX	76
Figure 43 : Biosynthèse de l'hème.....	76
Figure 44 : Structure du complexe estradiol-tétraphénylporphyrine (TPP)	78
Figure 45 : Structure de la PpIX disperminée (PpIX-dSm)	78
Figure 46 : Mécanisme d'action du cisplatine.....	85
Figure 47 : Structure du NAMI-A.....	87
Figure 48 : Structure du KP1019	87
Figure 49 : Nouveaux complexes organométalliques à base de Ru utilisés par l'étude de l'équipe de Sadler.	88
Figure 50 : Structures des complexes à base de Ru utilisés par l'équipe de Dyson.....	89
Figure 51 : Structure du RM175.....	89
Figure 52 : Structure de deux ruthplatines.	90
Figure 53 : Structure du TLD-1433.	91
Figure 54 : Complexes bimétalliques utilisés en tant que clips.....	91
Figure 55 : Ligands ou panels utilisés afin de donner naissance à des cages prismatiques ou cubiques.....	92
Figure 56 : Cage arène-Ru prismatique contenant un PS à l'intérieur de sa cavité.....	92
Figure 57 : Cage arène-Ru cubique utilisant le (5,10,15,20-tétra(4-pyridyl)-21H,23H-porphine) comme panel.....	93
Figure 58 : Cages arène-Ru cubiques contenant de la TPyP (2H), du Zn-TPyP ou du Co-TPyP	94

Figure 59 : Cages arène-Ru prismatiques contenant de la Por, Pc ou ZnPc à droite ou de la Por et Mg-Por à gauche	94
Figure 60 : Structure de la cage prismatique utilisée dans cette étude.....	153
Figure 61 : Photosensibilisateurs utilisés dans cette étude.....	153
Figure 62 : Phototoxicité des PS sur les lignées DU145 et PC-3.	154
Figure 63 : Induction de la production d'EROs.....	155
Figure 64 : Localisation des PS	159
Figure 65 : Effets des composés sur les lignées du CaP	160
Figure 66 : Induction de la fragmentation de l'ADN.....	161

Table des tableaux

Tableau 1 : Lettre T de la classification TNM	29
Tableau 2 : Lettre N de la classification TNM.....	30
Tableau 3 : Lettre M de la classification TNM	31
Tableau 4 : Les différents stades de cancer de la prostate selon la classification TNM	31
Tableau 5 : La classification de Gleason	32
Tableau 6 : Lien entre le score de Gleason et le grade du cancer de la prostate	33
Tableau 7 : La stadification multicritères de l(American Joint Committee on cancer (AJCC) .	33
Tableau 8 : Différentes options de traitements du cancer de la prostate et effets indésirables potentiels.....	41
Tableau 9 : Photosensibilisateurs de première génération.....	71
Tableau 10 : Photosensibilisateurs de deuxième génération et leur utilisation	77
Tableau 11 : Photosensibilisateurs de troisième génération et leur application.....	80
Tableau 12 : Essais cliniques de la PDT dans le traitement du CaP	82
Tableau 13 : Chronologie des trois générations de médicaments à base de platine et autorisation de mise sur le marché	84
Tableau 14 : Valeurs des IC ₅₀ et du PI sur les lignées PC-3 et DU145	154

Liste des abréviations

5-ALA : 5-Aminolevulinic acid

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADT : Androgen deprivation therapy

AEM : Agence Européenne des Médicaments

AIF : Apoptosis Inudcinf Factor

AJCC : American Joint Commitee on Cancer

AMH : Anti-Müllerian Hormone

Apaf-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

ARE : Androgen Response Element

Au : Or

AUA : American Urological Association

B

BM : Bleu de méthylène

C

CaP : Cancer de la prostate

CARD : Caspase Activation Recrutement Domain

Co : Cobalt

Co-TPyP : Cobalt-tétrapyridylporphine

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CCR : Cancer Colorectal

CTR1 : Copper Transporter 1

Cyt c : Cytochrome C

D

DBD : DNA-Binding Domain

DCF : 2', 7'-dichlorofluorescéine

DCFDA : 2', 7'- dichlorofluorescéine diacétate

DED : Death Effector Domain

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHT : Dihydrotestostérone

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E

EAU : European Association of Urology

ECBU : Examen cytbactériologique urinaire

Effet EPR : Enhanced Permability and Retention effect

ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

F

FADD : Fas Associated Death Domain

FDA : Food and Drug Administration

G

GIST : Gastro-Intestinal Stroma Tumor

H

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HBP : Hypertrophie Bénigne de la Prostate

HIFU : High-Intensity Focused Ultrasound

Hp : Hematoporphyrin

HpD : Hematoporphyrin derivative

HSP : Heat Shock Proteins

I

IAP : Inhibitor of Apoptosis

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

IGF-1 : Insulin-like growth factor-1

IL : Interleukine

IMC : Indice de Masse Corporelle

IMT : Inflammatory Myofibroblastic Tumor

iPS : Induced pluripotent stem cells

IRE : Irreversible Electroporation

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

L

LBD : Ligand Binding Domain

LHRH : Luteinizing Hormone-Releasing Hormone

LITT : Laser Interstitial Thermal Therapy

M

MEC : Matrice Extracellulaire

Mg : Magnésium

Mg-Por : Magnésium-Porphine

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

mTHPC : m-tétrahydrophénylchlorine

N

NLS : Nuclear Localization Signal

NTD : Domaine N-terminal

NP : Nanoparticules

P

PAP : Phosphatases Acides Prostatiques

PARP-1 : Poly(ADP-ribose)-polymérase-1

Pc : Phtalocyanine

PD : Photodiagnostic

PDT : Photodynamic Therapy

PGE2 : Prostaglandine E2

Por : Porphine

PpIX : Protoporphyrine IX

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PS : Photosensibilisateurs

PSA : Prostate Specific Antigen

PTT : Photothermal therapy

R

RA : Récepteur aux androgènes

RAPTA : Ruthenium Arene PTA

RB : Rose de Bengale

RC : Région charnière

RE : Réticulum Endoplasmique

RITA : Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation

Ru : Ruthénium

S

S : Substrat

SIA : Syndrome d'insensibilité aux androgènes

STUMP : Smooth muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential

T

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TPP : Tétraphénylporphyrine

TPyP : Tétrapyridylporphine

TR : Toucher Rectal

TRADD : TNF Receptor Associated Death Domain

TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

TRUS : Transrectal Ultrasound Scan

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VTP : Vascular Targeted Photodynamic Therapy

W

WB : Western blot

Z

Zn : Zinc

ZnPc : Zinc-Phtalocyanine

Zn-TPyP : Zinc-Tétrapyridylporphine

Partie I. Le cancer de la prostate

I.1. La prostate

I.1.1. Localisation et fonctions de la prostate

La prostate est une glande de petite taille faisant partie de l'appareil reproducteur masculin. Celle-ci se situe sous la vessie en avant du rectum. Elle est traversée sur toute sa longueur par le canal de l'uretère, jonction des voies urinaires et spermatiques permettant l'acheminement du sperme pendant l'éjaculation ainsi que l'excrétion de l'urine pendant la miction. Son rôle principal est de produire le liquide prostatique riche en enzymes, protéines et minéraux nécessaires aux spermatozoïdes ; et fait aussi partie intégrante du métabolisme des hormones sexuelles chez l'homme (principalement la testostérone) en permettant la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone qui correspond à un métabolite plus actif (Figure 1).

La prostate est recouverte d'une capsule prostatique : bande fibromusculaire externe inséparable du stroma prostatique. Elle se situe le plus à l'extérieur de la glande prostatique. En avant, la capsule n'est pas clairement évidente et est difficilement différenciable du stroma fibromusculaire antérieur de la prostate. Celle-ci est également déficiente au niveau de la base et de l'apex de la prostate où le stroma se confond avec le muscle détrusor et les fibres du sphincter urétral, respectivement. Celle-ci est constituée de 3 types cellulaires, ayant chacun une fonction particulière de la glande :

- Les cellules fibreuses qui maintiennent la structure de la glande
- Les cellules glandulaires qui sécrètent les liquides pour l'éjaculation. Elles produisent en partie le liquide séminal, le reste étant produit par les vésicules séminales.
- Les cellules musculaires qui règlent le jet d'urine et l'éjaculation. Elles formeront ainsi deux sphincters : l'un lisse et l'autre strié. Les fibres musculaires lisses forment le sphincter interne qui entoure la partie supérieure de l'urètre, permettant l'écoulement de l'urine. Les fibres musculaires striées formeront le sphincter externe, responsable de l'acte volontaire de la miction.

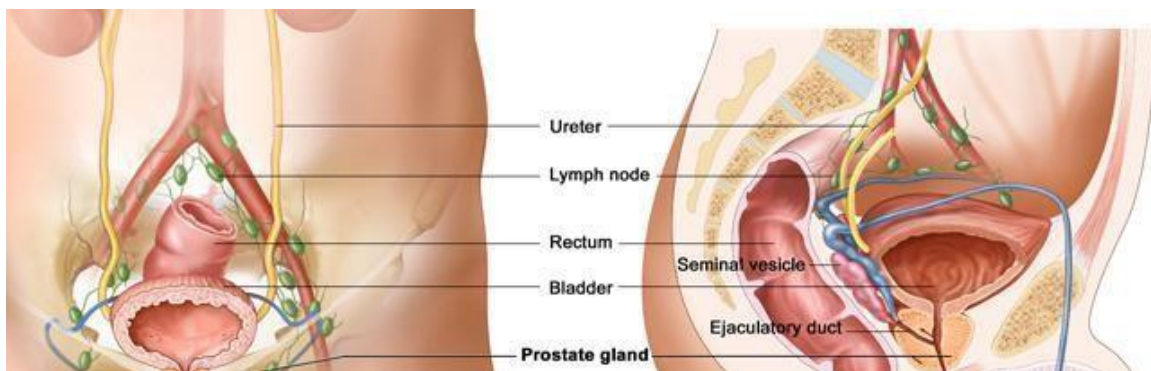


Figure 1 : Localisation de la prostate

Représentation de l'appareil reproducteur masculin. La prostate se situe sous la vessie en avant du rectum, elle entoure le canal de l'uretère et présente des glandes accessoires : les vésicules séminales. Source : centre hospitalier de Libourne

I.1.2. Structure de la prostate

Si l'on s'intéresse à l'histologie de la prostate, celle-ci est composée de 30 à 50 glandes composées d'alvéoles (acinis) et de canaux excréteurs revêtus d'un épithélium et entouré par le stroma prostatique (Figure 2). En volume, la prostate est composée d'environ 30% de cavité, 30% de tissu épithélial, 10 à 20% de tissu musculaire et 20 à 30% de tissu conjonctif respectivement.

I.1.2.1. L'épithélium prostatique

L'épithélium prostatique est composé de plusieurs types cellulaires : des cellules épithéliales, des cellules neuroendocrines, des cellules intermédiaires et des cellules basales (cellules souches de l'épithélium). Les cellules épithéliales sont sécrétoires, de forme cylindrique, et bordent la lumière des canaux excréteurs et des acinis. Elles sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium et sont riches en prostate specific antigen (PSA), en phosphatases acides prostatiques (PAP) et en cytokines. Elles fonctionnent en lien étroit avec le stroma, leur fonction et leur volume seront affectés par la castration. Les cellules neuroendocrines quant à elles, sont présentes au niveau de l'urothélium de l'urètre prostatique mais également au niveau du sommet de l'épithélium. Ces cellules n'expriment pas le PSA. Elles participent à la croissance et la différenciation de l'épithélium. Pour ce qui est des cellules intermédiaires, elles se situent entre les cellules souches basales de l'épithélium glandulaire et les cellules épithéliales matures de la couche supérieure. Leur croissance est indirectement sous la dépendance des androgènes. Pour finir, les cellules basales, peu nombreuses sont situées à proximité de la membrane basale de l'épithélium. Ces cellules servent de réserve pour régénérer l'épithélium prostatique. Celles-ci ne sécrètent peu ou pas de PSA et de PAP, et n'expriment peu ou pas les récepteurs aux androgènes (RA).

I.1.2.2. Stroma prostatique

Le stroma contient la matrice extracellulaire, des fibroblastes, des capillaires, des cellules endothéliales lymphatiques, des cellules musculaires lisses, des cellules neuroendocrines ou encore des axones. La matrice extracellulaire (MEC) permet la communication intercellulaire pour les voies paracrines et constitue un vecteur indispensable des facteurs de croissance. Les constituants de la MEC jouent un rôle dans l'adhésion, la prolifération, la différenciation, la croissance et la migration des cellules épithéliales par le biais des laminines [1].

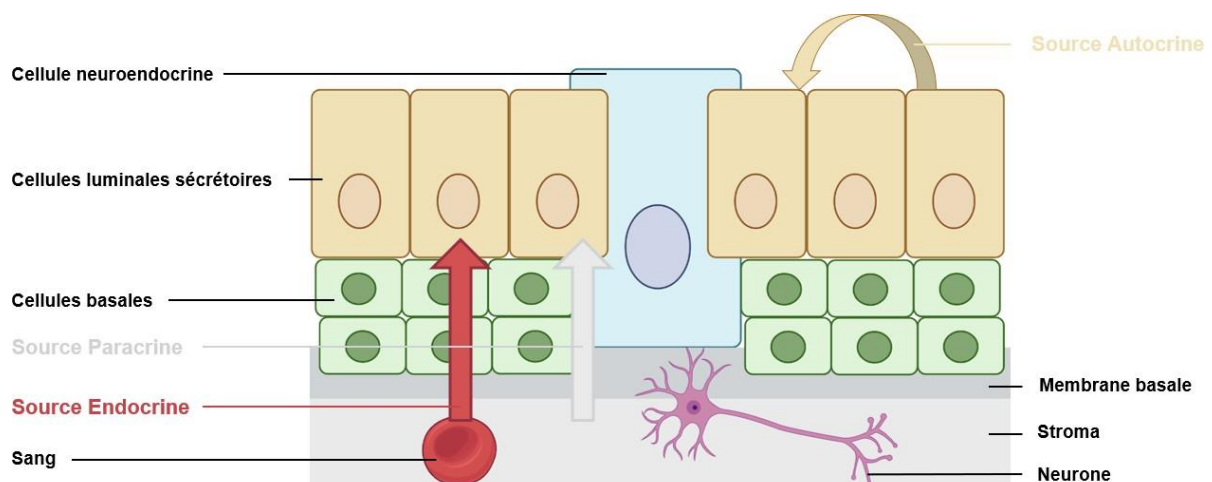


Figure 2 : Structures cellulaires de la prostate

Structure histologique de la prostate et régulations hormonales endocrine, paracrine et autocrine. L'épithélium prostatique est composé de cellules sécrétoires et de cellules neuroendocrines, bordé par des cellules basales, accolé à la membrane basale et soutenu par le stroma conjonctif. D'après Bok et al., 2022 [2] et Zerbib et al., 2012 [3].

I.1.3. Histologie de la prostate

L'analyse histopathologique de la prostate a révélée quatre régions distinctes qui se concentrent sur différentes zones des canaux éjaculatoires (Figure 3) [4]. Ces zones seront possiblement sujettes à plusieurs pathologies :

- La zone périphérique

Correspond à la majeure partie de la prostate, et à la partie la plus proche du rectum. Cette zone est palpable par le médecin lors du toucher rectal (TR), en cas d'anormalité une augmentation du score de Gleason est associée et devrait entraîner une biopsie prostatique. La majorité des carcinomes prostatiques (70%) ont lieu au sein de cette zone.

- La zone centrale

Plus petite que la précédente, située devant la zone transitionnelle et est la zone glandulaire la plus éloignée du rectum ; zone relativement peu sujette au cancer (10%), sensible aux infiltrations tumorales des zones adjacentes. De plus, les cancers survenant dans cette zone pourraient être plus agressifs.

- La zone transitionnelle

Correspond à moins de 5% de la glande prostatique normale mais peut s'agrandir en cas d'hyperplasie prostatique bénigne (HBP). Elle se situe entre les deux autres zones et entoure l'urètre. Est le site d'origine d'environ 25% des cancers de la prostate.

- La zone fibromusculaire

Est une zone non glandulaire qui se situe se situe antérieurement à toutes les zones précédentes.

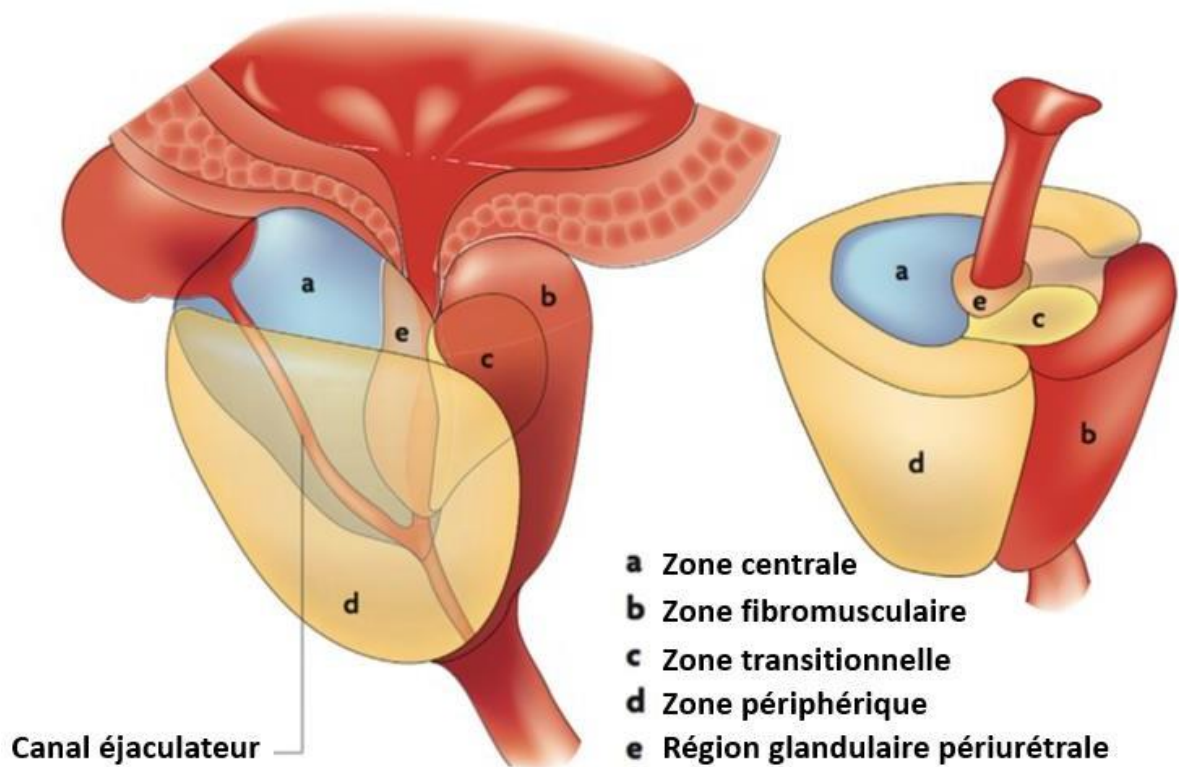


Figure 3 : Représentation des différentes zones de la prostate

La prostate est composée de 4 zones (de la périphérie vers le centre) : fibromusculaire, périphérique, transitionnelle et centrale. D'après De Marzo et al., 2007 [5].

I.1.4. Pathologies associées à la prostate

I.1.4.1. La prostatite

La prostatite est une douleur associée à une inflammation, un gonflement, ou les deux de la prostate. Il existe quatre types de prostatite :

- Le syndrome de la douleur chronique pelvienne

Correspond au type de prostatite le plus commun mais n'est pas causée par une infection bactérienne. Elle peut persister dans le temps de façon intermittente et les causes ne sont pas bien comprises.

- La prostatite bactérienne aiguë

Provenant d'une infection bactérienne due dans 80% des cas à une infection par *Escherichia Coli*. Cette infection peut être due à l'utilisation d'un cathéter, une infection urinaire ou une biopsie.

- La prostatite bactérienne chronique

Souvent due à une prolifération bactérienne ou non dont la durée excède les 3 mois.

- Prostatite non bactérienne ou asymptomatique

Absence de symptômes, diagnostiquée par hasard et dont les causes sont inconnues.

De nombreux symptômes tel que des douleurs dans le bas ventre, des troubles mictionnels ou encore de la fièvre peuvent être signe d'une prostatite. En cas de suspicion, un examen cytbactériologique urinaire (ECBU) est pratiqué ainsi qu'un antibiogramme avant la mise en route d'un traitement antibiotique. Les classes d'antibiotiques privilégiées sont les fluoroquinolones ou en cas de contre-indication une céphalosporine de troisième génération.

I.1.4.2. L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP)

L'hypertrophie bénigne de la prostate aussi appelée hyperplasie bénigne de la prostate ou adénome prostatique est le plus souvent lente et asymptomatique. Néanmoins environ 30% des hommes de plus de 65 ans se plaignent de symptômes du bas appareil urinaire liés à une HBP. Cette affection est fréquente chez l'homme vieillissant et apparaît aux alentours de 40 ans (20% des cas) pour atteindre plus de 50% chez les hommes de 70 ans. En France, l'HBP toucherait plus de 6 millions d'hommes de plus de 65 ans.

L'HBP forme des nodules au sein de la zone transitionnelle, cela entraîne une augmentation globale du volume de la prostate venant exercer une pression sur la vessie et l'urètre engendrant des troubles urinaires (Figure 4). Le traitement de référence sera les alpha-bloquants : ils permettront de relaxer les fibres musculaires lisses de la prostate et du col de la vessie afin d'améliorer le débit urinaire. En cas de prise en charge d'une HBP, un dosage de PSA est pratiqué, en effet l'HBP ne dégénère jamais en cancer de la prostate mais ils peuvent néanmoins coexister.

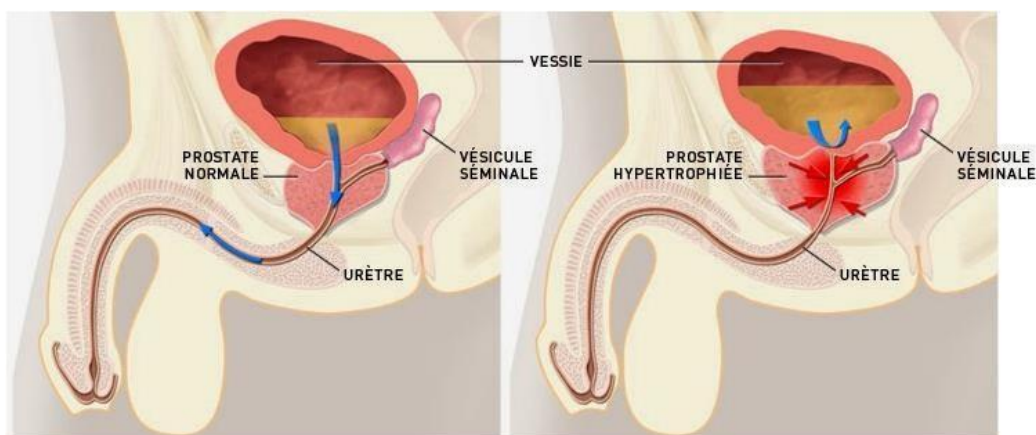


Figure 4 : Représentation d'une hypertrophie bénigne de la prostate (HBP)

Lorsque la prostate devient trop volumineuse avec l'âge, celle-ci gêne l'émission d'urine. Source : Récap'IDE illustration de Michel Rouleau

I.1.4.3. Le cancer

Le cancer de la prostate (CaP) correspond, comme tous les cancers, à une prolifération incontrôlée et anarchique de cellules épithéliales initialement normales jusqu'à former une masse correspondant à une tumeur maligne et est donc classé dans la catégorie des carcinomes. Il existe des types plus rares de cancer de la prostate : les sarcomes dérivés du mésenchyme et les lymphomes. La tumeur reste d'abord limitée à la prostate mais peut grossir et s'étendre au-delà pour envahir d'autres parties du corps et notamment les ganglions lymphatiques ou les os et plus tardivement le foie et les poumons. Le CaP est depuis plusieurs

années le plus répandu chez l'homme. Le risque de survenue augmentant avec l'âge et cette maladie étant à évolution lente, la mortalité reste modérée. Néanmoins tous les cancers n'ayant pas le même degré de gravité (80% sont découverts à un stade précoce), de nouvelles thérapies sont développées plus bénéfiques pour la qualité de vie du patient mais également en terme de performance

I.2. Le cancer de la prostate

I.2.1. Epidémiologie du cancer de la prostate

Au sein des pays industrialisés le CaP est le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes. En effet, dans le monde, le CaP est le deuxième cancer le plus répandu en terme d'incidence en 2020 (1 414 259 cas) derrière le cancer du poumon chez les hommes. En France, le nombre de cas estimé est de 66 070 en 2020 ce qui le place à la première position chez les hommes. Néanmoins, il se situe à la cinquième position des cancers les plus meurtriers dans le monde avec 375 304 décès en 2020 uniquement chez les hommes. Si l'on s'intéresse à la France, il correspond au troisième cancer le plus meurtrier avec 9 060 décès en 2020 (Figure 5). D'ici à 2040 le nombre de nouveaux cas estimés à travers le monde est de 2,43 millions.

Le dépistage tend à être généralisé de par le vieillissement de la population. Celui-ci peut être effectué par simple toucher rectal qui permettra de repérer une grosseur suspecte ou par dosage sanguin du PSA ayant un taux généralement élevé en cas de cancer mais étant sujet à controverse.

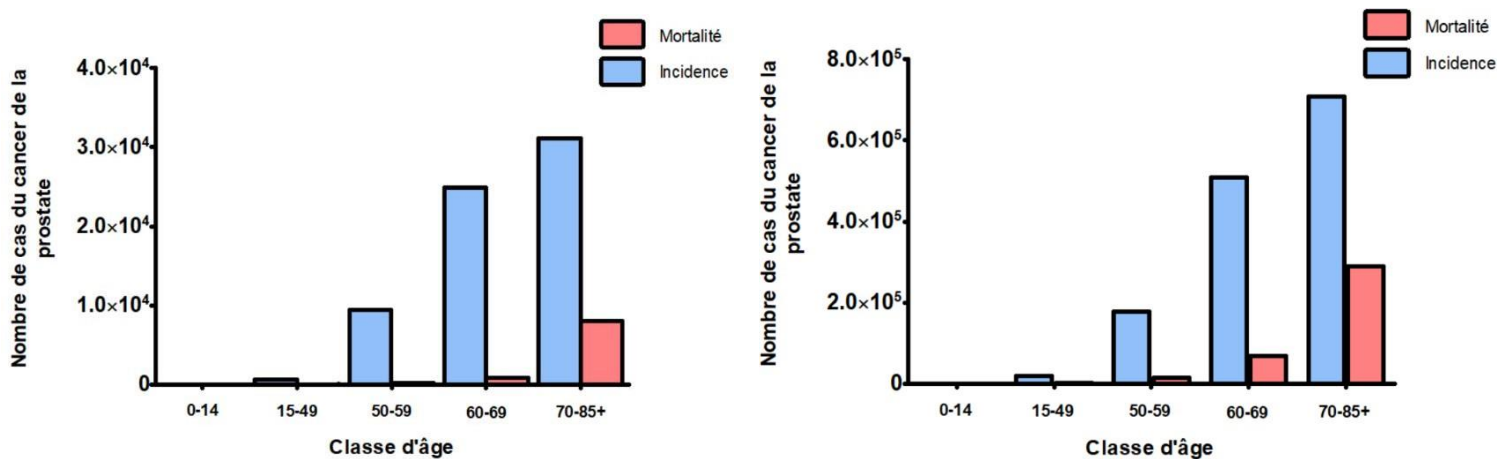


Figure 5 : Epidémiologie du cancer de la prostate

Nombre de nouveaux cas et de décès en 2020 en France métropolitaine (à gauche) ou dans le monde (à droite) par classe d'âge. D'après les données du Global Cancer Observatory [6].

D'après les données du Global Cancer Observatory, la survenue de ce cancer reste tardive. En effet, le nombre de cas avant 50 ans reste très faible (599 cas en France en 2020 entre 0 et 49 ans), et augmente avec l'âge avec 31 162 cas pour la classe des 70 ans et plus.

I.2.2. Anatomopathologie

La plupart des CaPs sont des adénocarcinomes (tumeurs malignes au niveau des cellules glandulaires qui tapissent la paroi d'un organe). Mais d'autres formes plus rares sont également décrites [7] :

- Le sarcome

Lors d'une atteinte des cellules musculaires lisses (léiomyosarcome) ou striés de la prostate (rhabdomyosarcome), il n'y aura pas de modification du taux de PSA mais tout de même des troubles urinaires. Ces formes de cancer sont détectées par biopsie, imagerie ou suite à une résection transurétrale de la prostate.

- Le carcinome neuroendocrine

Le cancer peut également se développer à partir des cellules neuroendocrines de la prostate, on rencontre dans ce cas des cancers dits « à petites cellules » ou d'autres, très rares et peu étudiés, à « grandes cellules ». Dans le cas du carcinome à petites cellules, il n'y a généralement pas de modification du taux de PSA. Ce type de cancer est détecté suite à une biopsie ou d'une résection transurétrale de la prostate. L'agressivité de ce cancer étant importante, il se propage rapidement vers d'autres régions du corps pour devenir métastatique.

- Le carcinome à cellules transitionnelles

Dans ce cas, le cancer peut prendre directement naissance dans la prostate mais il prend le plus souvent son origine de cellules cancéreuses présentes au niveau de l'appareil urinaire. Le diagnostic de ce cancer se fait la plupart du temps suite à une résection transurétrale de la prostate.

Certaines tumeurs dérivent du stroma prostatique (moins de 1% des CaPs) : les tumeurs stromales prostatiques de potentiel incertain (STUMP) dérivent du mésenchyme prostatique, les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (IMT) considérées comme des sarcomes à cellules fusiformes de bas grade, les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) où les cas au niveau de la prostate sont rares car il s'agit d'un envahissement de la prostate à partir de GIST provenant du rectum ou de l'espace péri-rectal et du péritoine.

I.2.2.1. Histologie du cancer de la prostate

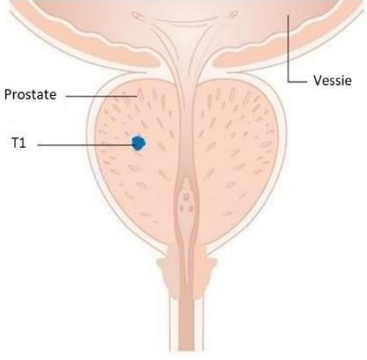
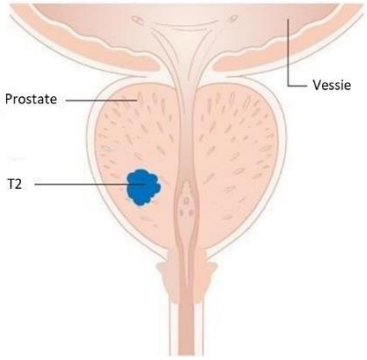
Des biopsies du CaP montrent une déficience en cellules basales. Les adénocarcinomes acineux provenant de la glande prostatique périphérique représentent environ 90 à 95% des CaPs. Le diagnostic histologique est établi en évaluant différents critères : la perte des cellules basales, de l'architecture glandulaire normale (dont la rupture de la membrane basale épithéliale-stromale) ainsi que l'atypie nucléaire des cellules luminales.

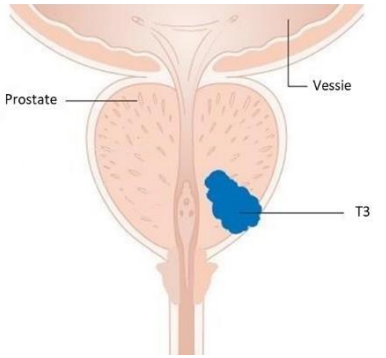
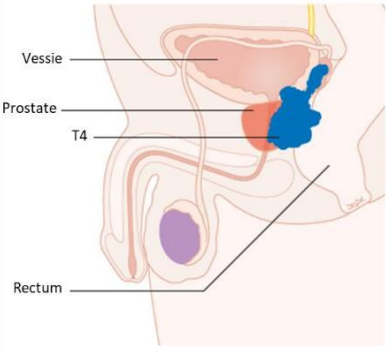
I.2.2.2. La classification TNM

Afin de donner des indications sur le pronostic de survie d'un patient, une classification des cancers en fonction de leur étendue anatomique a été mise en place. La classification « TNM » permet de décrire l'étendue anatomique du cancer et est basée sur l'évaluation de trois composantes : l'étendue de la tumeur (T), l'absence ou la présence de ganglions

lymphatiques régionaux ainsi que leur étendue (N) et enfin l'absence ou la présence de métastases à distance (M) [8], [9]. Cette classification ne s'applique qu'aux adénocarcinomes. La lettre T décrit la taille de la tumeur principale (primitive)(Tableau 1).

Tableau 1 : Lettre T de la classification TNM

T	Tumeur primitive (taille dans le plus grand diamètre)	
Tx	Tumeur primitive non évaluée	
T0	Tumeur primitive non retrouvée	
T1	<p>Tumeur non détectable par toucher ou par imagerie</p> <p>T1a : tumeur occupant moins de 5% du tissu réséqué (la découverte est réalisée au cours d'une ablation d'adénome)</p> <p>T1b : tumeur occupant plus de 5% du tissu réséqué</p> <p>T1c : tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation du taux de PSA</p>	 <p>Prostate</p> <p>Vessie</p> <p>T1</p>
T2	<p>Tumeur limitée à la prostate</p> <p>T2a : tumeur atteignant la moitié d'un lobe ou moins</p> <p>T2b : tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre en totalité les 2 lobes</p> <p>T2c : tumeur atteignant les 2 lobes</p>	 <p>Prostate</p> <p>Vessie</p> <p>T2</p>

<p>T3</p>	<p>Tumeur étendue au-delà de la capsule prostatique</p> <p>T3a : extension extra-capsulaire uni – ou bilatérale, incluant l’extension au col vésical</p> <p>T3b : extension aux vésicules séminales uni – ou bilatérale</p>	 <p>Diagram illustrating T3 prostate cancer: The tumor (blue) extends beyond the prostate capsule (Prostate) into the seminal vesicles (Vessie).</p>
<p>T4</p>	<p>Tumeur fixée ou atteignant d’autres structures que les vésicules séminales : vessie, sphincter, rectum, muscles releveurs de l’anus ou paroi pelvienne</p>	 <p>Diagram illustrating T4 prostate cancer: The tumor (blue) extends beyond the prostate capsule (Prostate) into the bladder (Vessie) and rectum (Rectum).</p>

La lettre N décrit la propagation du cancer aux ganglions lymphatiques entourant l’organe, et permet aussi de révéler le nombre de ganglions atteints ainsi que leur taille et leur emplacement (Tableau 2).

Tableau 2 : Lettre N de la classification TNM

<p>NX</p>	<p>Les ganglions lymphatiques régionaux ne peuvent pas être évalués</p>
<p>N0</p>	<p>Il n’y a pas de métastase des ganglions lymphatiques régionaux</p>
<p>N1</p>	<p>Présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques régionaux</p>
<p>pNmi</p>	<p>Présence de métastases ne dépassant pas 0.2 cm</p>

La lettre M quant à elle permet de décrire la propagation du cancer à d’autres parties du corps par le sang ou le système lymphatique (Tableau 3).

Mx	Pas d'évaluation du statut des métastases	
M0	Absence de métastases	
M1	Présence de métastases à distance, quelle qu'en soient la localisation ou la taille avec : <ul style="list-style-type: none"> • M1a : atteinte des ganglions non régionaux • M1b : atteinte osseuse • M1c : autres sites (foie, poumon...) 	

Tableau 3 : Lettre M de la classification TNM

Après combinaison des différents critères, un classement du cancer allant du stade 1 au stade 4 est réalisé (Tableau 4). Cette évaluation permet ainsi de prendre en compte simultanément le degré d'envahissement de la tumeur ainsi que la présence et la localisation de métastases.

Tableau 4 : Les différents stades de cancer de la prostate selon la classification TNM

Stade 1	T1, T2a, N0, M0	CaP localisé.
Stade 2	T2b, T2c, N0, M0	CaP localement avancé : la tumeur s'est étendue hors de la capsule prostatique mais sans atteinte des ganglions lymphatiques ni métastase à distance.
Stade 3	T3, T4, N0, M0	CaP avec atteinte ganglionnaire pelvienne : la tumeur a atteint les ganglions lymphatiques sans métastase dans des organes à distance.
Stade 4	tout T, tout N, M1	CaP métastatique.

I.2.2.3. Score de Gleason

L'examen de référence afin de diagnostiquer le CaP est une biopsie. Durant cet examen, une fine aiguille est introduite, sous anesthésie locale et sous protection antibiotique, dans la prostate par le rectum (transrectale) ou par le périnée (transpérinéale). Cette aiguille permet le prélèvement de plusieurs fragments de prostate à divers emplacements de la glande prostatique. Afin de connaître la nature des fragments récupérés, ceux-ci seront analysés afin de déceler, ou non, des lésions ou des cellules cancéreuses. En première intention, une biopsie transpérinéale sera effectuée permettant une diminution du risque d'infection tout en améliorant le taux de détection et le confort du patient. Ces différentes biopsies sont guidées par échographie grâce à la réalisation d'une fusion avec les images d'une IRM.

En fonction du stade de différenciation des cellules analysées, il sera possible de déterminer l'agressivité du cancer selon le score de Gleason. Celui-ci reste le plus puissant facteur pronostique du CaP à ce jour mais ne reflète néanmoins qu'une zone de la prostate et est soumis à controverse [10]. La classification ou grade de Gleason permettra de refléter le degré d'anomalie des tissus prélevés avec des grades allant de 1 à 5 [11] (Tableau 5) :

- Grade I : les cellules cancéreuses semblent normales et ressemblent aux cellules saines
- Grade II : les cellules cancéreuses sont peu serrées et de différentes formes

- Grade III : des irrégularités dans la taille et la forme des cellules cancéreuses apparaissent y compris dans la fusion cellulaire
- Grade IV : les cellules cancéreuses sont de grandes tailles anormales et fusionnées ensemble
- Grade V : les cellules cancéreuses sont de grandes tailles, de formes irrégulières et fusionnées entre elles. Elles commencent à envahir le tissu conjonctif environnant

Tableau 5 : La classification de Gleason

Grade	Forme et bords de la tumeur	Invasion stromale	Disposition des cellules tumorales	Taille de la glande
I	Formation de nodules, forme bien définie et bords lisses	Poussant à une invasion stromale	Les cellules sont de formes rondes à ovales, regroupées mais les glandes restent séparées	Moyenne
II	Masses moins bien définies et délimitées	Séparation des glandes au niveau des bords de la tumeur	Les cellules sont de formes rondes à ovales, les glandes restent séparées avec une variabilité dans leur taille et forme. Les cellules sont peu serrées avec une faible séparation stromale	Moyenne
IIIA	Bords mal définis	Extension irrégulière	Les cellules sont plus allongées, les glandes sont séparées de forme et de taille variables. Il existe généralement une large séparation stromale	Moyenne
IIIB	Bords mal définis	Extension irrégulière	Identique au IIIA mais les glandes sont plus petites	Petite voir très petite
IIIC	Masses avec des bords arrondis et lisses	Extension expansive	Epithélium percé de trous, sans nécrose	Moyenne à grosse
IVA	Infiltration de façon inégale	Invasion perméable de façon diffuse	Les glandes ont fusionné, créant des masses	Petite, moyenne ou grosse
IVB	Infiltration de façon inégale	Invasion perméable de façon diffuse	Similaire au IVA, les cellules ont un cytoplasme clair	Petite, moyenne ou grosse
VA	Bords lisses et arrondis	Extension expansive	Masses solides avec une nécrose centrale : comédocarcinome	Variable
VB	Infiltration de façon inégale	Invasion perméable de façon diffuse	Masses carcinomiques avec quelques petites glandes ou cellules en anneau	Petite

L'analyse des biopsies permet de déterminer le score de Gleason en fonction des grades évoqués ci-dessus. Le score de Gleason ira de 2 à 10 et correspond à la somme des deux grades les plus fréquemment retrouvés au sein des biopsies analysées (Tableau 6).

Tableau 6 : Lien entre le score de Gleason et le grade du cancer de la prostate

Groupe	Score de Gleason	Gleason Pattern
I	≤ 6	≤ 3 + 3
II	7	3 + 4
III	7	4 + 3
IV	8	4 + 4
V	9 – 10	4 + 5, 5 + 4, 5 + 5

I.2.2.4. AJCC : stadification multicritères (TNM, Score de Gleason et PSA)

Les facteurs anatomiques de la prostate ne sont pas les seuls à être pris en compte en matière de facteurs pronostiques du CaP. Le score de Gleason (indicateur du degré de différenciation cellulaire des tissus prélevés) ainsi que le PSA (marqueur sanguin protéique, dont l'augmentation indique la présence d'un cancer) peuvent également être intégrés. C'est ce qu'a réalisé l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en proposant une stadification qui combine TNM, score de Gleason et PSA (Tableau 7).

Tableau 7 : La stadification multicritères de l'American Joint Committee on cancer (AJCC)

Stade	Tumeur	Ganglions lymphatiques régionaux	Métastases à distance	Taux de PSA	Score Gleason
I	cT1, cT2a ou pT2	N0	M0	< 10	1
IIA	cT1, cT2a ou pT2	N0	M0	≥ 10 mais < 20	1
	cT2b ou cT2c	N0	M0	< 20	1
IIB	T1, T2	N0	M0	< 20	2
IIC	T1, T2	N0	M0	< 20	3 ou 4
IIIA	T1, T2	N0	M0	≥ 20	1 – 4
IIIB	T3, T4	N0	M0	Tout PSA	1 – 4
IIIC	Tout T	N0	M0	Tout PSA	5
IVA	Tout T	N1	M0	Tout PSA	Tout grade
IVB	Tout T	Tout N	M1	Tout PSA	Tout grade

I.2.3. Facteurs de risques

Actuellement, les causes du CaP ne sont pas connues. Néanmoins, certains facteurs de risque semblent le favoriser (Figure 6). Selon les antécédents familiaux, le CaP peut survenir sous trois formes

- La forme sporadique : non héréditaire, la plus répandue

- La forme familiale : lorsqu'il existe au moins deux cas de CaP chez des apparentés du premier degré (père, frère) ou du second degré (grand père, oncle). Elle représente 20% des CaPs.
- La forme héréditaire : définit par l'existence d'au moins 3 cas de CaP chez des apparentés du premier degré (père, frère) ou du second degré (grand père, oncle), ou de 2 membres de la famille diagnostiqués avant l'âge de 55 ans. Cette forme représente 5% des CaPs.

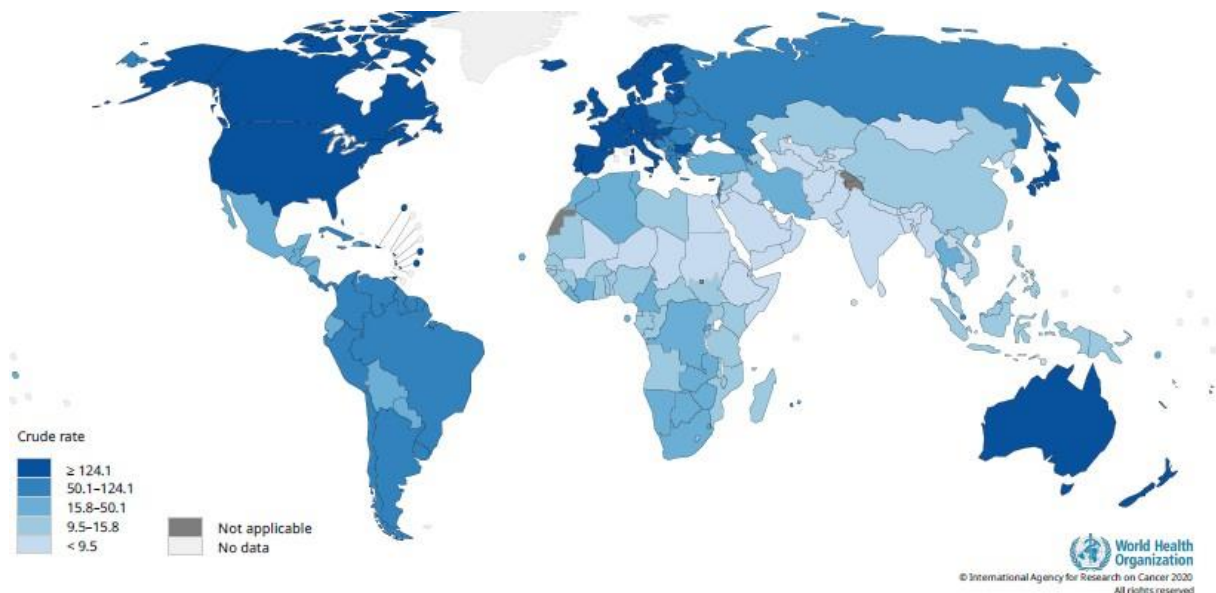


Figure 6 : Estimation des taux bruts d'incidence du cancer de la prostate en 2020.

Source : Globocan 2020 (données de l'Organisation Mondiale de la Santé)

I.2.3.1. L'âge

L'âge est un facteur de risque établi dans le cas du CaP. L'incidence du CaP augmente avec l'âge et reste donc rare en dessous de 40 ans. Le dépistage par dosage du PSA a entraîné un âge plus précoce de détection du CaP car il existe un délai d'environ 10 ans avant l'apparition des tous premiers symptômes [12].

I.2.3.2. Prédilection génétique

Une héritabilité subsiste au sein du CaP. En effet, les hommes ayant un proche parent ayant reçu un diagnostic de CaP ont un risque deux à quatre fois plus élevé de le développer. De récentes études ont également suggérées un risque accru de cancer de la prostate dans les familles présentant des cancers du sein [13], [14]. Une explication possible réside dans la mutation du gène BRCA. Les mutations héréditaires du gène BRCA pourraient fournir un mécanisme biologique pour le regroupement familial des cancers de la prostate et du sein.

I.2.3.3. Ethnie

Des variations ethniques et géographiques existent dans l'incidence du CaP. En effet, l'incidence, la gravité et les taux de mortalité sont plus élevés chez les hommes d'origine africaine noire. De nombreuses études (GWAS) ont été menées afin de déterminer des marqueurs (loci) du CaP, permettant la mise en évidence de plusieurs « gènes candidats ». Parmi les biomarqueurs identifiés à ce jour pouvant améliorer le dépistage du CaP: la fusion/translocation des gènes TMRSS2:ERG et l'expression de Ki-67. Les études GWAS mettent en évidence des loci au sein des populations américaines et européennes n'étant pas retrouvés au sein des populations africaines [15]. Il s'agit donc de trouver des loci pour ces populations ainsi que les afro-caribéens étant à risque de développer un CaP.

I.2.3.4. Obésité et syndrome métabolique

Une augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) ainsi que l'obésité entraînant un accroissement de l'adiposité ont été associées à de nombreux cancers dont le CaP [16]. Néanmoins les mécanismes sous-jacents reliant l'obésité comme facteur de risque du CaP restent flous. Les trois causes présumées reliant le risque de CaP et l'obésité sont : le facteur de croissance insulinaire (IGF-1), les hormones sexuelles et les adipokines.

I.2.3.5. Tabagisme et alcool

Le tabagisme a été associé à l'incidence et à la mortalité dans de nombreux cancers dont le CaP. Les ex-fumeurs ainsi que les gros fumeurs ont un risque de décès accrus de 24 à 30% [17]. Concernant la consommation d'alcool, il existe une relation dose-réponse significative entre la consommation d'alcool et le risque de CaP [18].

I.2.3.6. Activité physique, régime alimentaire et nutrition

Aucune preuve concrète ne permet de déterminer si une activité physique accrue pourrait réduire le risque de développer un CaP. Néanmoins, de nombreuses études ont montré qu'il existe une relation inverse entre l'activité physique et le risque de progression et de mortalité liée au CaP [19], [20]. Le régime alimentaire tend également à être la cause dans de nombreux cancers : la consommation d'aliments hautement transformés peut augmenter le risque de CaP [21], inversement lors de la consommation d'aliments non ou peu transformés. La consommation de lycopène (caroténoïde à pigmentation rouge que l'on retrouve dans les tomates et pastèques) permettrait une réduction du risque de CaP [22]. Il existe également potentiellement, une association positive entre l'apport alimentaire en produits laitiers (apport élevé en calcium) et le CaP [23].

I.2.3.7. Médicaments

Des essais cliniques sont actuellement en cours pour étudier l'utilisation de la metformine en thérapie ou en association avec une thérapie de privation androgénique afin d'améliorer la survie des patients atteints de CaP [24]. Une étude sur les statines a également démontré leur implication dans le retardement de la progression du CaP [25].

I.2.4. Diagnostic du cancer de la prostate

I.2.4.1. Toucher rectal

Outil diagnostique peu coûteux permettant d'évaluer le volume de la prostate et ainsi de vérifier la présence d'un cancer. Néanmoins, pour détecter un cancer par cette technique, il faut que la prostate ait un volume supérieur à 0,2 mL. Cependant, il existe un degré de variabilité élevé et un toucher rectal normal n'élimine pas le risque de CaP.

I.2.4.2. Biopsie

Actuellement, il existe trois manières de réaliser des biopsies ciblées de la prostate : directement dans l'IRM, à l'aide d'une fusion cognitive ou encore en utilisant un système de fusion d'images échographie-IRM (Figure 7). En cas de biopsies réalisées directement dans l'IRM, celles-ci sont réalisées par une approche transrectale ou transpérinéale. Les biopsies ciblées par fusion cognitive sont réalisées lors d'une procédure échoguidée par voie transrectale. L'utilisation de la fusion échographie-IRM permet de projeter l'image d'IRM sur l'image d'échographie. L'opérateur visualise ainsi à la fois l'aiguille de biopsie et la cible IRM, ce qui permet de s'assurer que le prélèvement qui sera analysé a bien été réalisé dans la zone cible. Le système de fusion d'images permet de superposer numériquement les images de deux modalités d'imagerie : l'IRM et l'échographie endorectale en temps réel [26].

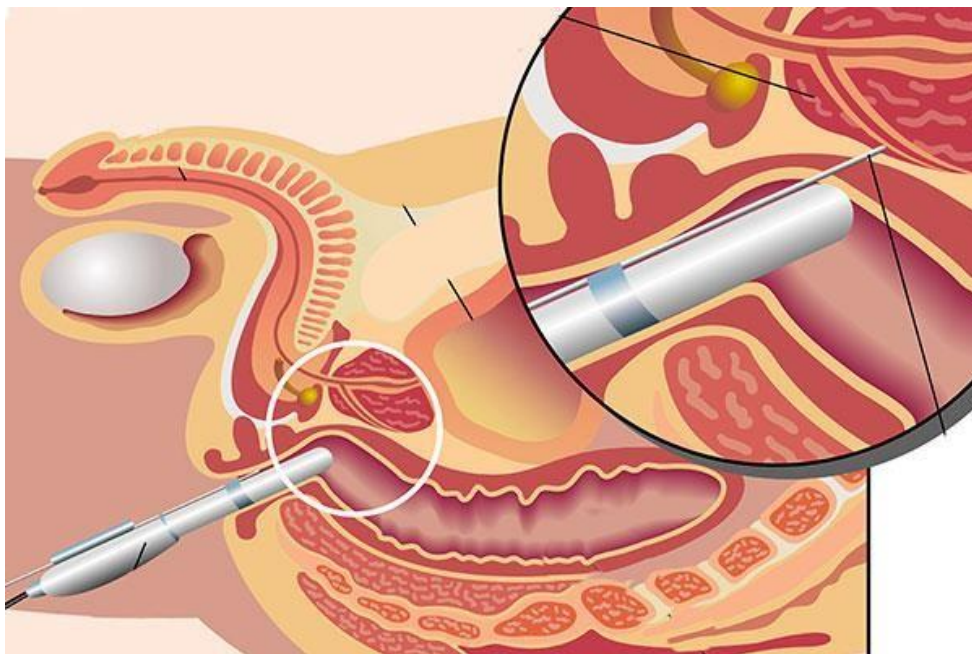


Figure 7 : Représentation d'une biopsie de la prostate

La biopsie permet de prélever une série de prélèvements au niveau de la prostate à l'aide d'une aiguille. Les fragments sont par la suite envoyés pour analyse au laboratoire. Source : Perth Urology Clinic

I.2.4.3. Le PSA (Prostate Specific Antigen)

Le PSA est une glycoprotéine faisant partie de la famille des kallikréines (protéines ayant un rôle important dans l'inflammation), aussi appelé kallikréine-3 qui a pour fonction de

liquéfier le sérum, favoriser la motilité des spermatozoïdes et dissoudre le mucus cervical. Le PSA est considéré comme un marqueur biologique de l'activité prostatique, une augmentation du taux peut être due à une prostatite, une hypertrophie bénigne de la prostate ou un CaP [27]. Le PSA sérique est retrouvé sous deux formes : le PSA libre ou le PSA complexé [28], [29].

- PSA libre (fPSA) : représente une faible proportion du PSA sérique total (de 10 à 30%). Il est composé de trois isoformes [30].
 - Une forme précurseur (proenzyme) appelée pPSA et associée au cancer.
 - La deuxième forme BPSA, est une forme de PSA clivée ou dégradée en interne et est fortement associée à l'HBP.
 - La troisième forme peut contenir un certain nombre de variantes mineures, mais est composée en majorité de PSA intact similaire au PSA actif natif.
- PSA complexé (cPSA) : forme prédominante du PSA sérique, est composée de trois fractions.
 - Forme majeure représentant 70% du PSA total : le PSA-ACT (complexé à l' α 1-antichymotrypsine). Il s'agit d'une fraction qui augmente dans le cas de cancer.
 - A2M complexé à l' α 2-macroglobuline, forme mineure.
 - IATI complexé à l'inter- α -trypsine inhibiteur.
 - Le PSA-PCI complexé à l'inhibiteur de la protéine C.

De nombreux moyens sont mis en œuvre afin d'améliorer le test PSA pour permettre au mieux de distinguer les affections cancéreuses des affections bénignes. D'autres biomarqueurs potentiels du CaP sont également à l'étude. Les différentes méthodes étudiées [31] :

- Le PSA libre par rapport au PSA total : aussi appelé proportion de PSA libre, une proportion plus faible de PSA libre pourrait être associée à un cancer plus agressif.
- La densité du PSA : taux sanguin de PSA divisé par le volume de la glande prostatique pourrait être plus précise pour détecter le CaP que le test PSA standard.
- Vitesse du PSA et temps de doublement : la vitesse correspond à la variation du taux de PSA d'un homme dans le temps exprimée en ng/mL par an. Le temps de doublement du PSA est la période nécessaire pour le doublement du taux de PSA. Ces mesures présentent un intérêt chez les hommes présentant une récurrence biochimique après une chirurgie ou une radiothérapie.
- Pro-PSA : fait référence à plusieurs précurseurs inactifs du PSA. Un test sanguin mesure la forme [-2]pro-PSA avec des mesures de PSA et de PSA libre dans une formule appelée Prostate Health Index. Le score en résultant permet d'aider à déterminer si l'homme doit subir ou non une biopsie.
- IsoPSA : le test IsoPSA mesure l'ensemble du spectre des isoformes de PSA plutôt que la concentration de PSA dans le sang. Permettrait d'identifier les hommes présentant un risque accru de développer un CaP de stade avancé.
- Test 4Kscore : prend en compte quatre biomarqueurs
 - Le PSA total
 - Le PSA libre
 - Le PSA intact

- La kallikréine humaine 2

Le test PSA prend également en compte : l'âge du patient, les antécédents de biopsie pour évaluer le risque de CaP agressif. Ce sont les cellules épithéliales de l'épithélium prostatique qui vont être à l'origine de la sécrétion de PSA. En temps normal, le PSA est sécrété dans le liquide des canaux glandulaires, au niveau de la lumière des cellules basales bordant les cellules sécrétrices. Il sera retrouvé à des concentrations d'un million de fois supérieures à celle du plasma. Dans le cas du CaP, l'architecture et la polarisation des cellules épithéliales sont perturbées, le PSA a ainsi un accès direct à la circulation sanguine. Ainsi, l'augmentation du taux sérique de PSA, potentiel biomarqueur du CaP peut être dosé par simple prise de sang. Un niveau limite à 4 µg/L est généralement considéré comme anormal, mais cela dépend tout de même de l'âge et de la taille de la prostate.

I.2.4.4. Biomarqueurs urinaires

- Le gène 3 du CaP (PCA3)

Correspond à un ARNm non codant spécifique de la prostate surexprimé dans le CaP et détectable dans les urines. Actuellement, le PCA3 pourrait être utile pour prédire la présence d'un CaP uniquement chez les patients ayant subi une biopsie bénigne antérieure.

- Protéase sérine transmembranaire 2 : ERG (TMPRSS2 : ERG)

La surexpression du gène ERG dans le CaP a été observée à la suite de la fusion avec le gène de la sérine protéase transmembranaire 2 (TMPRSS2).

L'utilisation de ces deux biomarqueurs en combinaison pourrait aider à réduire le nombre de biopsies inutiles.

I.3. L'Androgéno-dépendance

D'un point de vue physiologique, le CaP repose sur la voie de signalisation des androgènes telles que la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Ces hormones vont venir se fixer sur des récepteurs des androgènes (RA) au niveau des cellules épithéliales. On désigne un CaP comme hormono-sensible si sa croissance est stimulée par des androgènes. En revanche, certains cancers sont hormono-résistants (résistant à la castration) si un cancer évolue sous hormonothérapie ou réapparaît après une prostatectomie.

I.3.1. Structure et fonction du récepteur des androgènes

Le rôle de RA est bien caractérisé à la fois dans la prostate normale ainsi que dans le CaP à un stade initial ou à un stade de résistance à la castration. Dans la prostate normale, le récepteur régule l'expression de gènes essentiels au développement et à la fonction de la prostate. Dans le CaP, l'activité de RA est un mélange de son activité normale et de nouvelles activités acquises qui promeuvent la croissance d'autres facteurs de croissance. Les fonctions de contrôle androgéno-dépendant de l'expression de gènes sont portées par les quatre domaines fonctionnels de RA : le domaine N-terminal (NTD) contenant la fonction d'activation transcriptionnelle AF-1 ; le domaine de liaison à l'ADN (DBD) très conservé assurant la reconnaissance d'éléments de réponse aux androgènes (ARE) ; le domaine de liaison au ligand (LBD) contenant la fonction d'activation transcriptionnelle AF-2 ligand-dépendante et

enfin la région charnière (RC) entre le DBD et le LBD contenant le signal de localisation nucléaire (Figure 8) [32].

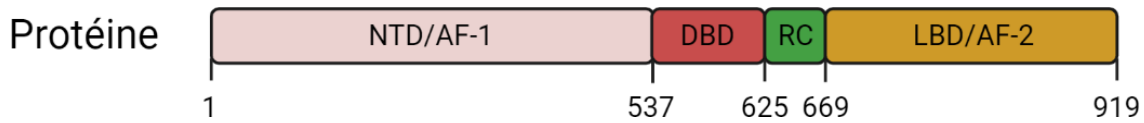


Figure 8 : Structure moléculaire de la protéine codant le récepteur des androgènes (RA)

Le gène est localisé au niveau du bras long du chromosome X et contient 8 exons. Les différents domaines de la protéine : NTD : domaine amino-terminal ; AF-1 : fonction de transactivation ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; RC : région charnière ; LBD : domaine de liaison du ligand ; AF-2 : fonction de transactivation 2. D'après Schreyer et al, [33].

La testostérone d'origine testiculaire ou celle issue de la conversion de précurseurs surrénaliens tels que la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione, sont converties en dihydrotestostérone (DHT) par la 5 α -réductase au niveau des tissus cibles. Pour exercer son action, la DHT se fixe au récepteur des androgènes.

En l'absence de ligand, la stabilité du récepteur dans le cytoplasme est assurée par un complexe de protéines chaperonnes incluant les protéines de réponses au choc thermique : les heat shock proteins (HSP) HSP40, HSP70 et HSP90. La liaison de la DHT à son récepteur aboutit à la dissociation de HSP90 et au recrutement de HSP27 qui favorise la translocation nucléaire du récepteur, puis sa fixation aux ARE présents au niveau du promoteur et des régions activatrices en amont des gènes cibles. Cette voie de signalisation correspond à la voie dite génomique, classique du récepteur (Figure 9). Une autre voie existe, la voie non génomique, dans laquelle le récepteur demeure dans le cytoplasme après stimulation androgénique et active d'autres voies de signalisation intracellulaires convergeant vers la voie ERK (extracellular signal-regulated kinase), puis en aval, à l'activation de facteurs de transcription.

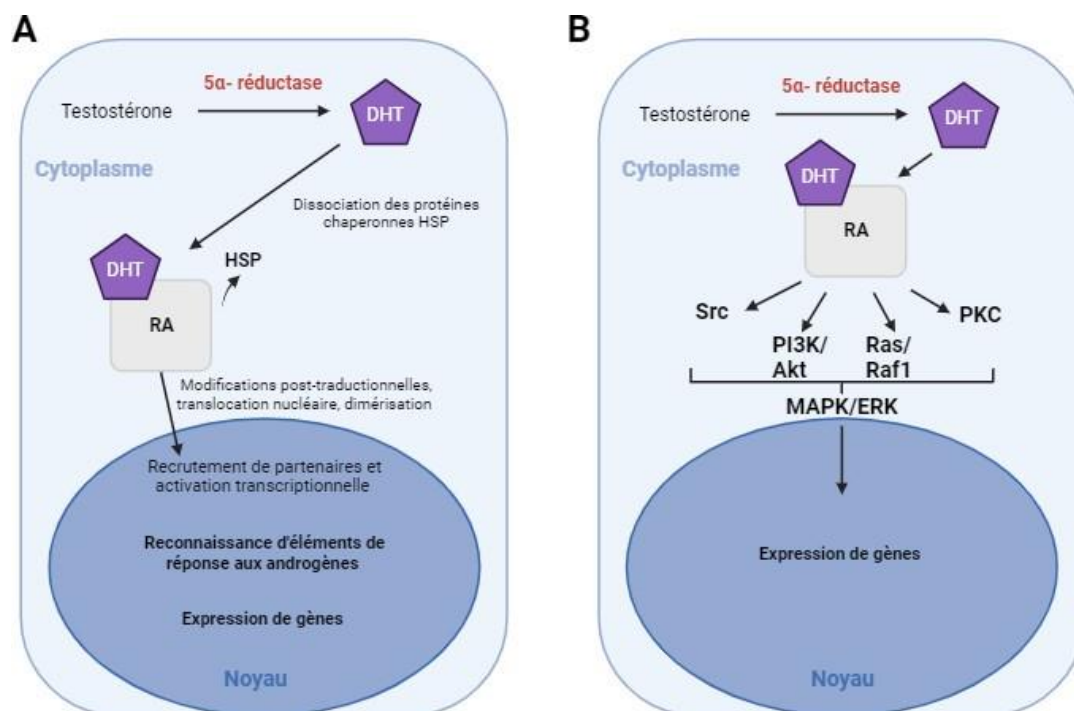


Figure 9 : Voie de signalisation génomique (A) et non génomique (B) du récepteur aux androgènes (RA)
 Dans le mode d'action non génomique, le RA une fois activé, active des cascades de signalisation entraînant l'activation de facteurs de transcription en aval. D'après Schreyer *et al*, 2017 [33].

I.3.2. La résistance à la castration

Il s'agit de la reprise évolutive biologique ou clinique du cancer malgré une castration efficace. De nombreux mécanismes peuvent conduire à la résistance à la castration tel que la substitution du récepteur par le récepteur des glucocorticoïdes, l'activation de voies mitogéniques ou encore la surexpression de la cycline D1. La surexpression de facteurs anti-apoptotiques est également associée à la résistance à la castration. Une sélection d'événements moléculaires à l'origine du maintien des activités du récepteur aux androgènes en dépit des faibles taux produits entraîne le phénomène de résistance. Il existe deux types de mécanismes, l'un dit ligand-dépendant et l'autre ligand-indépendant. Pour contourner la castration, les cellules cancéreuses peuvent augmenter la synthèse paracrine de DHT au sein du stroma tumoral à partir de la testostérone circulante, ou alors acquérir une hypersensibilité aux androgènes, par une surexpression du récepteur aux androgènes. Un autre mécanisme récurrent est l'émergence de formes mutées ou de variants d'épissage du récepteur aux androgènes.

I.3.3. Mutations ponctuelles du récepteur aux androgènes (RA)

Le gène du RA est localisé sur le chromosome et donc monoallélique chez les hommes. Bien que les mutations ou altérations génétiques touchent le RA dans le syndrome d'insensibilité aux androgènes (SIA), ce sont des mutations de type « gain de fonction » qui sont prépondérantes dans le CaP. Près de 45% des mutations ont lieu au niveau de la région

charnière et du LBD, ces mutations entraînent une modification de la poche de liaison du ligand [34]. Ces mutations vont étendre la spécificité de reconnaissance du RA à d'autres stéroïdes.

I.3.4. Mutations non-sens et variants d'épissage du RA

Dans le CaP résistant à la castration, les variants se caractérisent par l'absence de la région carboxy-terminale (Figure 10). La présence de ces variants tronqués au niveau de la région C-terminale peut également s'expliquer par des mutations non-sens au niveau de l'exon 4 du gène du récepteur. Ces mutations vont entraîner l'apparition de codons stop prématurés au niveau de la région charnière ou de la partie proximale du LBD. De plus, des épissages alternatifs des transcrits du récepteur produisent des formes tronquées du récepteur. Les variants possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) sur la protéine ont une activité androgéno-indépendante constitutive, ce n'est pas le cas de tous les variants d'épissage du RA délétés de leur partie C-terminale. Il semblerait donc qu'il y ait une augmentation de l'expression des variants d'épissage au cours du temps. De faible taux de variants du RA ont été détectés dans les formes localisées de CaP ou dans les tissus prostatiques non cancéreux.



Figure 10 : Variants actifs du récepteur des androgènes (RA)

Les variants peuvent provenir d'une mutation ponctuelle non-sens conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau de l'exon 4 (RA V7) ou d'un épissage aberrant des pré-ARNm (RA Q640X). Dans ce cas la protéine est tronquée et il y a apparition d'un codon stop prématuré. D'après Schreyer *et al*, 2017 [33].

I.4. Les traitements

Si le patient est atteint d'un CaP, différents traitements pourront être proposés en fonction du stade du cancer (via la classification TNM), du score de Gleason, du dosage du PSA, de l'âge ou encore des effets secondaires possibles [35].

Tableau 8 : Différentes options de traitements du cancer de la prostate et effets indésirables potentiels

Source : Sekhoacha *et al*, 2022 [35]

Traitement	Progression du cancer	Effets indésirables potentiels
Surveillance active	Localisée	Incertitude liée à la maladie
Prostatectomie radicale	Localisée	Dysfonctionnement érectile Incontinence urinaire
Radiothérapie externe	Maladie localisée et avancée	Urgence et fréquence urinaires, dysurie, diarrhée et proctite

		Dysfonctionnement érectile Incontinence urinaire
Curiethérapie	Localisée	Urgence et fréquence urinaires, dysurie, diarrhée et proctite Dysfonctionnement érectile Incontinence urinaire
Cryothérapie	Localisée	Dysfonctionnement érectile Incontinence urinaire et rétention Douleur rectale, fistule
Hormonothérapie	Avancée	Fatigue Bouffées de chaleur Hyperlipidémie Résistance à l'insuline Maladie cardiovasculaire Anémie Ostéoporose Dysfonctionnement érectile Déficits cognitifs
Chimiothérapie	Avancée	Myélosuppression Réaction d'hypersensibilité Troubles gastro-intestinaux Neuropathie périphérique

I.4.1. La surveillance active

Si la tumeur est localisée et ne provoque pas de symptômes, une stratégie de surveillance active peut être proposée au patient. L'objectif de cette surveillance est de retarder la mise en place d'un traitement et les effets indésirables l'accompagnant. Les contrôles ont lieu tous les trois à six mois, avec toucher rectal et dosage de PSA. Une IRM est également répétée au bout d'un an et de nouvelles biopsies de confirmation sont réalisées 18 mois après la première. Si une évolution est bien détectée, alors un traitement ayant pour objectif de traiter le cancer sera programmé.

Les nombreux avantages de la surveillance active sont : la préservation de la fonction érectile, la réduction du coût de traitement, d'éviter un traitement inutile de cancer inactif et surtout de maintenir la qualité de vie et les activités normales du patient.

I.4.2. La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale aussi appelée prostatectomie totale est une intervention chirurgicale consistant à retirer complètement la prostate ainsi que les vésicules séminales dans le cas de tumeurs localisées à faible risque. Dans certains cas, les ganglions lymphatiques voisins peuvent également être enlevés, on parlera alors de curage ganglionnaire. La continuité entre la vessie et l'urètre est rétablie afin d'assurer l'écoulement des urines par voies urinaires (Figure 11).

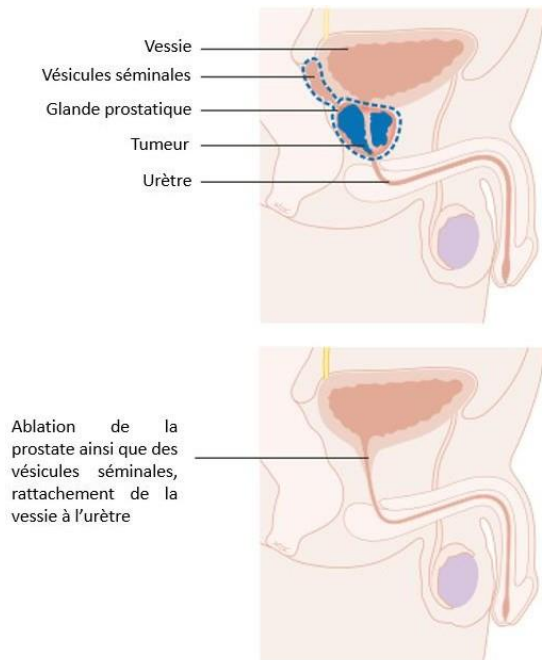


Figure 11 : Schéma anatomique avant et après prostatectomie

Source : Cancer research UK

Toutefois, de nombreux effets secondaires tels que des problèmes urinaires ou des troubles de l'érection peuvent être fréquents après l'intervention. Bien que la majorité des patients sont continents dans un délai de 3 à 6 mois, une faible incontinence se rencontre dans 5 à 10% des cas et une incontinence urinaire d'effort de degré variable sera assez fréquente avec 20 à 25% des cas. Des problèmes sexuels peuvent également être rencontrés tel que l'absence d'émission de sperme (anéjaculation), une éjaculation rétrograde (émission de sperme dans la vessie et non vers l'extérieur). Des troubles érectiles restent très fréquents touchant 60 à 90% des cas selon l'âge. L'insuffisance érectile peut atteindre 30% des patients de moins de 60 ans et 70% de ceux de plus de 70 ans. D'autres problèmes peuvent également survenir comme une diminution de la verge observée chez 80% des patients. La sensibilité au niveau du pénis sera également réduite chez 60% des patients.

I.4.3. La radiothérapie externe

La radiothérapie externe est une technique couramment utilisée dans le traitement du CaP. Elle consiste à émettre de puissants faisceaux de rayons X permettant de tuer spécifiquement les cellules cancéreuses de la prostate. Cela permet ainsi d'administrer des doses plus élevées de rayonnement avec moins d'émission dans les tissus environnants. En fonction du stade du CaP et d'autres facteurs, la radiothérapie peut être utilisée :

- Comme premier traitement pour les cancers de faible grade.
- Dans le cadre d'un premier traitement avec l'hormonothérapie pour les cancers qui se sont développés en dehors de la prostate dans les tissus avoisinants.
- En cas de récurrence

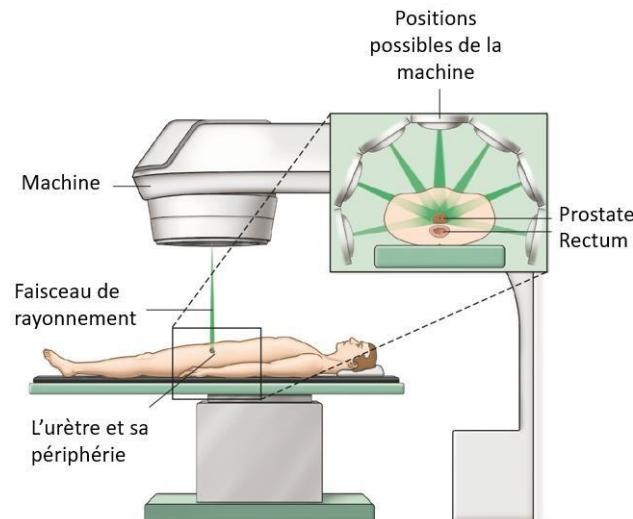


Figure 12 : La radiothérapie externe et le cancer de la prostate.

Source : European Association of Urology (EAU).

Si le cancer est à un stade avancé pour aider à contrôler le cancer le plus longtemps possible et pour soulager les symptômes.

I.4.4. La curiethérapie

Lors de la curiethérapie, des sources radioactives (iridium ou césium) sont directement placées dans la prostate à l'aide d'injections ou de fils sous guidage échographique transrectal (Transrectal ultrasound scan ou TRUS). De ce fait, la source libère spontanément au cours du temps des rayons qui vont détruire les cellules cancéreuses. Son objectif est donc d'optimiser la destruction des cellules cancéreuses en préservant les organes voisins. Il existe deux types de curiethérapie :

- La curiethérapie permanente (à faible débit de dose) : dans cette approche, les grains restent en place lorsque les aiguilles sont retirées et émettent de faibles doses de rayonnement pendant des semaines ou des mois.
- La curiethérapie temporaire (à haut débit de dose) : technique moins souvent utilisée. Elle laisse en place des doses plus élevées de rayonnement pendant une courte période.

I.4.5. L'hormonothérapie

Aussi appelée thérapie de suppression androgénique. L'objectif est de réduire les niveaux des androgènes ou de les empêcher d'alimenter la croissance des cellules cancéreuses. En effet, les androgènes stimulent la croissance des cellules cancéreuses de la prostate. Les principaux androgènes présents dans l'organisme sont : la testostérone et la DHT. En réduisant les niveaux d'androgènes, les CaPs régressent souvent ou se développent plus lentement pendant un certain temps. L'hormonothérapie seule ne guérit pas le CaP. L'hormonothérapie peut être utilisée dans plusieurs cas :

- Si le cancer s'est trop propagé pour être guéri par chirurgie ou radiothérapie, ou si le patient ne peut recevoir ces traitements pour une autre raison

- Si le cancer persiste ou réapparaît après un traitement chirurgical ou une radiothérapie
- En l'associant à une radiothérapie comme traitement initial, si le patient présente un risque élevé de récurrence du cancer (score de Gleason élevé, taux de PSA élevé et/ou croissance du cancer à l'extérieur de la prostate)
- Avant la radiothérapie, pour essayer de réduire la taille du cancer afin de rendre le traitement plus efficace

Il existe plusieurs types d'hormonothérapie pouvant être utilisés dans le traitement du CaP. Lors de la thérapie de privation androgénique (ADT), la chirurgie ou des médicaments sont utilisés afin de réduire les niveaux d'androgènes produits par les testicules.

I.4.5.1. Orchidectomie (castration chirurgicale)

Bien qu'il s'agisse d'une intervention chirurgicale, l'effet principal sert la thérapie hormonale. Lors de cette intervention, le chirurgien procède à l'ablation des testicules où sont fabriqués les androgènes. Cette opération étant évidemment irréversible elle n'est que peu utilisée en routine.

I.4.5.2. Les agonistes de la LH-RH

Ce traitement consiste en une sorte de castration chimique : des agonistes de l'hormone de libération de la lutéostimuline (LHRH), aussi appelée analogues de la LHRH ou agonistes de la GnRH sont injectés ou placés sous forme de petits implants sous la peau. Ils permettent ainsi de réduire la quantité de testostérone produite par les testicules. Lors de la première administration, les taux de testostérone peuvent augmenter brièvement avant de retomber à des niveaux très bas, ce phénomène est appelé poussée tumorale.

I.4.5.3. Les antagonistes de la LH-RH

Lorsque le CaP est à un stade avancé, les antagonistes de la LHRH peuvent être utilisés. Ces médicaments réduisent les niveaux de testostérone plus rapidement et n'entraînent pas de poussée tumorale contrairement aux agonistes de la LHRH. Les médicaments administrés pourront l'être sous forme d'injection mensuelle ou de comprimés à prendre tous les jours.

Bien que les traitements cités précédemment empêchent la production d'androgènes au niveau des testicules, des cellules d'autres parties du corps telles que les glandes surrénales, les cellules cancéreuses de la prostate elles-mêmes peuvent produire des hormones. Il existe donc d'autres médicaments pouvant bloquer la formation d'androgènes produits par ces cellules.

I.4.5.3.1. L'Abiratérone

Bloque l'enzyme CYP17 qui aide à empêcher ces cellules de produire des androgènes. Celle-ci sera utilisée chez les hommes atteints d'un CaP avancé à haut risque (score de Gleason élevé ou propagation à d'autres organes), ou résistant à la castration [36].

I.4.5.3.2. Le Kétoconazole

Utilisé en première intention pour traiter les infections fongiques, il bloque également la production d'androgènes fabriqués dans les glandes surrénales. Pour se faire, un mécanisme d'action probable du kétoconazole consiste à bloquer la conversion du lanostérol en cholestérol en inhibant le cytochrome P450 17 (CYP17). Cela aura pour effet d'inhiber par la suite la production de testostérone surrénalienne. Il est utilisé pour traiter les hommes venant d'être diagnostiqués avec un CaP avancé [37].

D'autres médicaments appelés anti-androgènes se fixent sur RA empêchant ainsi les androgènes de provoquer la croissance de la tumeur. La plupart du temps, ce traitement n'est pas pris seul mais en complément d'un agoniste ou antagoniste de la LHRH. De nouveaux anti-androgènes ont ainsi été créés tels que l'enzalutamide utilisé en cas de CaP métastatique qu'il soit résistant ou sensible à la castration ; ou encore l'apalutamide utilisé dans le traitement du CaP métastatique sensible à la castration.

I.4.6. La chimiothérapie

En cas de cancer à un stade métastatique avancé résistant à l'hormonothérapie, la chimiothérapie est pratiquée. La chimiothérapie n'est pas un traitement standard du CaP au stade précoce. La chimiothérapie est administrée par perfusion (traitement systémique). Celle-ci sera administrée par cycles d'une durée de 2 à 3 semaines à raison d'une perfusion par semaine. Chaque période de traitement sera suivie d'une période de repos afin de permettre au patient de se rétablir. La durée du traitement du cancer dépend de l'efficacité du traitement ainsi que des effets secondaires.

Lors d'une chimiothérapie du CaP, les médicaments chimiothérapeutiques sont généralement utilisés un par un. Dans la plupart des cas, le premier médicament administré est le docétaxel associé à un stéroïde [38]. En cas d'échec (ou d'arrêt), le cabazitaxel est souvent le médicament suivant, bien qu'il existe d'autres options.

I.4.7. L'immunothérapie

L'immunothérapie est une approche thérapeutique visant à restaurer/renforcer le système immunitaire dans le but de détruire les cellules cancéreuses. Cette technique agit principalement via les lymphocytes T (cellules immunitaires spécialisées dans la destruction des cellules cancéreuses).

I.4.8. La thérapie focale

Le concept de thérapie focale est connu depuis 1955, lorsqu'une série de prostatectomies partielles avait été présentée par le Dr R.Womack lors du congrès annuel de la Trans Southeast Section of the American Urological Association (AUA). Cette ablation partielle est une technique permettant de réaliser l'ablation d'une région cancéreuse connue de la prostate.

I.4.8.1. Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (HIFU)

L'HIFU est principalement indiquée pour des patients de moins de 70 ans avec un dosage du PSA <15 ng/mL. Il s'agit d'une thérapie focale basée sur la chaleur. Lors d'un traitement de type HIFU, une sonde à ultrasons est insérée dans le rectum, puis des ondes

sonores sont dirigées vers les parties cancéreuses de la prostate (Figure 13). L'énergie mécanique des ultrasons est transformée en chaleur atteignant 80 à 100°C. De plus, l'effet de cavitation (interaction ultrasons et microbulles d'eau présentes dans le tissu cible) avec vibration des tissus entraînent la mort des cellules.

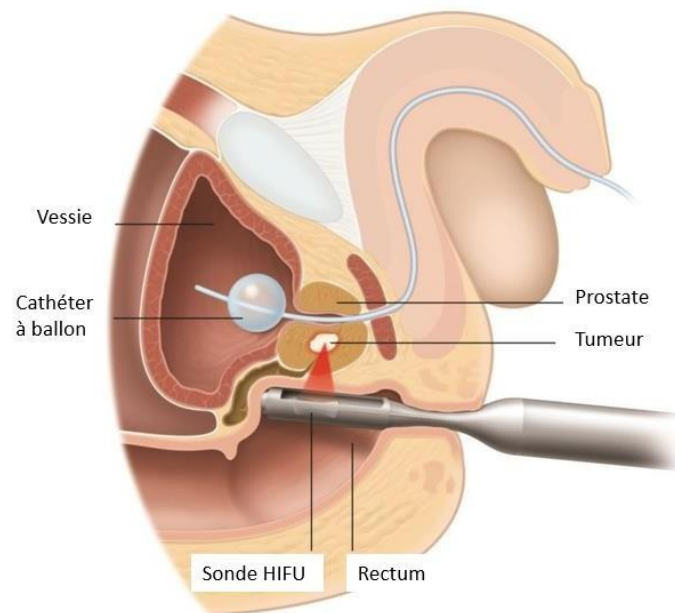


Figure 13 : Schéma traitement HIFU et cancer de la prostate

La sonde placée dans le rectum émet un faisceau d'ultrasons. En répétant les émissions ou en déplaçant le point focal entre chaque émission, cela permet de détruire un volume qui inclut la totalité de la glande prostatique. Source : European Association of Urology (EAU).

Il s'agit de la seule technique de thérapie focale du CaP n'utilisant pas la voie transpérinéale. La procédure dure 1 à 2 heures sous anesthésie régionale ou générale. Les résultats d'une étude multicentrique dans le domaine de l'HIFU réalisée en 2018 ont montré une efficacité de 96% chez les patients de bas risque, 88% chez des patients atteints de risque intermédiaire et 84% chez les patients atteints de haut risque. Concernant les effets secondaires, 80% des patients traités n'avaient aucune fuite urinaire [39].

I.4.8.2. La cryothérapie

Aussi appelée cryochirurgie ou cryoablation, peut être préconisée si le cancer est réapparu après une radiothérapie ou pour traiter le cancer à un stade précoce et à faible risque. Celle-ci sera réalisée sous anesthésie épidurale (partie inférieure du corps insensibilisée) ou générale. Le principe de la cryothérapie repose sur l'utilisation de sondes (aiguilles) insérées entre l'anus et le scrotum jusqu'à la prostate (Figure 14). Deux cycles de congélation (argon) de dix minutes chacun entrecoupés de cycles de réchauffement (hélium) sont réalisés sous contrôle échographique. La procédure se déroule sur deux heures et demie environ. L'objectif est d'atteindre une température de -40°C au niveau de la zone cible pour garantir la destruction du cancer et supérieur à 0°C dans les zones environnantes [40].

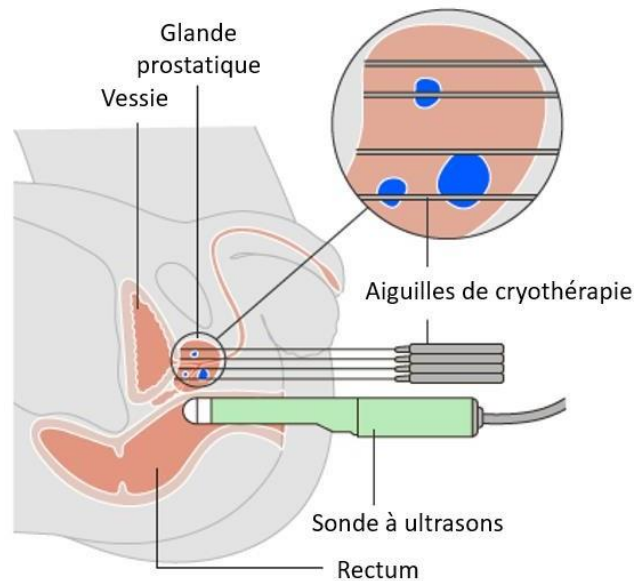


Figure 14 : Schéma cryothérapie et cancer de la prostate

Source : Cancer research UK

I.4.8.3. La radiofréquence interstitielle (RITA)

L'acronyme RITA correspond à Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation et utilise des générateurs d'ondes radiofréquences délivrées dans les tissus par des aiguilles munies d'électrodes. Les générateurs de radiofréquence utilisés permettent l'obtention d'ondes qui peuvent atteindre 50W pour 460kHz de fréquence. Les électrodes, au nombre de trois, ont un angle de séparation de 120° et permettent la nécrose thermique irréversible des tissus par conversion d'énergie (100°C). L'absence de complication sous guidage échographique a été rapportée pour des patients porteurs d'adénocarcinomes prostatiques localisés [41].

Bien que les traitements vus précédemment se soient montrés efficaces sur tumeurs solides, ils présentent l'inconvénient de reposer sur l'utilisation d'énergie thermique pour entraîner la mort cellulaire. Il y a donc risque de destruction des cellules saines avoisinantes qui entraîne de nombreux effets indésirables.

I.4.8.4. L'électroporation irréversible (IRE)

L'énergie thermique ayant de nombreux effets indésirables, l'électroporation irréversible (IRE) se présente comme une technique peu invasive sans utiliser d'énergie thermique. L'IRE est une des thérapies focales de la prostate les plus récentes, la plupart des patients traités sont à bas risque ou à risque intermédiaire. Trois ou quatre électrodes sous forme d'aiguilles sont insérées à travers le périnée sous contrôle échographique. Afin de créer une ablation par électroporation, la distance entre 2 aiguilles doit varier entre 1 à 2 cm. Le champ électrique est fourni par un générateur qui va calculer le voltage nécessaire pour chaque électrode. Grâce à cette technique, un total de 90 impulsions électriques de 70 microsecondes sont délivrées à la prostate. Des résultats préliminaires montrent des biopsies négatives à 1 an de 80% et un taux de PSA réduit de 75% par rapport à sa valeur initiale [42].

I.4.8.5. La thérapie laser

Dans ce contexte, l'apparition de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses ayant pour objectif de diminuer les effets secondaires des traitements conventionnels ont fait leur apparition. Ces stratégies reposent sur l'utilisation de la lumière, on parle ainsi de thérapie laser. Différentes techniques ont ainsi été mises en place [43] :

La thérapie laser interstitielle (LITT) consiste en la destruction thermique de tissus et repose sur des radiations laser électromagnétiques. La LITT permet de traiter des tumeurs profondes en délivrant l'énergie directement sur la zone à traiter tout en minimisant les effets sur les tissus sains avoisinants.

La thérapie photothermique (PTT) utilise des nanoparticules absorbant le proche infrarouge pour générer de la chaleur à partir de l'énergie optique afin de tuer les cellules cancéreuses. La plupart des agents conducteurs photothermiques est basée sur diverses nanostructures d'or (Au).

Partie II. L'apoptose

Mise en évidence dans les années 1970 par John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Currie, c'est la première fois qu'une mort cellulaire autre que la nécrose est décrite [44]. Ils décrivent ainsi deux étapes distinctes lors de l'apoptose : lors de la première, une condensation nucléaire et cytoplasmique a lieu formant des fragments liés à la membrane. Lors de la deuxième étape, les corps apoptotiques formés sont éliminés de la surface des cellules épithéliales et pris en charge par d'autres cellules pour subir le processus d'élimination. D'abord nommée nécrose contractée, elle sera finalement appelée mort cellulaire programmée ou apoptose.

Lors de la nécrose, un gonflement cellulaire a lieu jusqu'à la rupture des membranes (cytoplasmiques ainsi que celles des organelles). Elle est considérée comme une mort cellulaire accidentelle, aléatoire ayant lieu lors d'un dommage tissulaire. La rupture de la membrane plasmique entraîne un déversement du contenu cellulaire au niveau des tissus aboutissant à une réaction inflammatoire.

L'apoptose quant à elle est une mort cellulaire dite programmée. En effet, celle-ci permet l'élimination de cellules ayant été endommagées, considérées comme dangereuses ou encore en excès. Lors de l'apoptose, la cellule va progressivement s'arrondir et réduire en taille. Concernant l'ADN, la chromatine va se condenser et finira par se fragmenter. De nombreux corps apoptotiques remplis de débris cellulaires vont ensuite bourgeonner de la membrane plasmique. Il est important de noter que contrairement à la nécrose, l'apoptose n'induit pas d'inflammation puisqu'il n'y a pas rupture de la membrane plasmique. L'apoptose est donc un processus de mort cellulaire hautement régulée à l'inverse de la nécrose (Figure 15).

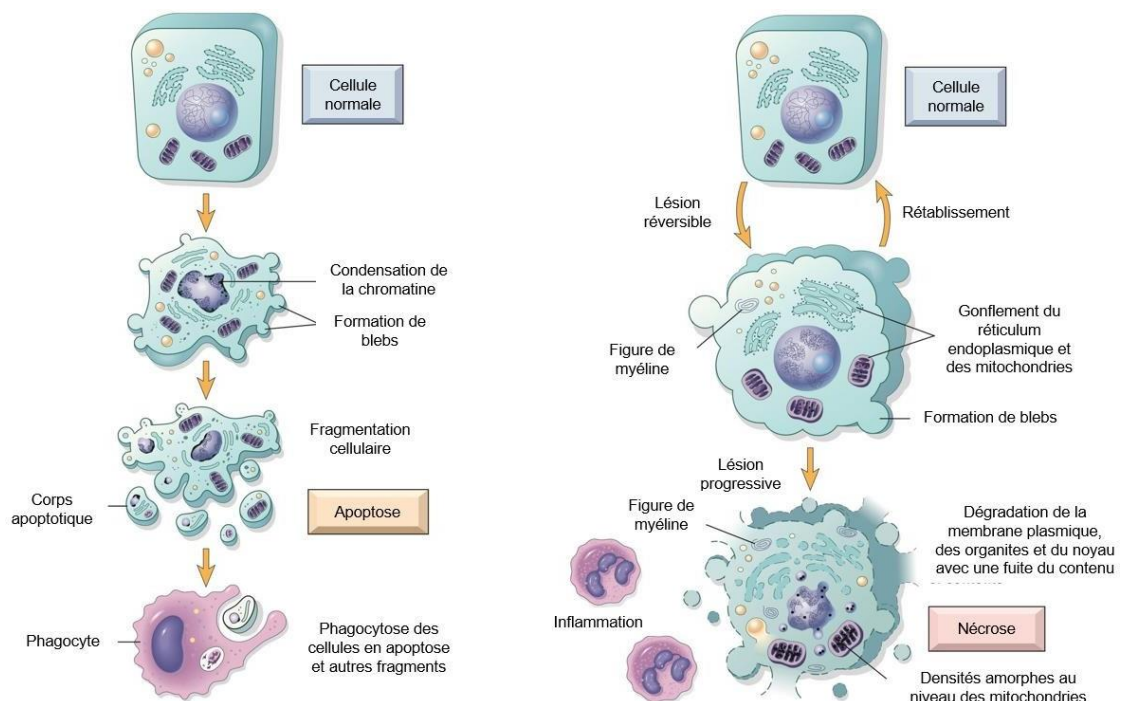


Figure 15 : Comparaison du phénomène d'apoptose et de nécrose.

L'une des différences notables est que, lors de l'apoptose, les blebs formés vont être phagocytés, alors que lors de la nécrose, le contenu de la cellule va fuir aboutissant à une réaction inflammatoire.

D'après Kumar *et al*, 2015 [45]

II.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose

Tout au long de la vie d'un organisme, l'apoptose joue un rôle car elle est nécessaire pour le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire à l'âge adulte. Au cours de l'embryogenèse, l'apoptose intervient et permet la destruction des structures initialement mises en place et notamment lors de la différenciation sexuelle. En effet, lorsque l'embryon est génétiquement masculin, l'hormone anti-müllérienne (AMH) est sécrétée par les cellules de Sertoli (au niveau des testicules). Cela induit la dégénérescence des canaux de Müller par apoptose. Dans le même temps, la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig permet le maintien des canaux de Wolff. A l'inverse, lorsque l'embryon est génétiquement féminin, l'AMH et la testostérone ne sont pas sécrétées de par l'absence de testicule ce qui permettra la persistance des canaux de Müller et la régression des canaux de Wolff [46].

L'apoptose joue également un rôle lors de la morphogenèse des doigts où elle entraîne la mort des cellules de l'espace interdigital au début de l'embryogenèse. S'il y a un défaut d'activité de l'apoptose, cela conduira à une absence de différenciation des doigts (Figure 16). L'apoptose intervient également dans le développement du système immunitaire où les lymphocytes B et T auto-immuns seront éliminés. Comme dit précédemment, l'apoptose intervient pour maintenir l'homéostasie tissulaire, notamment au niveau des tissus à fort renouvellement tel que la peau, après une réaction immunitaire afin d'éliminer les lymphocytes T en excès ou pour éliminer les cellules vieillissantes.

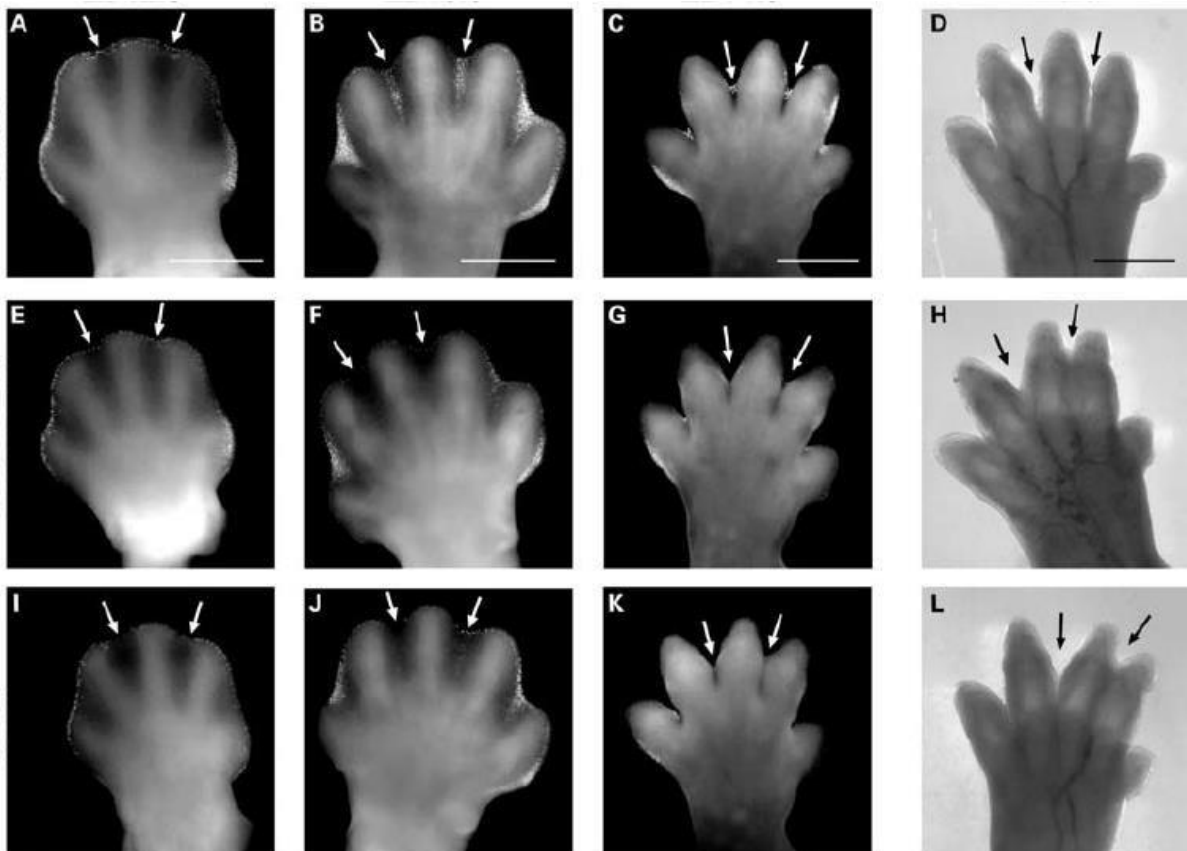


Figure 16 : Activité apoptotique défectueuse lors de la différenciation des membres chez la souris.

Source : Dobrowolski *et al*, 2009 [47].

Il paraît clair que l'apoptose joue un rôle central dans l'homéostasie tissulaire chez l'homme adulte et cela explique pourquoi son dérèglement pourra entraîner des nombreuses pathologies notamment le développement de cancers [48].

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

La mort cellulaire programmée provient de l'activation d'un processus d'interactions moléculaires en réponse à des stimuli. L'apoptose se déroule selon 2 voies principales d'induction en fonction de la nature du signal qu'il soit intra- ou extracellulaire : la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (voie intrinsèque). Qu'importe la voie empruntée, l'apoptose est divisée classiquement en 3 étapes distinctes :

- Une phase d'initiation ou d'induction : réversible, où le signal est transmis à des caspases initiatrices par des molécules adaptatrices
- Une phase d'exécution : non réversible, où les caspases exécutrices permettent l'exécution du processus apoptotique
- Une phase de dégradation de la cellule

II.2.1. Les acteurs majeurs de l'apoptose : les caspases

II.2.1.1. Structure des caspases

Les caspases, qu'elles soient initiatrices ou exécutrices font partie de la famille des « CysteinyI Aspartate-Specific Proteases » aussi appelée cystéine-protéases car elles possèdent toutes un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Elles existent initialement sous la forme de procaspases, des précurseurs dépourvus d'activité enzymatique ou zymogène. Une fois activées, elles deviennent des enzymes actives capables de cliver de nombreux substrats grâce à leur site catalytique.

La famille des caspases comprend plusieurs membres majoritairement exprimées dans l'ensemble de l'organisme à l'exception de la caspase 14 exprimée exclusivement au niveau des kératinocytes [49], [50]. Le génome humain code douze caspases (caspase 1 à 10, la caspase 12 et la 14) qui peuvent être classées en 3 grands groupes. Les caspases initiatrices de l'apoptose 2, 8, 9 et 10 et les caspases exécutrices de l'apoptose 3, 6 et 7 constituent les deux premiers groupes. Le dernier groupe est constitué des caspases impliquées dans le processus inflammatoire avec les caspases 1, 4, 5 et 12. La caspase 14 n'étant ni impliquée au cours de l'apoptose ni dans l'inflammation celle-ci se retrouve à part. Néanmoins l'ensemble des caspases présente une homologie structurale [51], [52] (Figure 17) :

- Un pro-domaine N-terminal de longueur variable. Toutes les caspases initiatrices ont en commun un long pro-domaine avec des motifs d'interaction protéine-protéine « death effector domain » (DED) et « caspase activation recruitment domain » (CARD).
- Une grande sous-unité de 20 kDa nommée p20 possédant le site catalytique
- Une petite sous-unité en C-terminal de 10 kDa nommée p10 présente au niveau de toutes les caspases

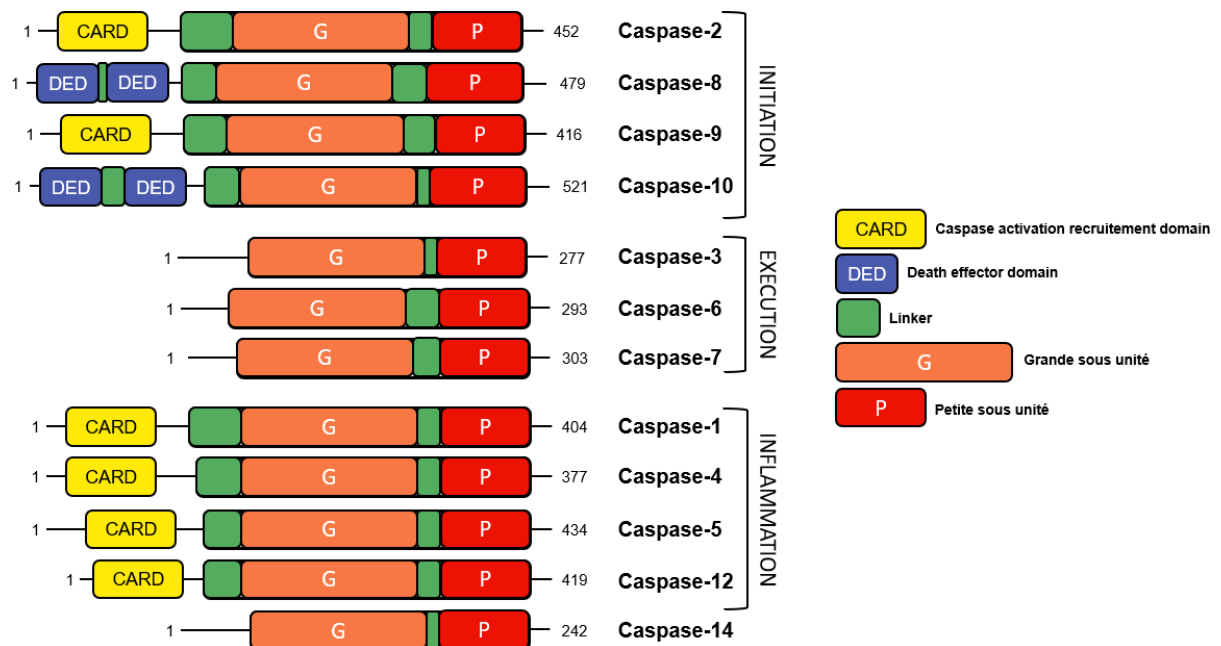


Figure 17 : Structure des domaines et classification fonctionnelle des caspases chez l'homme. Adapté de Shalini *et al*, 2015 et Hellwig *et al*, 2011 [51], [52].

II.2.1.2. L'activation des caspases

II.2.1.2.1. L'activation des caspases initiatrices

Les caspases initiatrices sont des monomères inertes ayant un mécanisme d'activation plus contesté. Le modèle le plus connu est le modèle de proximité induite [53], [54], selon lequel les caspases ont besoin d'une dimérisation pour être activées et que cette dimérisation est l'évènement fondamental d'activation. Les caspases initiatrices vont être recrutées par des molécules adaptatrices sur des plateformes d'activation oligomérique à la suite d'un signal apoptotique. Ce modèle pose comme postulat que l'augmentation locale de la concentration en caspases initiatrices entraîne une dimérisation induite par la proximité et donc une activation (Figure 18) [55]. Il est également probable que ce concept s'applique à l'activation des caspases pro-inflammatoires.

II.2.1.2.2. L'activation des caspases effectrices

Les caspases sont des zymogènes inactifs attendant d'être activées par des signaux appropriés. Le mécanisme d'activation des caspases effectrices est incontesté. Contrairement aux caspases initiatrices, celles-ci sont dépourvues de longs pro-domaines et existent sous forme de dimères inactifs dans les cellules. Elles vont dépendre du clivage protéolytique des caspases initiatrices en amont pour leur activation. Comme dans la structure des caspases initiatrices, il existe un linker entre les petites et grandes sous-unités. Il va donc y avoir un clivage du linker permettant ainsi l'assemblage du site catalytique par réarrangement des boucles mobiles (Figure 18).

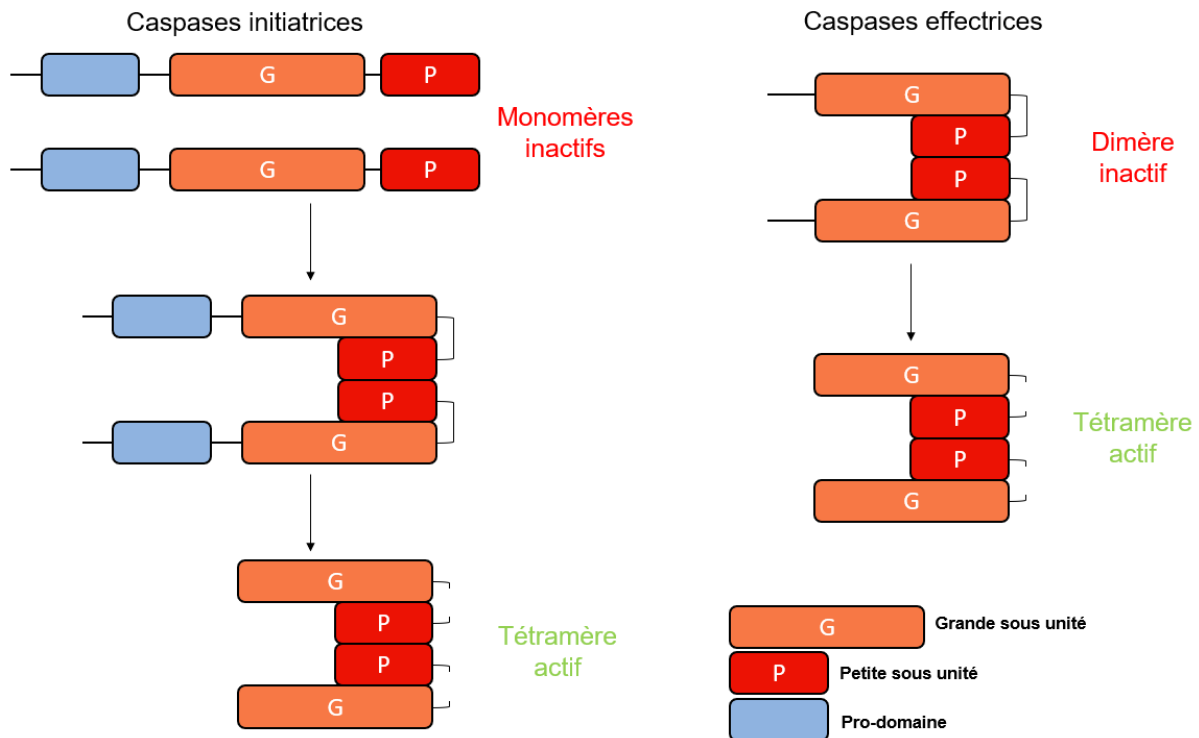


Figure 18 : Mécanismes d'activation des caspases initiatrices et effectrices.

Les caspases initiatrices ayant un long pro-domaine existent sous forme de monomères inactifs. L'activation par une dimérisation induite par la proximité a alors lieu. Les caspases effectrices quant à elles sont activées par clivage entre les petites et grandes sous-unités. D'après Puccini et Kumar, 2016 [56].

II.2.1.3. L'action des caspases

Les caspases initiatrices ont comme substrat les caspases effectrices, ayant elles-mêmes de nombreux substrats [57], [58] entraînant la mort de la cellule :

- Des caspases elles-mêmes ou des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose
- Des protéines médiatrices et régulatrices impliquées dans la transduction du signal apoptotique
- Des protéines permettant le maintien de l'intégrité des filaments intermédiaires tel que les laminines A/C et B induisant respectivement une rupture de l'enveloppe nucléaire et un désassemblage de la lamina nucléaire. Ou encore les kinases Stk4 et Mst1

constitutivement actives et induisant la surexpression du fragment amino-terminal qui entraînent une morphologie apoptotique.

- Des protéines en charge de la transcription ou de la réparation de l'ADN comme la poly(ADP-ribose)-polymérase (PARP) impliquée dans le maintien de l'intégrité génomique. Une fois clivée, la PARP ne peut plus exercer son activité de réparation sur les dommages causés à l'ADN.
- Des protéines régulatrices du cycle cellulaire empêchant les voies de survie cellulaire tel qu'Akt dont le clivage entraîne une inactivation des inhibiteurs du cycle cellulaire et à terme une perte de la signalisation de survie.

II.2.2. La voie intrinsèque ou voie mitochondriale

Dans cette voie, la mitochondrie est l'organe central du phénomène d'apoptose. Cette voie intrinsèque est activée en réponse à différents stimuli (exposition à des radiations, altérations de l'ADN, déprivation de facteur de croissance...) induisant un stress au niveau de la cellule. Ces signaux de stress déclenchent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) à la suite de l'activation de certains membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2. À la suite de cela, la MOMP permet la libération de plusieurs facteurs pro-apoptotiques notamment le cytochrome c (cyt c). Celui-ci passe de l'espace intermembranaire mitochondrial au cytoplasme où il favorise la mort cellulaire. Ainsi, il va y avoir interaction entre le cyt c et le facteur d'activation de la protéase apoptotique (Apaf-1). L'interaction entre ces deux facteurs stimule l'oligomérisation d'Apaf-1 en un complexe d'activation de la caspase appelé apoptosome (Figure 19).

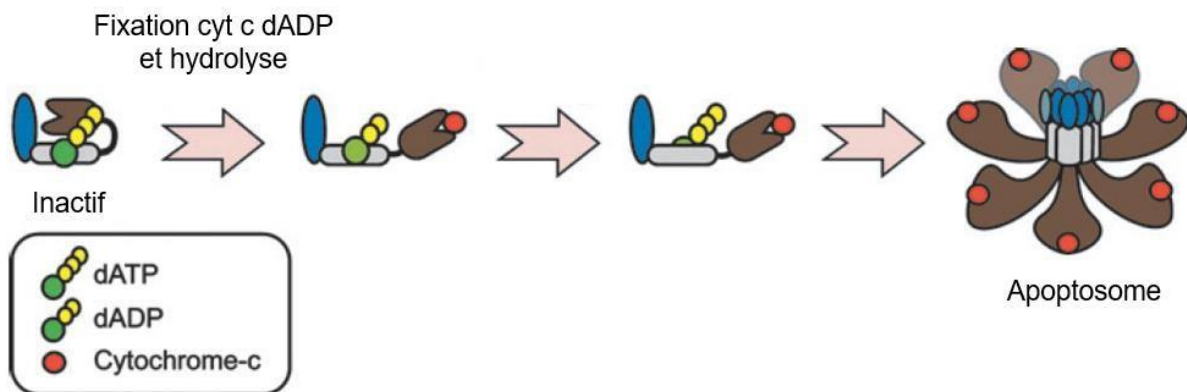


Figure 19 : Représentation de l'assemblage de l'apoptosome.

Apaf-1 est présent initialement sous une forme inactive dans le cytoplasme lié avec le dATP. Lors de la fixation du cyt c, le dATP est hydrolysé en dADP. Apaf-1 subit alors une oligomérisation pour former l'apoptosome. D'après Wu *et al*, [59].

Une fois formé, l'apoptosome recrute la pro-caspase-9. Ce recrutement se fait par l'intermédiaire de la CARD. Celle-ci se situe au niveau N-terminal de Apaf-1 et de la pro-caspase-9. Une fois activée, la caspase-9 agit sur la caspase 3 et induit la mort cellulaire (Figure 20 et 21) [60].

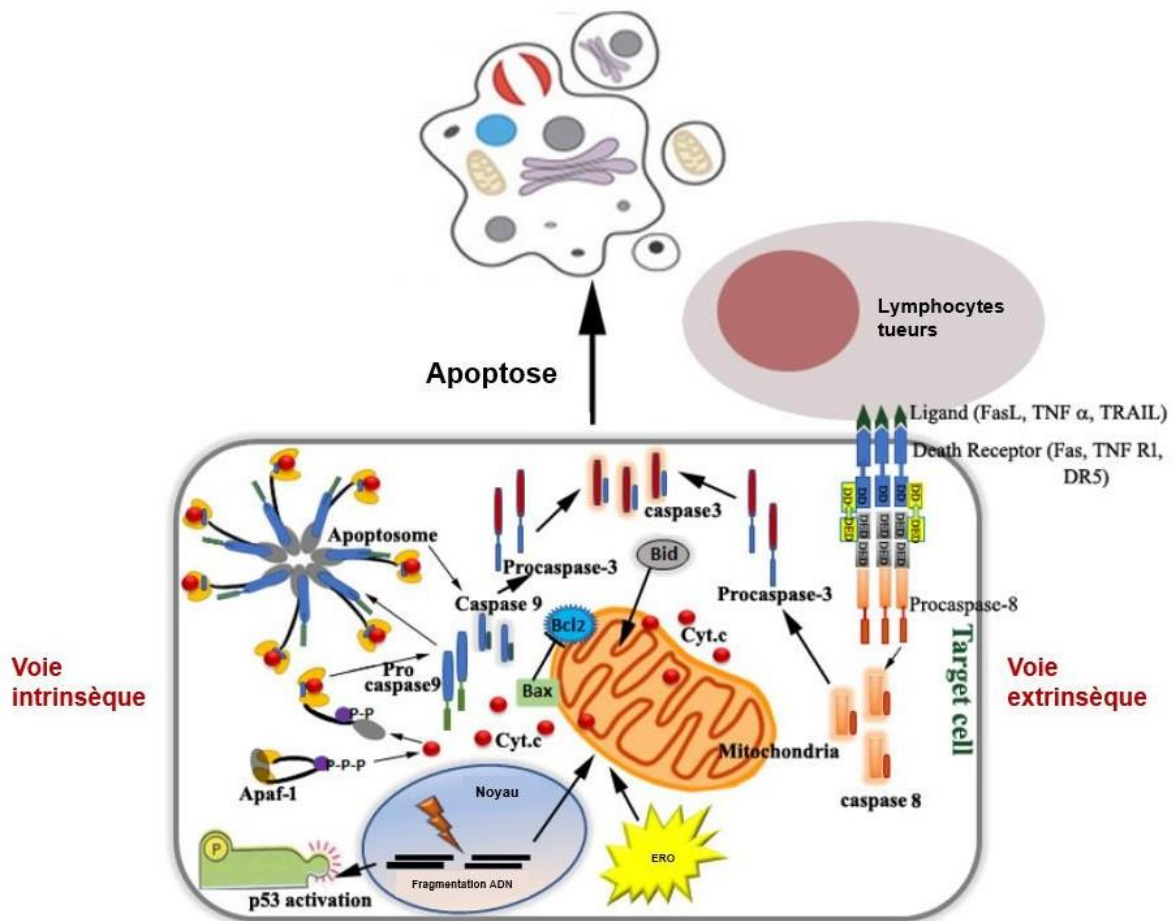


Figure 20 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.
Source : Bhadra, 2022 [61].

Il existe une deuxième voie intrinsèque aussi appelée voie indépendante des caspases au cours de laquelle il y aura libération d'autres facteurs pro-apoptotiques suite à la perméabilisation mitochondriale. Le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) et l'endonucléase G vont être libérées dans le cytosol et seront ensuite capables de se transloquer au niveau du noyau. Ils pourront ainsi induire une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN indépendamment des caspases [62], [63].

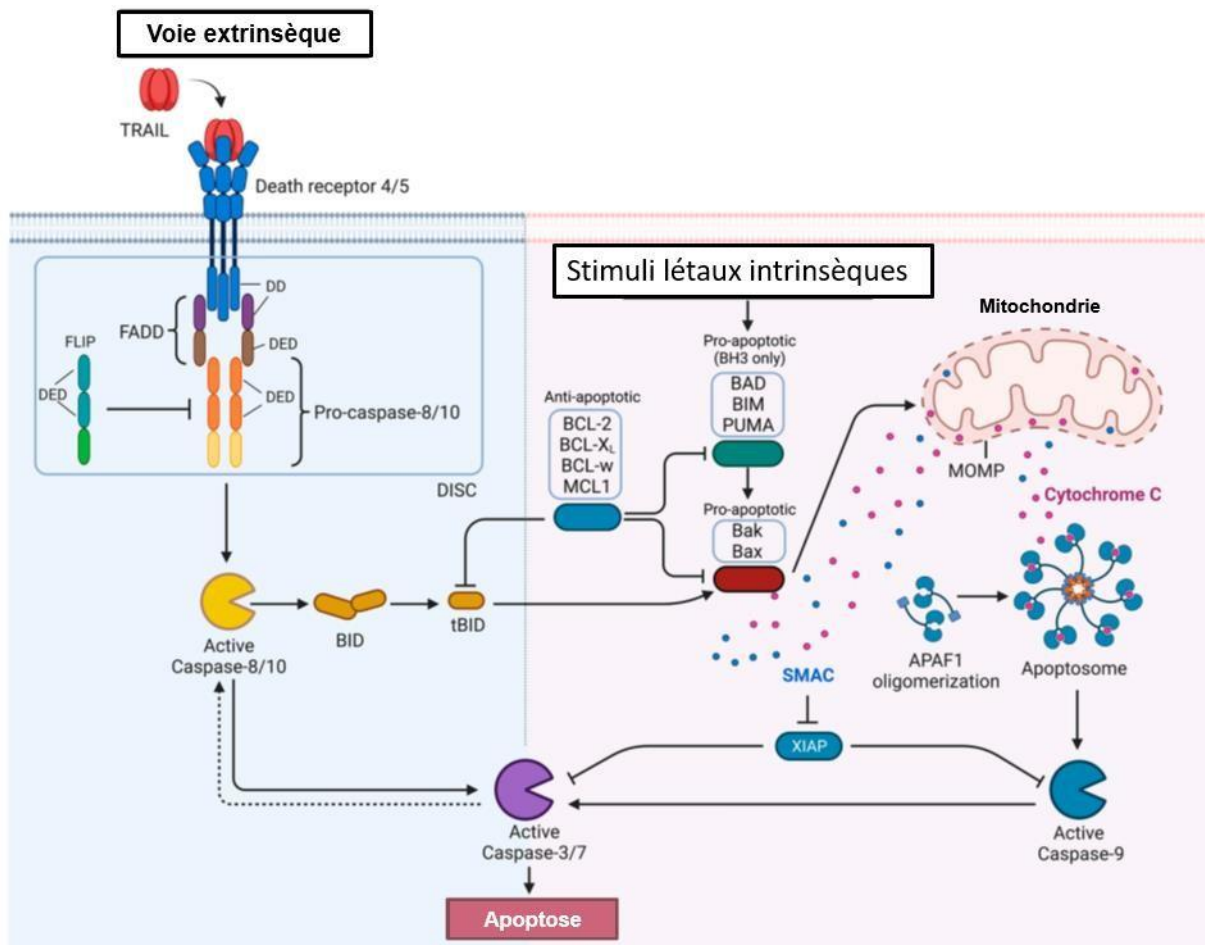


Figure 21 : Interaction des deux voies entre elles.

L'activation de DR4 et DR5 par TRAIL induit la voie extrinsèque de l'apoptose (à gauche). A l'inverse à droite la voie intrinsèque est activée par divers stimuli et entraîne la libération de protéines pro-apoptotiques par les mitochondries. Les deux voies vont interagir entre elles par la caspase-8 activée pouvant cliver la protéine BID. Cela induit alors l'activation de la voie intrinsèque. Inversement la caspase-3 peut cliver (et donc activer) la caspase-8 via une boucle de rétroaction (ici en pointillée), amplifiant ainsi le signal apoptotique.

2.2.3 La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

Dans cette voie, l'activation de l'apoptose se fait suite à la fixation de ligands sur des récepteurs de surface aussi appelés récepteurs de mort appartenant à la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF). Cette famille inclut de nombreux récepteurs tel que le récepteur Fas, les récepteurs au TNF et les récepteurs au TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) [64]. L'activation d'un récepteur de mort se fait suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur grâce à une trimérisation. L'activation du récepteur conduit au recrutement de protéines adaptatrices appelées Fas Associated Death Domain (FADD) ou TNF Receptor Associated Death Domain (TRADD). Ces protéines adaptatrices ainsi que les caspases initiatrices 8 et 10 possèdent un Death Effector Domain (DED) qui permettra ainsi leur interaction au niveau des récepteurs de mort. Le complexe ainsi formé est appelé Death Inducing Signaling Complex (DISC) [65]. Grâce à la formation du DISC, une augmentation

locale de la concentration en caspases à lieu et permet le rapprochement des caspases initiatrices capables ainsi de s'activer par auto-clivage (Figure 21 et 22) [66].

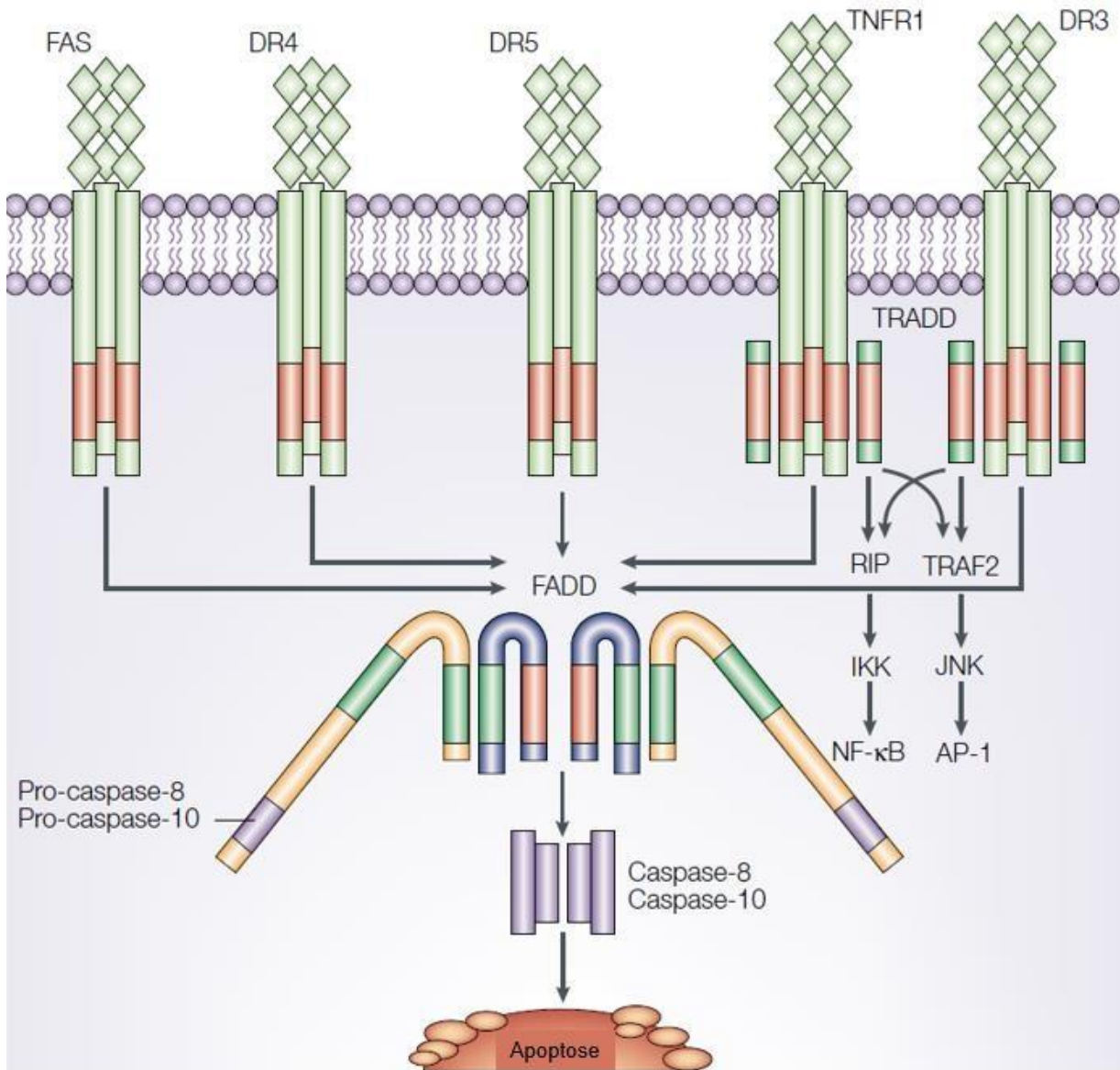


Figure 22 : Voie des récepteurs de mort de l'apoptose.

Après fixations des ligands sur leurs récepteurs, le complexe DISC est formé via l'adaptateur FADD. Les caspases 8 et 10 sont alors recrutées et capables de s'auto-cliver. Les DED sont représentés en vert. D'après Ashkenazi, 2002 [64].

Partie III. La thérapie photodynamique

III.1. Historique

L'utilisation de la lumière comme thérapie remonte initialement à plus de trois mille ans. Les civilisations chinoises, égyptiennes ou encore indiennes, utilisaient la lumière pour traiter des maladies telles que le psoriasis, le vitiligo ou le cancer de la peau [67]. Par la suite, Hippocrate a diffusé les enseignements de l'héliothérapie en utilisant le soleil comme agent thérapeutique. C'est surtout au cours du XX^{ème} siècle que la photothérapie a été popularisée en tant que traitement médical par le biais du Dr Niels Finsen, médecin danois, ayant reçu le prix Nobel en 1903 pour ses travaux sur la photothérapie à l'arc de carbone dans le traitement de la tuberculose cutanée [68], [69]. La même année, Von Tappeiner et Jesionek ont traité des tumeurs cutanées avec de l'éosine et de la lumière blanche et ont qualifiés ce phénomène « d'action photodynamique ». Le terme photodynamique est ainsi introduit. Depuis de nombreuses études ont été menées au cours du XX^{ème} siècle jusqu'à nos jours permettant un essor important de la photothérapie dynamique (PDT) dans le domaine de la cancérologie (Figure 23).

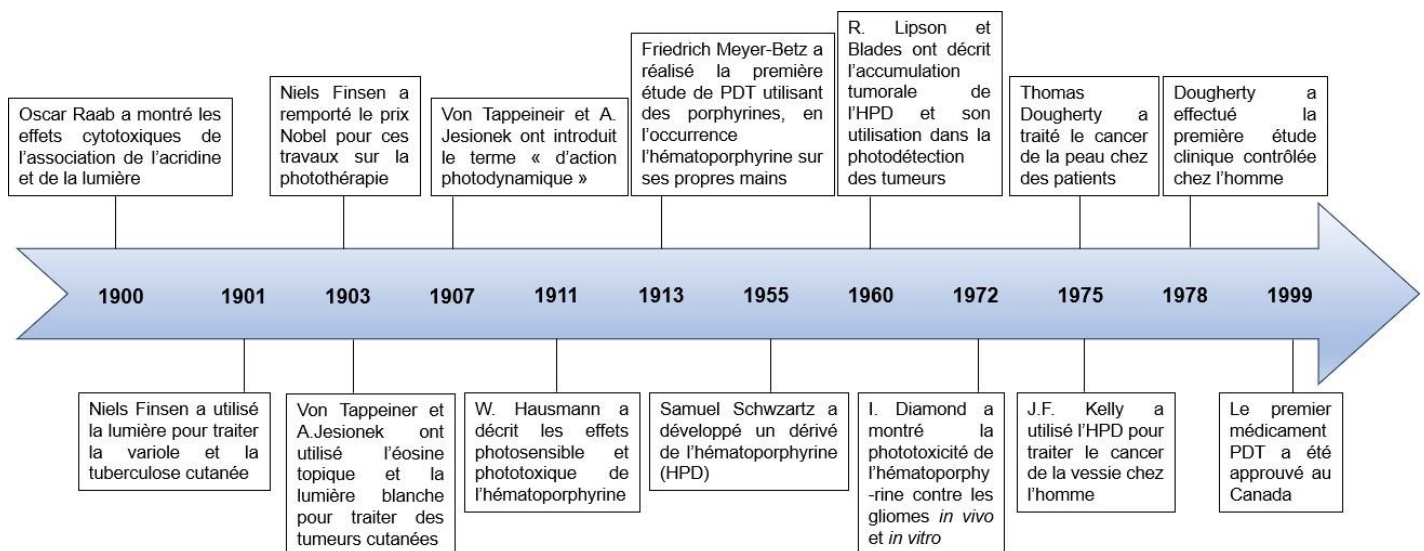


Figure 23 : Chronologie sur l'histoire de la photothérapie dynamique (1900 à aujourd'hui).

Source : [70]

III.2. Principe et mécanisme d'action

III.2.1. Principe

C'est ainsi que la PDT à visée anticancéreuse voit le jour, reposant sur le principe de sélectivité (relative) de la molécule photosensible vis-à-vis des cellules tumorales. Suite à l'activation du photosensibilisateur (PS) par la lumière, il y a destruction des cellules tumorales tout en préservant les tissus sains avoisinants. Le principe de la PDT consiste en l'administration d'un PS n'ayant aucune cytotoxicité à l'obscurité. Une fois le PS accumulé au niveau des cellules cancéreuses, une activation lumineuse de celui-ci entrainera une cascade de réactions chimiques à l'origine de la destruction de la tumeur (Figure 24).

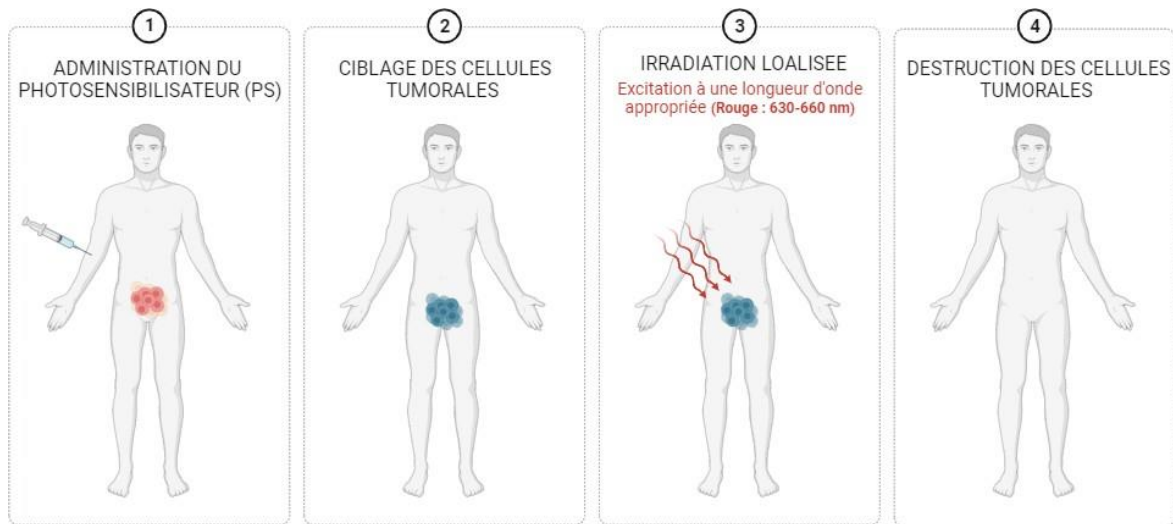


Figure 24 : Principe de la PDT.

Le PS après administration au patient va avoir une affinité avec les cellules tumorales. Le PS sera photoactivé et induira une cascade d'évènements entraînant la mort des cellules tumorales.

Le développement de la PDT est essentiellement basé sur une irradiation sélective de la zone tumorale. Cela limite ainsi la photoactivation des PSs s'étant accumulés ailleurs que dans la zone d'intérêt et limite les effets secondaires indésirables en comparaison des traitements chimiothérapeutiques actuels.

III.2.2. Mécanisme de la PDT

L'utilisation de longueurs d'onde appropriées et les propriétés photochimiques des PS confèrent à cette technique deux aspects thérapeutiques distincts [71], [72] (Figure 25):

- La photothérapie, pour laquelle le PS situé préférentiellement au niveau des cellules tumorales et par son activation par une lumière à une longueur d'onde appropriée, permettra l'induction de réactions chimiques oxydatives aboutissant à la destruction des cellules tumorales.
- Le photodiagnostic (PD) repose sur l'excitation par une lumière à une longueur d'onde spécifique entraînant la fluorescence des PS. L'analyse de cette fluorescence va

permettre une meilleure détection des tissus tumoraux, engendrant une meilleure efficacité des traitements et à terme la survie des patients.

Les PS peuvent donc être utilisés à la fois dans le diagnostic ainsi que dans le traitement du cancer. Le principe du PD étant très similaire à celui de la PDT, le PD peut facilement être transformé en PDT en augmentant la photo-irradiation ou l'intensité de la lumière.

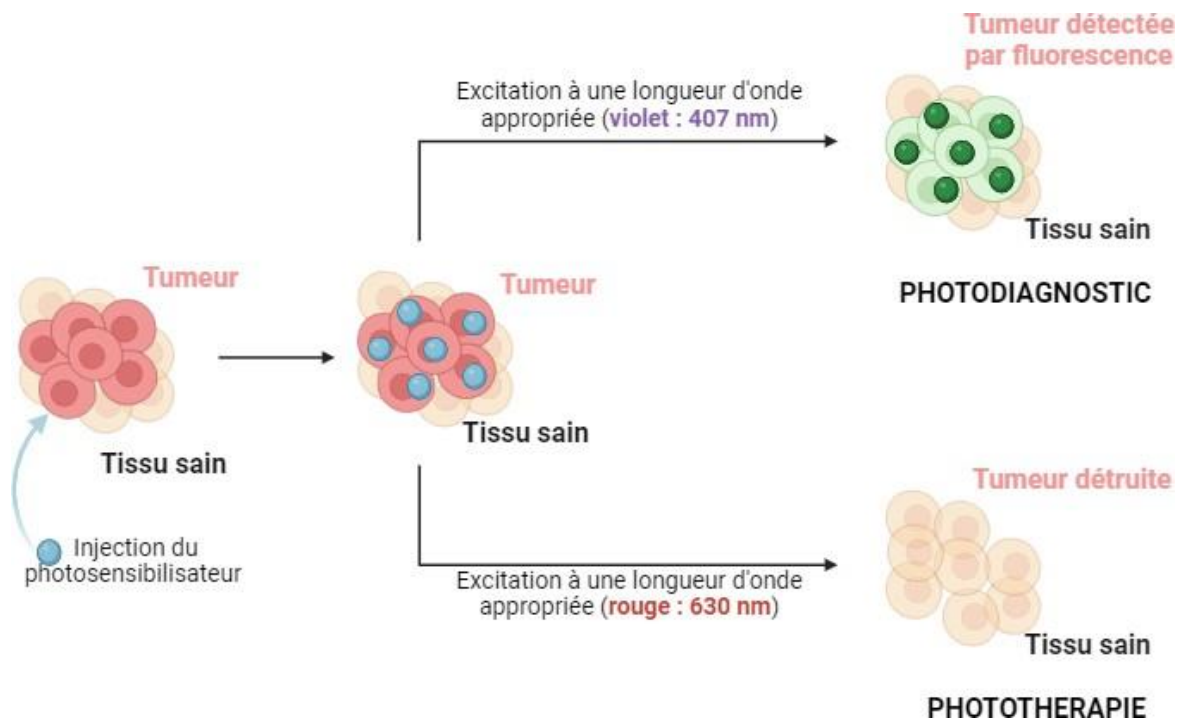


Figure 25 : Représentation de la photothérapie dynamique et du photodiagnostic

Le principe du PD permet d'analyser la fluorescence émise par le PS, celui-ci étant plus sélectif pour les tissus cancéreux, sa fluorescence va permettre la détection des lésions cancéreuses chez un patient. Le PD est donc un outil précieux concernant la chirurgie péroopératoire permettant de guider le chirurgien afin de réaliser la résection des tissus cancéreux tout en évitant les tissus sains mais également une possible récurrence (Figure 26). Le PD favorise la détection précoce des lésions cancéreuses lors de dépistages. L'utilisation de PS tel que l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) peut permettre de détecter les tumeurs résiduelles ou même les cellules tumorales flottantes [73].

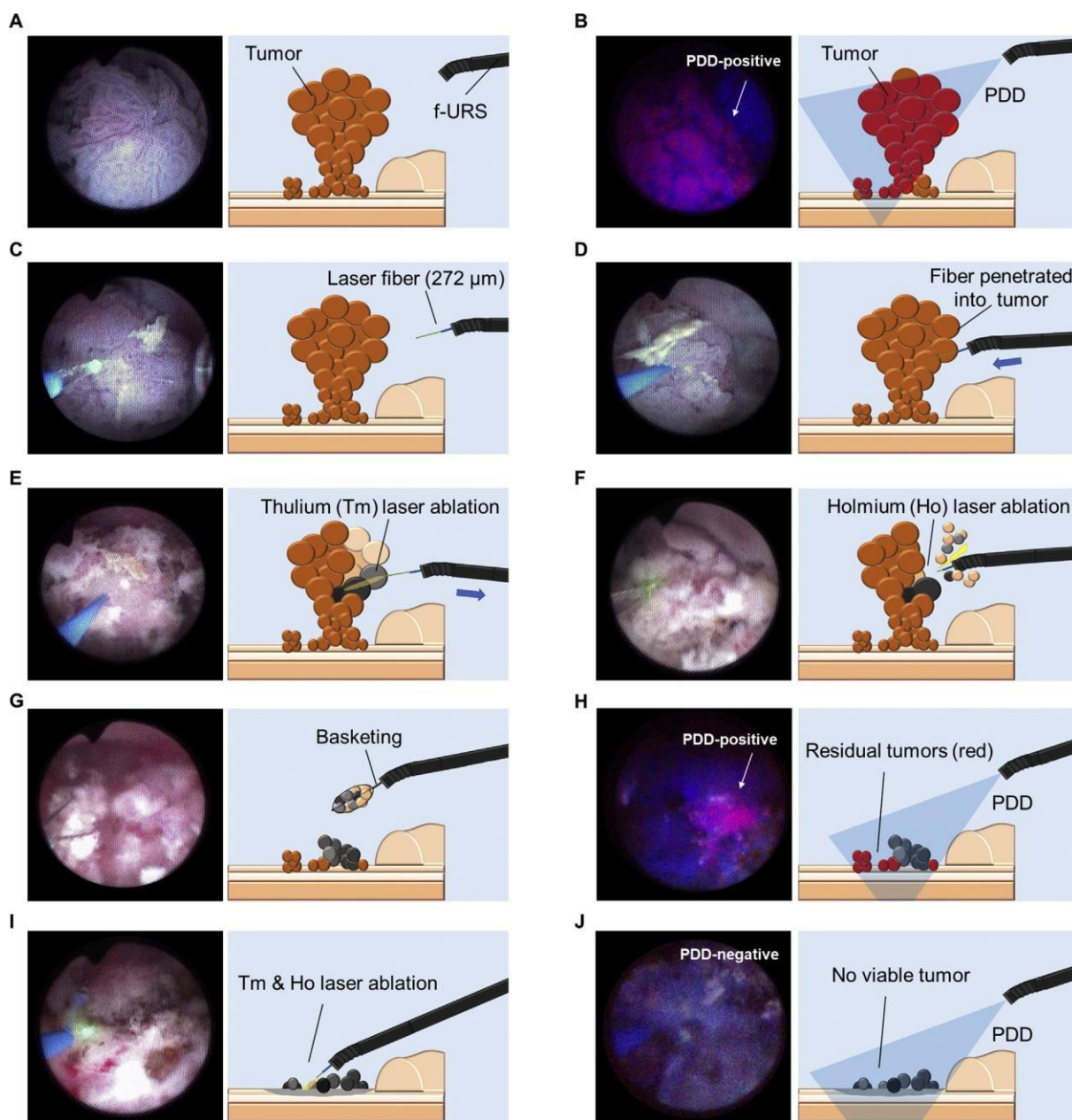


Figure 26 : Intervention pour l'ablation de tumeurs pelviennes rénales par photodiagnostic.

(A) Examen de la tumeur en lumière blanche, (B) Voir l'extension de la tumeur avec le PDD, (C) Réglage de la fibre laser, (D) Pénétration de la tumeur avec la fibre laser, (E) Ablation de la tumeur avec un laser à base de thulium, (F) Résection de la tumeur ischémique à l'aide d'un laser holmium, (G) Retirer les fragments de tumeur à l'aide d'un panier, (H) Identification des marges chirurgicales et des microtumeurs résiduelles par PD, (I) Résection des tumeurs résiduelles avec les deux lasers, (J) Confirmation de l'absence de tumeurs par PD. F-URS : urétroscopie flexible. D'Après Yoshida *et al*, 2021 [74].

De nombreuses études cliniques ont montré l'efficacité notamment du 5-ALA dans la chirurgie guidée par fluorescence. Une étude clinique de phase III réalisée sur 243 patients dans le cas du glioblastome, a démontré une augmentation de l'incidence de résection complète entraînant une augmentation de la survie sans progression pour les patients [75]. Dans le cas du CaP, Zaak et al. ont ainsi révélés une accumulation sélective de la Protoporphyrine IX (PpIX) dans les cellules tumorales, avec une faible fluorescence au sein des cellules épithéliales bénignes [76] (Figure 27). Afin de diagnostiquer le CaP de façon non invasive mais sensible, le 5-ALA a également été utilisé dans les sédiments urinaires [77]. Sur 81 patients atteint d'un CaP, 60 ont été positifs pour la PpIX-PDD, faisant de ce test un test plus sensible que le toucher rectal ou le guidage échographique transrectal et plus spécifique que le dosage du PSA.

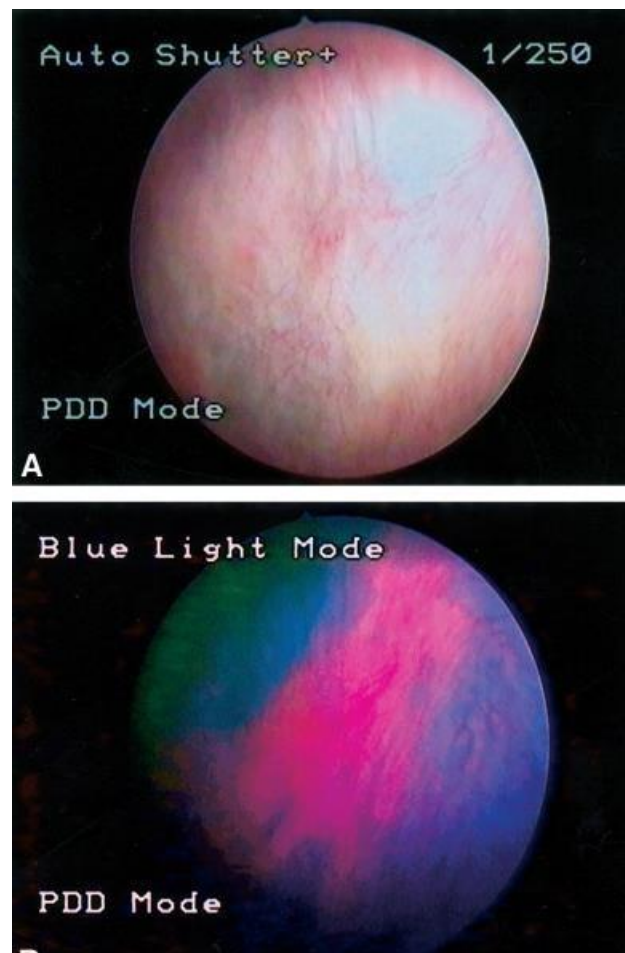


Figure 27 : Détection de lésion cancéreuse au niveau de la vessie

(A) Endoscopie en lumière blanche, (B) Endoscopie par fluorescence induite par le 5-ALA.
L'urothélium normal adjacent apparaît en bleu. D'après Zaak *et al*, 2002 [76].

Concernant la PDT à visée anticancéreuse, deux modes d'administration du PS existent : soit sous forme de crème pour une application locale (crème, émulsion...), soit par voie intraveineuse ou orale pour une application systémique. Dans les deux cas, le PS se concentre préférentiellement au niveau des tissus cancéreux puis sera activé par stimulation

lumineuse, induisant une cascade de réactions photochimiques conduisant à la mort des cellules tumorales. La PDT topique étant appliquée localement, celle-ci présente une forte sélectivité du PS sur la zone traitée. A l'inverse, la PDT systémique présente une faible sélectivité du PS entraînant une photosensibilité généralisée et prolongée des patients traités [78]. Ceci explique l'utilisation accrue de la PDT topique dans le domaine de la dermatologie mais également de la cancérologie dans le traitement de mélanome. De nombreux progrès ont permis l'amélioration de la sélectivité du PS par rapport aux cellules tumorales ce qui ouvre les champs d'application de la PDT dans le cas d'autres types de cancers ayant des tumeurs solides plus profondes.

III.3. Les réactions photochimiques

De nombreuses substances chimiques peuvent absorber la lumière et endommager les organismes par photosensibilité. Le terme « action photodynamique » est réservé en photothérapie aux PS consommant de l'oxygène moléculaire. Il existe trois acteurs majeurs, fonctionnant en symbiose, au sein de la PDT à visée anticancéreuse : le PS, la lumière et l'oxygène (Figure 28).

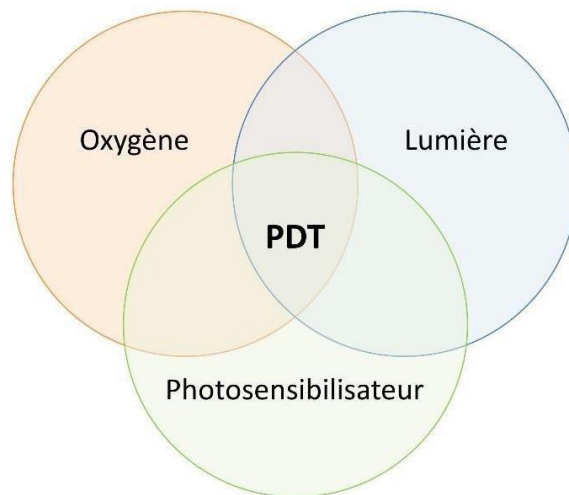


Figure 28 : Principe général de la PDT.

Une fois activé par la lumière, le PS est capable d'induire de nombreuses réactions chimiques oxydatives entraînant la destruction de la tumeur.

Par absorption de lumière le PS est excité, c'est-à-dire qu'il passe de son état fondamental ou basal (P_0), à un état singulet excité ($^1P^*$) ayant une courte durée de vie. Il sera ensuite stabilisé à un niveau d'excitation de plus faible énergie par conversion interne ($^1P^*$). L'excès d'énergie résultant de ce processus est restitué par le PS selon 3 mécanismes :

- Dégagement de chaleur
- Emission de photons de fluorescence utilisés pour le PD par transition radiative
- Passage à un état intermédiaire appelé « état triplet » utilisé pour la PDT

Par une conversion intersystème, il est possible au PS de rejoindre un état excité triplet de plus faible énergie ($^3P^*$) ayant une durée de vie plus longue. Sous cet état, le PS pourra alors interagir avec les substrats situés dans son environnement proche. S'il y a absence de substrat tel que l'oxygène, le PS peut retourner à son état fondamental par transition radiative ($^3P^* \rightarrow P_0$) avec émission de fluorescence. Néanmoins, en présence d'oxygène, des mécanismes d'oxydation peuvent entrer en compétition et conduire à la destruction des cellules cancéreuses par le biais de cascades de réactions oxydatives [79]. Il existe deux mécanismes d'oxydation appelés type I et type II (Figure 29). Les mécanismes de types I et de type II sont toujours en compétition, les facteurs qui régissent ceux-ci comprennent la concentration d'oxygène, la concentration du substrat et de l'état excité du PS ainsi que la durée de vie de l'oxygène singulet.

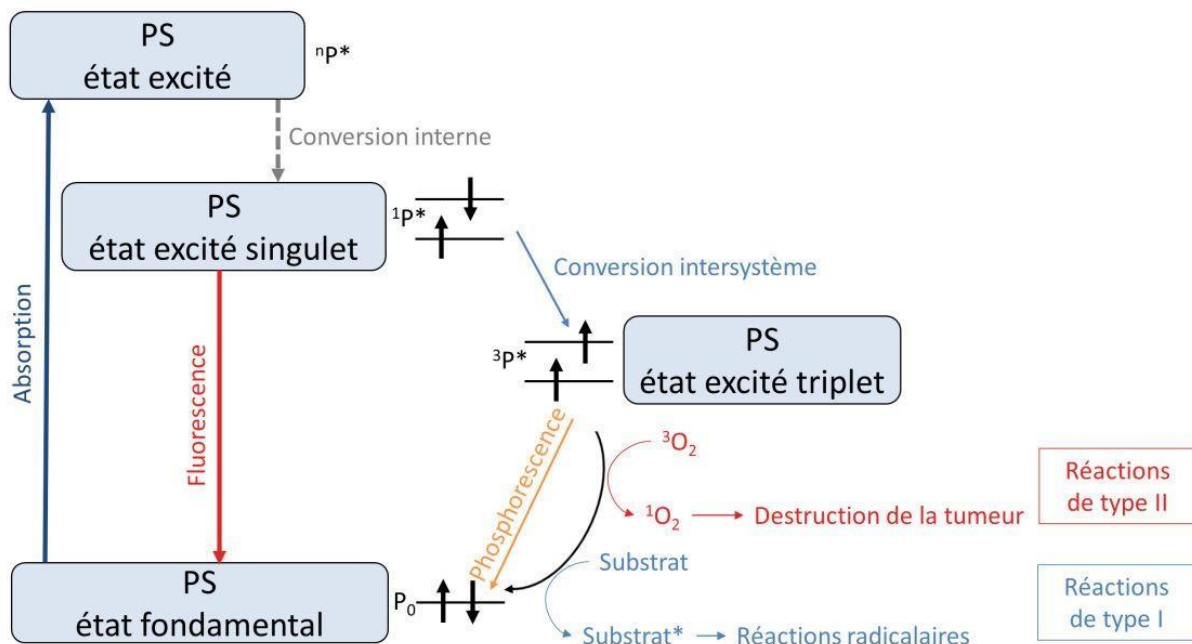


Figure 29 : Diagramme de Jablonski

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

III.3.1. Les réactions photochimiques de type I

Le mécanisme des réactions photochimiques dit de type I entraîne l'interaction directe du PS dans son état excité avec son substrat (S) : cela implique un transfert d'électrons ou d'hydrogène à l'origine de la production de radicaux ou d'ions radicalaires conduisant *in fine* à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) [80].

Les formes oxydées du PS (P^*) ou du substrat (S^*) ainsi que leurs formes semi-réduites ($P^{\cdot-}$ et $S^{\cdot-}$) peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire environnant et former respectivement des radicaux peroxydes à l'origine d'une chaîne d'auto-oxydation et de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cela permet la formations d'ERO tels que le radical hydroperoxyle (HO_2^{\cdot}) le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ces ERO induisent des réactions cytotoxiques car ils constituent de puissants oxydants pour de nombreuses biomolécules. Au

sein des réactions photochimiques de type I, l'oxygène n'est pas directement impliqué dans la première étape du mécanisme, néanmoins celui-ci influence les réactions chimiques suivantes et permet ainsi la production d'ERO (Figure 30).

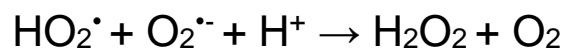
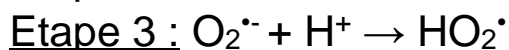
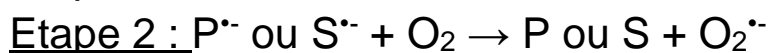
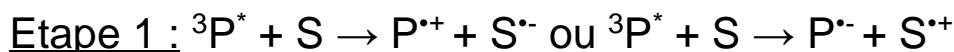


Figure 30 : Les réactions photochimiques de type I.
Les transferts entre le PS et le substrat peuvent être à l'origine de la formation d'ERO.

III.3.2. Les réactions photochimiques de type II

Lors des réactions photochimiques de type II, l'excès d'énergie du PS dans son état triplet est transféré directement à l'oxygène moléculaire. Cela permet le retour du PS à son état fondamental stable et la formation de l'oxygène singulet (1O_2) (Figure 31).

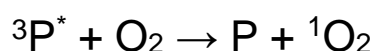


Figure 31 : Les réactions photochimiques de type II

L'oxydation de nombreuses biomolécules de la cellule par l'oxygène singulet entraîne la dégradation de nombreux constituants cellulaires entraînant sa mort. Parmi les substrats de l'oxygène singulet, on peut citer les triacylglycérols saturés, les phospholipides ou encore le cholestérol des membranes, mais également les acides aminés notamment le tryptophane, l'histidine, la méthionine ou les acides nucléiques qui sont sensibles à l'oxydation [81].

Les réactions d'oxydation citées ci-dessus par l'oxygène singulet sont toutes rapides car celui-ci possède une durée de vie très courte. Cela limite donc la zone de réaction puisqu'il parcourt environ 10 nm au sein d'une cellule [82]. Le site de localisation cellulaire du PS utilisé est donc déterminant et induit un type de mort cellulaire particulier. En effet, un PS présent au niveau des mitochondries, du réticulum endoplasmique ou des lysosomes induira l'apoptose. En revanche, un PS situé au niveau de la membrane plasmique induira plutôt un mécanisme non-apoptotique [83].

Les termes de réactions photochimiques de type I et II concernent uniquement les réactions primaires provenant de l'excitation du PS. En effet, les ERO produites lors des réactions de type I peuvent former une réaction de type II. L'oxygène singulet formé peut ainsi interagir avec les protéines et lipides insaturés et produire des hydroperoxydes qui pourront être converti en ERO de durée de vie plus longue, permettant ainsi de produire des dommages à des distances plus importantes [84] (Figure 32). L'oxygène singulet peut également réagir avec le PS et le détruire, on parle alors de photo-blanchiment.

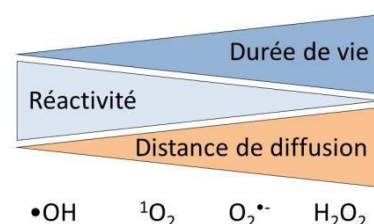


Figure 32 : Relation entre la durée de vie, la réactivité et la distance de diffusion des ERO

III.4. Le photo-blanchiment des photosensibilisateurs

Le photo-blanchiment au sens large correspond à la dégradation d'un colorant. Ce phénomène a donc tout d'abord été étudié dans la vie de tous les jours concernant l'industrie textile, mais également la vie végétale. En effet, des adaptations et évolutions ont lieu afin d'empêcher la photodégradation de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments vitaux pour les plantes. L'intérêt du photo-blanchiment a été adopté dans d'autres domaines au fil des années avec les progrès de la science de sorte qu'aujourd'hui, ce phénomène concerne le domaine de la technologie laser et de la photomédecine. C'est ainsi que la première observation concernant le photo-blanchiment dans le domaine de la PDT a été réalisée en 1986 par Moan [85].

Le photo-blanchiment c'est lorsque les PSs subissent une dégradation progressive dû à l'action des ERO nouvellement formées en diminuant leur capacité à absorber la lumière. Deux mécanismes de photo-blanchiment existent : la photo-dégradation et la photo-transformation. La photo-dégradation correspond à la fragmentation de la structure du PS formant plusieurs photo-produits peu voire incapables d'absorber la lumière. Lors du phénomène de photo-transformation, le PS est intact, néanmoins sa capacité d'absorption de la lumière se modifie. Le PS aura une diminution d'absorbance au niveau de certaines bandes spectrales, une diminution d'intensité de fluorescence ou encore une formation de nouvelles bandes d'absorption et d'émission. L'avantage de cette formation de nouvelles bandes est qu'elle induit la formation de nouveaux photo-produits pouvant servir eux-mêmes de PS [86]. Le problème majeur de ce photo-blanchiment dans la PDT est la diminution de la concentration du PS actif dans la zone irradiée. Néanmoins, ce problème est contourné par l'accumulation préférentielle des PS au niveau des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains, de ce fait une augmentation de la dose d'irradiation dans les zones traitées permet de préserver les tissus sains [87], [88].

III.5. Les photosensibilisateurs

Il existe 2 classes de PS utilisés dans les traitements anticancéreux : les dérivés non tétrapyrroliques et les PS tétrapyrroliques. Les plus étudiés sont les PS tétrapyrroliques qui peuvent être classifiés en 3 sous-catégories : les PS de première génération correspondant aux molécules naturelles, ceux de deuxième génération étant des molécules de synthèse et les PS de troisième génération correspondant à des PS intégrés au sein d'un système de vectorisation.

Chaque PS a la capacité d'absorber la lumière à une longueur d'onde spécifique et de déclencher des réactions photochimiques ou photophysiques permettant la destruction des cellules cancéreuses. Les PS étant considérés comme des médicaments ils ont un ensemble de caractéristiques et de conditions permettant de décrire le PS idéal :

- Un haut degré de pureté chimique.
- Une stabilité à température ambiante.
- Une synthèse simple et peu coûteuse et une disponibilité facile.
- Un effet photosensible uniquement en présence d'une longueur d'onde spécifique, couplé à une absence de cytotoxicité à l'obscurité.

- Une réactivité photochimique élevée : l'absorption maximale de la lumière doit se situer à des longueurs d'onde comprises entre 600 et 800 nm. En effet, l'absorption à une longueur d'onde supérieure à 800 nm ne fournit pas assez d'énergie pour stimuler l'oxygène dans son état singulet et la production d'autres EROs.
- Une absorption minimale dans la gamme de 400 à 600 nm, permettant d'éviter une photosensibilité excessive due à une exposition au soleil.
- Il faut également faire attention à ce que les bandes d'absorption ne chevauchent pas les bandes d'absorption d'autres substances présentes dans l'organisme telles que la mélatonine, l'hémoglobine....

Le PS doit avoir une solubilité aisée dans les tissus de l'organisme ainsi qu'une sélectivité élevée pour les tissus néoplasiques : le PS doit être éliminé des zones affectées et y rester au moins plusieurs heures mais être éliminé rapidement des tissus sains, minimisant ainsi les effets secondaires phototoxiques de la thérapie

III.5.1. Les PS non tétrapyrroliques

Bien que n'étant pas les plus étudiés, il est important de noter l'existence de ces molécules non basées sur des macrocycles tétrapyrroliques. Ceux-ci pourront être classés en 2 sous-catégories, les molécules naturelles et les molécules de synthèse dont voici une liste non exhaustive des principaux PS.

III.5.1.1. L'hypericine

Cette molécule est principalement extraite du millepertuis. La structure chimique de l'hypericine indique un composé aromatique polycyclique appartenant à la classe des phénanthroperylènequinones (Figure 33). L'hypericine est caractérisée par plusieurs pics d'excitation compris entre 260 et 600 nm entraînant une fluorescence aux alentours de 600 nm permettant son utilisation pour la PDT [89].

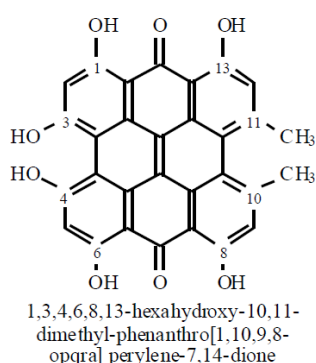


Figure 33 : Structure chimique de l'hypericine

L'hypericine possède une demi-vie d'environ 38h limitant ainsi sa phototoxicité résiduelle. De plus, celle-ci possède une forte capacité de production d'oxygène singulet et une accumulation tumorale rapide [90]. De nombreuses études ont permis d'analyser la localisation cellulaire de l'hypericine au sein du réticulum endoplasmique [91], de l'appareil de Golgi [90] voire de l'enveloppe nucléaire [92]. L'hypericine entraînera ainsi une mort cellulaire de type apoptotique ou nécrotique de façon dépendante de sa dose ainsi que de sa localisation

cellulaire. Les effets anticancéreux de l'hypericine en PDT ont été démontrés au cours de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* [93].

III.5.1.2. La curcumine

Aussi appelée diférulolylméthane, ou curcumine (Figure 34) est un pigment polyphénol présent dans la racine d'une plante de la famille des gingembres : la *Curcuma longa*. Celle-ci est largement utilisée dans la cosmétique ou encore la phytothérapie et est étudiée depuis plus de 30 ans. De nombreuses études *in vitro*, ont démontré l'efficacité de la curcumine au sein du CaP sur des lignées androgéno-dépendantes ou indépendantes. La curcumine, en fonction de la dose utilisée (jusqu'à 50 μM), entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, de la viabilité cellulaire ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire via la voie apoptotique [94]. De nombreuses études *in vivo* ont également permis de mettre en évidence sur des xénogreffes de CaP chez des souris une inhibition du volume tumoral, de la formation, du développement, de la prolifération et de l'angiogénèse des tumeurs du CaP tout en favorisant l'apoptose [95].

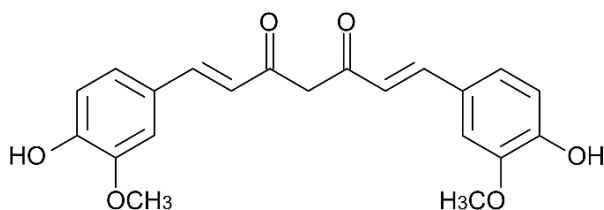


Figure 34 : Structure chimique de la curcumine

III.5.1.3. Le bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (BM) appartient à la famille des phénothiazines, c'est un colorant aromatique hétérocyclique soluble dans l'alcool ou l'eau. Le BM peut être utilisé sous forme de monomère ou de dimère modifiant son pic d'absorption à 664 nm ou 590 nm respectivement (Figure 35). Cela en fait donc un bon candidat pour la PDT. De plus, il présente une excellente pénétration dans la membrane cellulaire grâce à la capacité de son anneau benzénique à se concentrer dans les mitochondries [96], les lysosomes [97] et à l'ADN double brin [98]. L'efficacité anticancéreuse du BM a été démontrée au sein de plusieurs études *in vitro* et *in vivo* [99]. Néanmoins, le BM est rapidement dégradé par des enzymes et possède un mauvais ciblage tumoral limitant son intérêt.

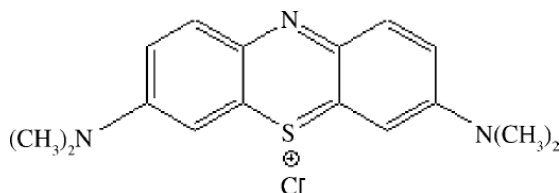


Figure 35 : Structure chimique du bleu de méthylène

III.5.1.4. Le rose bengale

Le rose bengale (RB), de structure chimique 4,5,6,7-tétrachloro-20,40,50,70-tétraiodofluorescéine disodique est un bon PS générant de l'oxygène singulet par irradiation

en lumière verte [100], [101] (Figure 36). Cependant, la nature anionique du RB et sa faible solubilité dans les lipides l'empêchent de franchir les barrières des membranes biologiques limitant ainsi son intérêt. De plus, la faible profondeur de pénétration de la lumière verte limite son utilisation dans le cas de lésions cancéreuses profondes.

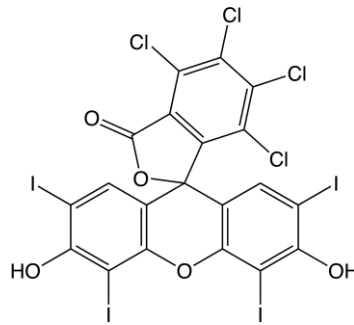


Figure 36 : Structure chimique du rose bengale

III.5.2. Les PS tétrapyrroliques

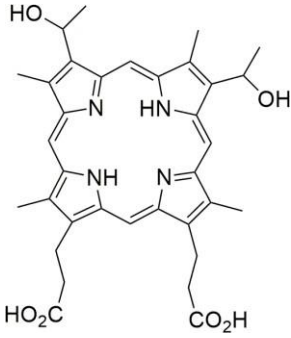
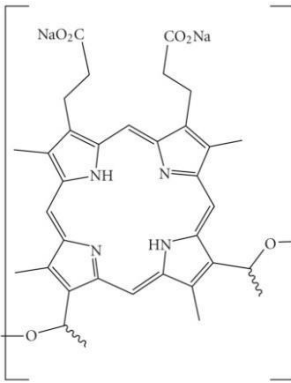
III.5.2.1. Les photosensibilisateurs de première génération

Au début du XX^e siècle, les progrès de la science ont permis l'utilisation de la PDT dans le traitement de cancer de la peau, en utilisant des PS de première génération provenant de l'hématoporphyrine (Hp). Durant les années 50, des dérivés de l'hématoporphyrine (HpD) sont obtenus par acétylation acide avec un mélange d'acides sulfurique et acétique suivie d'une alcalinisation par une solution d'acétate de sodium [102]. Les années suivantes ont permis de mettre en évidence l'efficacité des HpD dans le traitement du cancer du sein [103], [104]. Par la suite, il a été démontré par chromatographie liquide haute performance que les HpD étaient en réalité un mélange de complexes de porphyrines [105]:

- 20% d'Hp
- 20 à 30% d'hydroxyéthylcinyldéutéroporphyrine existant sous deux formes isomériques
- 3 à 5 % de PpIX
- 50 % des molécules restantes correspondent à une fraction plus hydrophobe constituée de deux hématoporphyrines-éther

De nombreuses études ont ainsi mis en évidence l'efficacité anticancéreuse des HpD (Tableau 9).

Tableau 9 : Photosensibilisateurs de première génération

Photosensibilisateur	Longueur d'onde (nm)	Structure	Applications	Références
Dérivés de l'hématoporphyrine (HpD)	630		Patients atteints au niveau du mésothéliome	[106]
			Patients atteints de gliome de stade avancé	[107]
			Echantillons de tumeurs du cerveau	[108]
			Patients atteints de cancers gastrointestinaux avancés	[109]
			Patients atteints de choroïde sous-fovéolaire néovascularisation	[110]
Photofrin®	630		Tumeurs de fibrosarcome induites par radiations (souris)	[111]
			Patients atteints de cancer colorectaux avancés	[112]
	635		Cancer du sein (souris)	[113]
			Cancer de l'ovaire (souris)	[114]
	625		Cancer oral (rat)	[115]

Par la suite, le porphimère sodique ou Photofrin® (ultrafiltrat de l'HpD) a été mis au point. Il s'agit en réalité d'une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD. La structure du Photofrin® contient un mélange d'oligomères d'hématoporphyrine reliés entre eux par des liaisons éther et ester (Figure 37). En 1993, le Photofrin® a été autorisé pour la première fois au Canada dans le traitement du cancer de la vessie. Un an plus tard au Japon, celui-ci a été approuvé dans le traitement du cancer du poumon à un stade précoce. La première autorisation de la Food and Drug Administration (FDA) concernant le Photofrin® intervient en 1995, dans le traitement du cancer obstructif avancé de l'œsophage et en 1998 concernant le cancer du poumon non à petites cellules à un stade précoce. Actuellement, il existe de nombreux essais cliniques concernant l'utilisation du Photofrin® dans le cas de la PDT. Parmi les cancers étudiés, on retrouve l'invasion du canal biliaire par un carcinome hépatocellulaire [116], les gliomes de hauts grades récurrents [117], le cancer de la tête et du cou [118] ou encore le cancer du rectum avancé [119]. L'avantage principal de le Photofrin® est son hydrosolubilité (étant un sel de sodium) facilitant ainsi son administration par injection en intra-

veineuse. Traditionnellement, le Photofrin® est donc injecté puis la tumeur est illuminée 48h après à 630 nm.

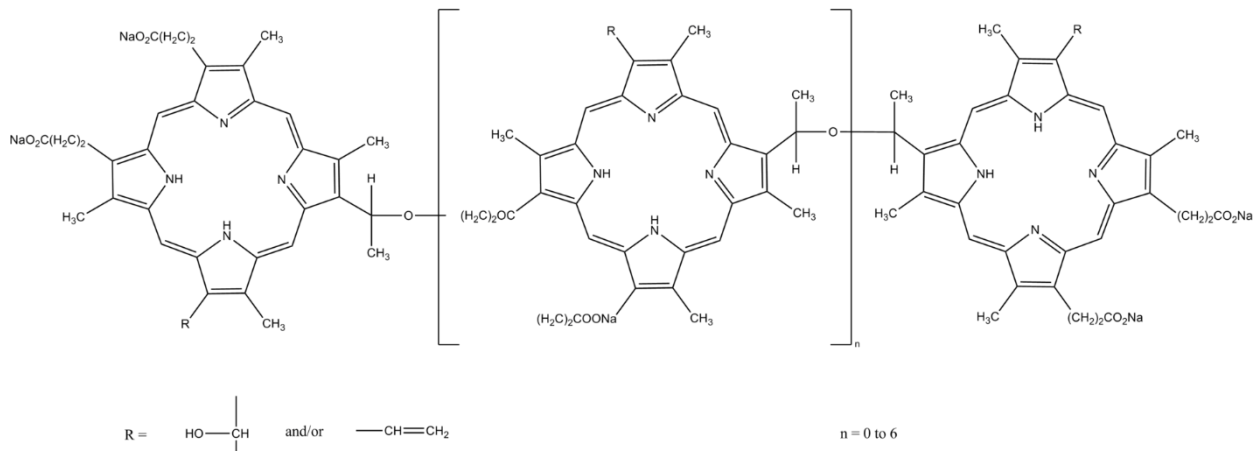


Figure 37 : Structure du Photofrin®

Néanmoins, le Photofrin®, comme tous les PS de première génération, possèdent de nombreux inconvénients. En effet, une photosensibilité importante est observée après traitement pouvant durer jusqu'à 4 semaines et nécessiter d'éviter le soleil ou l'éclairage lumineux [120]. De plus, lorsque le Photofrin® est appliqué au niveau d'organe creux tel que la vessie ou encore l'œsophage, il semblerait qu'il s'accumule au niveau du collagène sous-jacent et dans les couches des muscles lisses où il pourra provoquer une sténose ou la formation de structures conduisant à une obstruction [121]. Le Photofrin® étant un mélange de molécules comme vu précédemment, la composition de celui-ci ne sera que peu reproductible d'un lot à l'autre. Son absorption dans le rouge étant faible cela limite également son efficacité envers des tumeurs profondes.

III.5.2.2. Les photosensibilisateurs de deuxième génération

Par rapport aux PS de première génération, la composition et la structure des PS de deuxième génération sont claires, et la photosensibilité, le spectre d'absorption et la sélectivité tumorale ont été grandement améliorés. La plupart des PS de deuxième génération sont basés sur une structure de porphyrine telles que les benzoporphyrines, les purpurines, les texaphyrines, les phtalocyanines, les naphthalocyanines et la PpIX (Tableau 10). De plus, ces composés ont une meilleure efficacité anticancéreuse grâce à un meilleur rendement en oxygène singulet. Ils ont également une clairance plus importante que ceux de première génération limitant la phototoxicité retrouvée avec les anciens PS en clinique [122].

III.5.2.2.1. Le Foscan®

Également connu sous le nom de témporphine ou *m*-tétrahydrophénylchlorine (*m*THPC), est une chlorine issue de la réduction d'une double liaison de la porphyrine correspondante (Figure 38). Celui-ci a été approuvé par l'Agence Européenne des Médicaments (AEM) en 2001 pour le traitement des tumeurs squameuses avancées de la tête et du cou [123]. Cependant, le Foscan a fait l'objet d'une demande d'homologation auprès de la FDA en 2000 mais l'autorisation a été refusée. A l'origine, le Foscan® était fabriqué par Scotia Phamaceuticals (Ecosse) puis transféré à Biolitec (Allemagne). De nombreux essais cliniques du Foscan® existent démontrant son efficacité dans les cancers du sein [124], du pancréas [125], ou encore de la prostate [126].

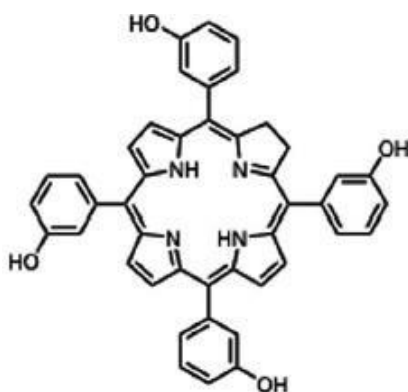


Figure 38 : Structure du Foscan®

Le Foscan® est administré à une dose unique ($0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$) et l'irradiation aura lieu 96h après administration. Le Foscan® n'étant pas soluble dans l'eau, il sera administré par injection IV dans 40% d'éthanol et 60% de propylène glycol. Il possède de nombreux avantages comme sa puissance élevée ainsi qu'un pic d'absorption à 652 nm caractéristique d'une chlorine. Malgré ces nombreux avantages, le Foscan® peut entraîner des dommages au niveau des tissus normaux entourant la tumeur. De plus, il existe un risque de brûlures cutanées au niveau du point d'injection du PS [127]. Un autre inconvénient majeur du Foscan® est la durée de sa photosensibilité cutanée qui reste modérément longue (2 semaines).

III.5.2.2.2. Le Vertéporfine

Aussi appelé Visudyne® ayant été approuvée par la FDA en 2000 dans le traitement de la néovascularisation choroïdienne causée par la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [128] (Figure 39). Elle se présente sous la forme d'une préparation liposomale lyophilisée et injectée en IV. Sa structure chimique est une chlorine et elle présente un pic d'absorption à 690 nm. L'avantage de la Vertéporfine est qu'elle est rapidement éliminée des tissus avec une photosensibilité de la peau inférieure à 2 jours suivant l'injection [129].

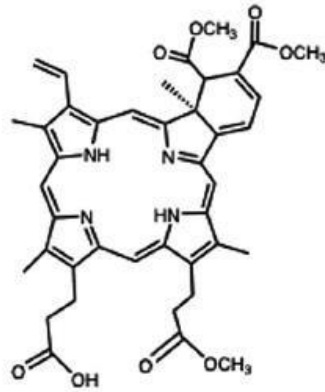


Figure 39 : Structure de la Vertéporfine

La Visudyne® a été largement utilisée pour le traitement de la DMLA jusqu'à l'apparition d'anticorps monoclonaux contre le VEGF [130]. La PDT à la Vertéporfine n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études dans le traitement du cancer. Néanmoins plusieurs essais cliniques ont eu lieu au cours de ces dernières années concernant le cancer du sein (avant chirurgie) [131], le cancer du pancréas localement avancé [132], les mélanomes de stades III ou IV [133].

III.5.2.2.3. Le Tookad®

Le terme Tookad® désigne en réalité deux composés différents synthétisés par Avigdor Scherz et Yoram Salomon. Le premier Tookad® aussi appelé WST-09 est un dérivé de bactériophénophorbide substitué par du Palladium, non soluble dans l'eau (Figure 40). Il possède une large bande Q à 760 nm permettant ainsi une bonne pénétration au sein des tissus. En raison de ses difficultés d'utilisation, en 2005, un dérivé hydrosoluble a été mis au point appelé WST-11, Stakel® ou encore Padeliporphine fabriqué par Steba Biotech au Luxembourg [134]. Les deux formes du Tookad® se sont révélés avoir une demi-vie très courte et être activées au niveau intravasculaire et non au niveau de la tumeur. On parle ainsi de PDT ciblée à visée vasculaire (VTP) induisant la destruction de la néovascularisation conduisant à l'ischémie tumorale.

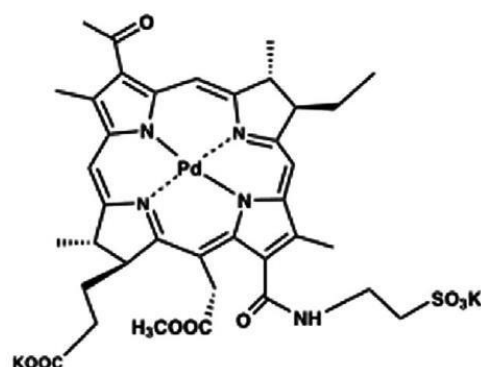


Figure 40 : Structure du Tookad®

Le Tookad® a fait l'objet d'étude clinique dans le cas du CaP par utilisation de fibres optiques interstitielles transpérinéales insérées par TRUS sous anesthésie générale [135]. Les

deux types de Tookad[®] ont été testés cliniquement dans le CaP mais seul le WST-11 a reçu l'approbation de l'AEM en 2017. Une étude de phase III portant sur 413 patients dans 10 pays différents a permis de montrer l'efficacité et l'innocuité du Tookad[®] [136]. D'autres essais cliniques sont en cours concernant le CaP à faible risque [137], le CaP à risque intermédiaire [138] et le cancer du rein [139].

III.5.2.2.4. La Talaporfine

Dérivé de la chlorine aussi appelé NPe6 a été approuvé dans le traitement du cancer du poumon à un stade précoce en 2004 au Japon et commercialisé sous le nom de Laserphyrin[®] [140] (Figure 41). Il s'agit d'une chlorine hydrosoluble injectée directement en IV et éliminée assez rapidement évitant ainsi tout problème de photosensibilité cutanée. La NPe6 possède une demi-vie courte et l'irradiation doit être réalisée dans les 4h suivant l'injection. L'efficacité de la Talaporfine a été démontrée grâce à des essais cliniques portant sur le carcinome hépatocellulaire non résecable [141] et les métastases hépatiques du cancer colorectal [116].

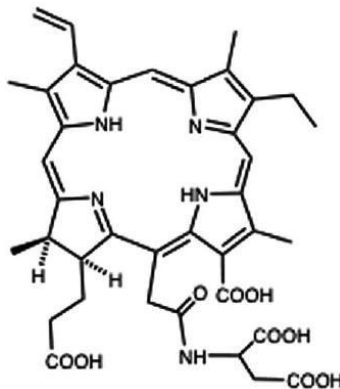


Figure 41 : Structure de la Talaporfine

III.5.2.2.5. Le Levulan[®]

Aussi appelé 5-ALA, ce PS connu comme pro-médicament a la capacité de pénétrer le stratum de la couche cornée et d'être absorbé au niveau des cellules cutanées endommagées, il est le précurseur impliqué dans la biosynthèse de l'hème (Figure 42). Une fois dans la cellule, le 5-ALA est converti en son médicament actif : la PpIX dans le cytoplasme puis au sein de la mitochondrie (Figure 43). Il a ainsi été démontré que la PpIX est photoactivée par de nombreuses sources lumineuses et lasers. Le Levulan[®] possède un pic d'absorption dans le bleu et un dans le rouge.

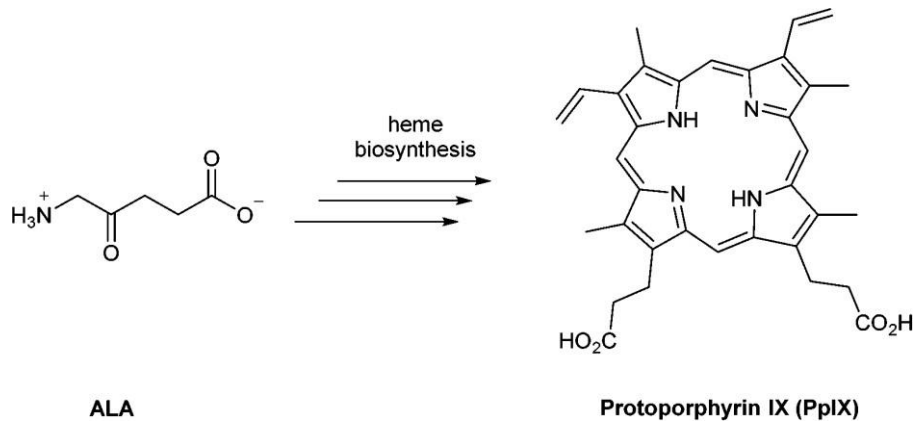


Figure 42 : Structure du 5-ALA et de la PpIX

La biosynthèse de l'hème est finement contrôlée afin que la concentration physiologique n'atteigne jamais le seuil requis de photosensibilisation. Il y a un mécanisme de rétrocontrôle agissant sur l'ALA-synthétase qui bloque la néoformation de 5-ALA. Ce processus peut être contourné en administrant du 5-ALA exogène en concentration importante. La conversion du 5-ALA en PpIX est rapide, en revanche, la ferrochélatase impliquée dans la conversion de la PpIX en hème sera dans l'incapacité de convertir aussi rapidement une forte quantité de PpIX, conduisant ainsi de façon transitoire à des concentrations élevées en PpIX au sein des cellules (Figure 43) [142].

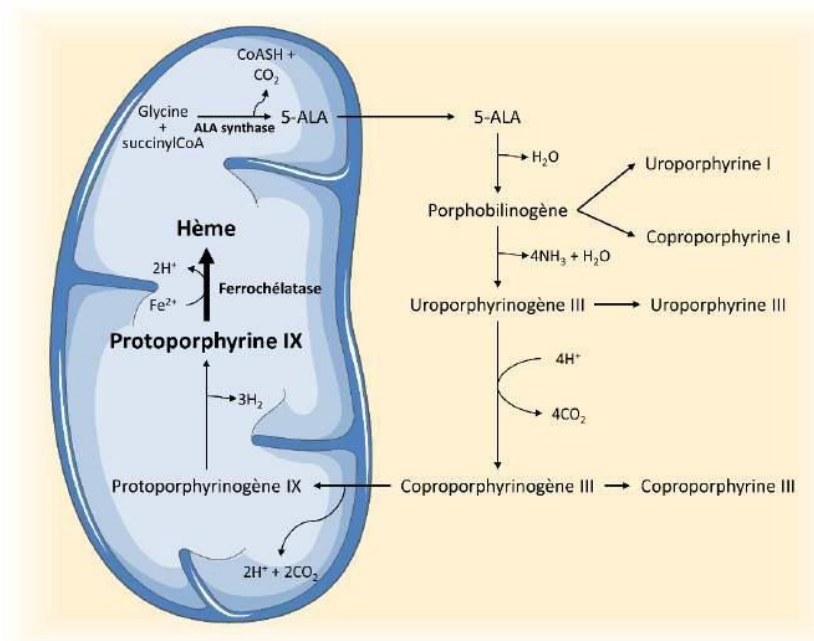


Figure 43 : Biosynthèse de l'hème

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

L'un des avantages de la PpIX est qu'elle permet une administration par voie topique sur les lésions superficielles. De plus l'accumulation maximale de la PpIX requiert un intervalle

de temps court de 1 à 8h selon le mode d'administration. Sa clairance est également rapide, environ 24 à 48h. Le Levulan[®] est utilisé en routine puisqu'une étude a démontré son efficacité dans le traitement des kératoses actiniques des mains [143]. Il a ainsi été approuvé en 2000 dans le traitement topique des kératoses actiniques du visage, du cuir chevelu et dans le traitement des cancers de la peau non-mélaniques. Cependant ce traitement reste préconisé dans le cas de tumeurs superficielles uniquement.

Photosensibilisateur	Longueur d'onde (nm)	Applications	Références
Vertéporfine	689	Patients atteints de taches de vin de naissance non faciales	[144]
		Tissu tumoral chez un modèle de tumeur de souris	[145]
NPe6 ou Talaporfine	660	Patients atteints d'un carcinome des voies biliaires	[146]
5-ALA ou Levulan [®]	635	Patients atteints de tumeurs cérébrales	[147]
		Patients suspectés d'avoir un gliome malin	[148]
Foscan [®]	652	Modèle de rat utilisant un marqueur lipidique radioactif	[149]
Tookad [®]	763	Patients atteints d'un cancer de la prostate	[150]

Tableau 10 : Photosensibilisateurs de deuxième génération et leur utilisation

III.5.2.3. Les photosensibilisateurs de troisième génération

Actuellement en cours de développement, ces PS de troisième génération permettent une meilleure sélectivité tumorale par substitution des motifs chimiques spécifiquement reconnus par les cellules tumorales. Ces motifs vont être des biomolécules telles que des stéroïdes, des sucres... Bien qu'une tumeur corresponde à un ensemble cellulaire hétérogène entraînant de possibles récives et renforçant ainsi l'intérêt des polythérapies, cette technologie s'apparentant au cheval de Troie reste prometteuse. Ces substitutions vont être reconnues spécifiquement par les cellules cancéreuses servant ainsi de vecteur aux PS et limitant l'effet cytotoxique sur les cellules saines.

III.5.2.3.1. Les PS couplés aux stéroïdes sexuels

Certains cancers comme le CaP sont sensibles aux hormones. C'est notamment le cas dans les cancers du sein et des ovaires où les cellules tumorales surexpriment le récepteur aux œstrogènes. La tétraphénylporphyrine (TPP) est une porphyrine possédant un bon rendement en oxygène singulet utilisé dans le traitement du cancer du sein (Figure 44) [151]. En effet, il a été démontré que la liaison de l'estradiol sur la TPP augmente le ciblage des cellules tumorales en comparaison avec la TPP seule.

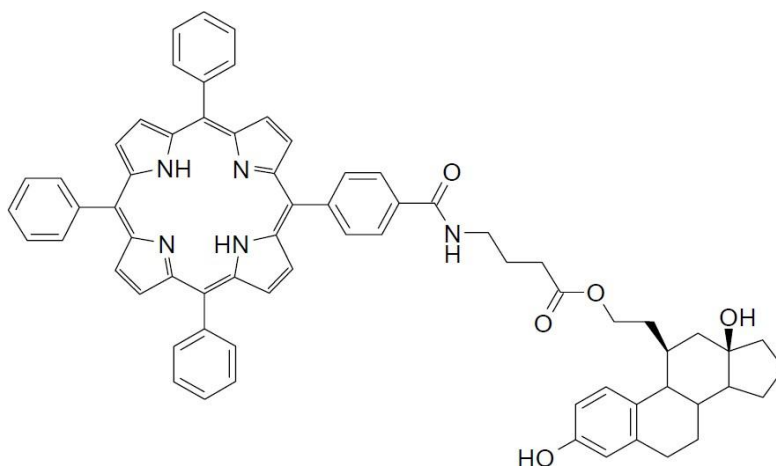


Figure 44 : Structure du complexe estradiol-tétraphénylporphyrine (TPP)

III.5.2.3.2. Les PS polyaminés

Tout naturellement, l'intérêt s'est porté sur les polyamines. En effet, ces molécules constituées d'une longue chaîne carbonée sont impliquées dans les processus de prolifération cellulaire. Elles interagissent avec les acides nucléiques (ARN et ADN) et leur synthèse est régulée selon les phases du cycle cellulaire leur permettant ainsi de jouer un rôle dans la croissance cellulaire. Les cellules cancéreuses ayant une division cellulaire plus importante nécessitent plus de polyamines. Du fait de l'activité mitotique plus importante au niveau des cellules cancéreuses, les polyamines auront une métabolisation plus élevée et pourront être utilisées à des fins vectorielles. Une étude réalisée au sein du laboratoire a démontré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* du couplage PpIX-dispermidine par rapport à la PpIX seule, grâce à une augmentation de l'incorporation dans des cellules humaines du CaP [152] (Figure 45).

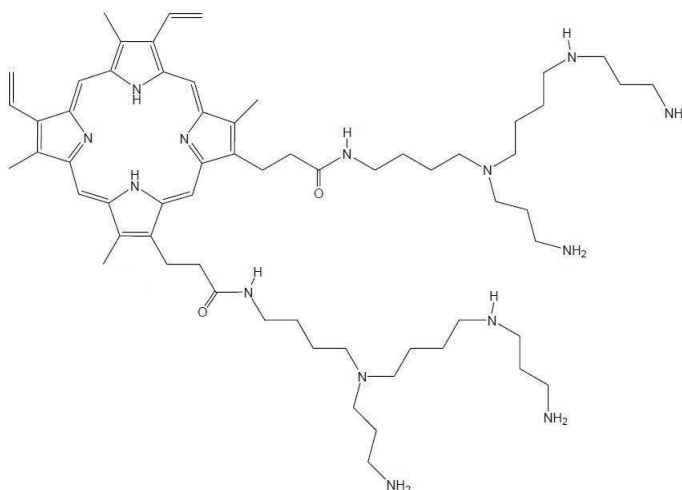


Figure 45 : Structure de la PpIX disperminée (PpIX-dSm).

La PpIX est vectorisée par deux molécules de spermine à l'aide de deux bras espaceurs.

Source : Dugas *et al*, 2017 [153]

III.5.2.3.3. Les PS couplés aux anticorps monoclonaux

La fixation des ligands sur les récepteurs à activité tyrosine kinase (exemple l'EGFR) ou le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (GER2) permet leur activation. Ces récepteurs sont donc souvent surexprimés dans certains cancers. Le ciblage préférentiel des cellules cancéreuses peut donc s'effectuer en réalisant une conjugaison du PS à des anticorps monoclonaux spécifiques de ces récepteurs. Des études ont ainsi mis en évidence une augmentation du ciblage tumoral ainsi que de l'efficacité anticancéreuse via la fixation du cétuximab[®] sur une phtalocyanine [154] et du trastuzumab[®] sur Npe6 [155].

III.5.2.3.4. Les PS nanovectorisés

En complément de ces PS conjugués, la troisième génération contient également les PS vectorisés et encapsulés. Les nanomatériaux sont définis comme de petits objets (1 à 100 nm) qui se comportent comme une unité entière concernant leur propriété de transport. Deux approches différentes sont retrouvées dans cette utilisation de nanotechnologie dans la PDT :

- La nanoparticule (NP) utilisée peut elle-même constituer le PS. C'est notamment le cas des fullerènes, des NPs d'or et d'argent. Dans ce cas, c'est la NP qui est capable d'absorber la lumière et de réaliser le phénomène de PDT.
- La NP utilisée sert de système de vectorisation du PS, afin d'améliorer la solubilité et d'assurer un meilleur ciblage des sites tumoraux. C'est le cas des dendrimères, liposomes ou des NP de silice mésoporeuse.

Les NPs possèdent de nombreuses propriétés physiques, biologiques et chimiques leur permettant de réaliser des interactions uniques avec les systèmes biologiques au niveau moléculaire, d'où leur importance dans la thérapie anticancéreuse. Ces nanoparticules ont donc été développées et grandement utilisées récemment (Tableau 11).

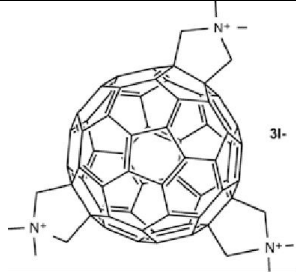
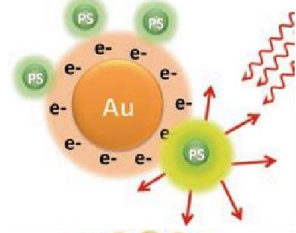
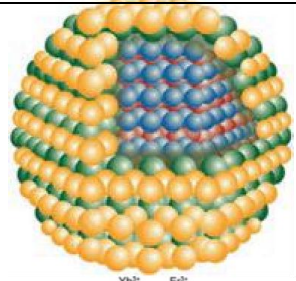
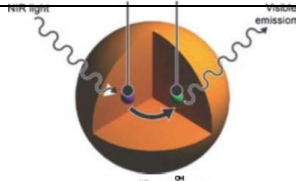
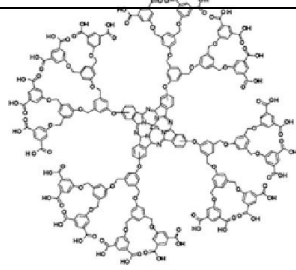
Les liposomes en tant que NPs sont particulièrement utilisés. En effet, les liposomes peuvent être constitués d'un certain nombre de lipides différents d'origine naturelle ou synthétique. Le lipide le plus couramment utilisé est la phosphatidylcholine étant peu coûteux et un constituant principal des membranes cellulaires. L'utilisation des liposomes dans la nanovectorisation permet d'améliorer la pharmacocinétique et la pharmacodynamie, tout en réduisant la cytotoxicité et en améliorant l'administration des PS [156].

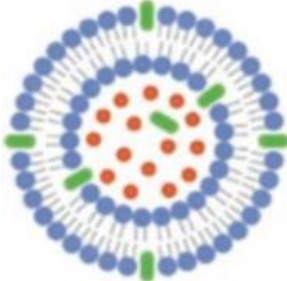
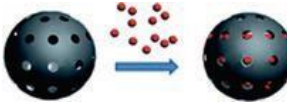
Les dendrimères ont également été étudiés grâce à leur structure tridimensionnelle hautement ramifiée et à leur haute solubilité dans l'eau. Il existe différents dendrimères utilisés pour administrer et cibler les PS [157]. L'un des plus étudiés est la poly(amidoamine) ou PAMAM. Les fullerènes sont des structures sphériques ou parfois ellipsoïdales, constituées de dizaine d'atomes de carbone [158]. Ils sont connus pour leur photostabilité et subissent relativement peu le photo-blanchiment par rapport aux tétrapyrroles. Ils peuvent également s'auto-assembler pour former des fullérosomes agissant comme des vecteurs d'administration de PS.

Les NPs d'or sont les plus utilisées car elles possèdent un potentiel élevé pour traverser les membranes des cellules cancéreuses en PDT. Le plus important durant la PDT est la manière d'internaliser le PS de sorte que pendant l'excitation lumineuse il y ait une production suffisante de ERO dans les cellules. De nombreux PS étant hydrophobes et peu

solubles, l'utilisation de NP d'or permet d'augmenter la solubilité aqueuse et la biodisponibilité des PS ainsi que leur efficacité [159].

Tableau 11 : Photosensibilisateurs de troisième génération et leur application

Nanoparticules	PS	Structure	But et application	Références
Fullerènes fonctionnalisés	BB6		Photostabilité. Antimicrobien	[160]
Nanoparticules d'or	PS conventionnels		Amélioration plasmonique de la PDT. Anticancéreux	[161], [162]
Points quantiques	Polymères points quantiques + tétraphénylporphyrine carbone points quantiques		Solubiliser le PS, génération d'ERO. Anticancéreux, antimicrobien	[163], [164]
Nanoparticules à conversion ascendante	Hypocrelline A		Excitation proche infra-rouge, émission dans le bleu. Cancer	[165]
Dendrimères	Polyamidoamine-zinc phtalocyanine		Prévention de l'agrégation. Cancer et athérosclérose	[166], [167]

Liposomes	Foslip® (méta-tétra(hydroxyphényl)chlorine)(mTHPC), Fospeg® (Foslip polyéthylène glycoylé)		Solubiliser et protéger le PS, diminution des effets secondaires. Cancer	[168]
Nanoparticules de silicium mésoporeux	Polyéthylèneimine-polyéthylène glycol-nanoparticules de silicium mésoporeux / Zinc phthalocyanine		Solubiliser et protéger le PS. Cancer	[169]

III.5.3. PDT et cancer de la prostate

Le CaP est une tumeur solide généralement localisée et correspond donc à un bon candidat en matière de PDT. L'administration IV peut être envisagée, suivie d'une irradiation locale de la glande prostatique cancéreuse en utilisant des fibres optiques. Ainsi, la première utilisation clinique de la PDT pour le CaP remonte à 1990, utilisant des HpD administrés par IV. L'étude porte sur le traitement de 2 patients porteurs d'un CaP localisé traités 6 semaines en amont par résection transurétrale de la prostate [170]. Par la suite de nombreuses études cliniques ont été réalisées (Tableau 12).

La mTHPC (PS de deuxième génération) a été utilisée dans plusieurs études afin de traiter le CaP. La première étude a lieu en 2002 chez 14 patients en récurrence du CaP après radiothérapie [126]. L'intervalle entre l'injection et l'irradiation a duré 3 jours durant lesquels les patients ont été dans une pièce sombre. Ils ont ensuite reçu une forte dose de lumière (50 J). Pendant le suivi post-PDT, le taux de PSA avait diminué chez 9 patients et aucune tumeur n'avait été retrouvée au niveau des biopsies de 5 patients. Néanmoins, le taux de PSA des patients a fini par augmenter et ils ont reçu un traitement par suppression androgénique (ADT).

Le 5-ALA est également utilisé dans le traitement du CaP. Une étude a ainsi été réalisée sur 14 patients atteints du CaP par administration de 5-ALA par voie orale [76]. Des coupes de tissus ont été réalisées et examinées par microscopie à fluorescence démontrant la présence du PS uniquement au niveau des cellules cancéreuses. Après irradiation, la valeur du PSA a diminué de 20 à 70% pour augmenter lentement un an plus tard. Aucune complication n'a été signalée au cours de cette étude. L'avantage significatif de l'utilisation de 5-ALA durant la PDT est l'intervalle de temps entre l'administration du médicament et l'irradiation réduit à 4 heures.

Tableau 12 : Essais cliniques de la PDT dans le traitement du CaP

PS	Année	Stade de l'essai clinique	Dose administrée/Dose de lumière/Intervalle administration-irradiation	Références
HpD Photofrin®	1999	Non applicable	1.5 mg.kg ⁻¹ /15 J.cm ⁻¹ /48-72 h 2.5 mg.kg ⁻¹ /15 J.cm ⁻¹ /48-72 h	[170]
mTHPC	2002	Phase I	0.15 mg.kg ⁻¹ /20 J.cm ⁻¹ ou 50 J.cm ⁻¹ /3 jours	[126]
	2006	Phase I	0.15 mg.kg ⁻¹ /50-100 J.cm ⁻¹ /2, 3 et 5 jours	[171]
5-ALA (orale)	2003	Phase I	20 mg.kg ⁻¹ /250 J.cm ⁻¹ /4 h	[76]
	2009	Phase II	20 mg.kg ⁻¹ (≤ 1.5 g/personne)/3 h	[172]
Motexafin Lutetium® (MLu)	2006	Phase I	0.5.mg kg ⁻¹ /25 J.cm ⁻¹ /24 h 1 mg.kg ⁻¹ /25 J.cm ⁻¹ /24 et 6 h 2 mg.kg ⁻¹ /25, 50, 100 et 150 J.cm ⁻¹ /6 et 3h	[173], [174]
Tookad® (WST-09)	2007	Phase I	0.1, 0.25, 0.5 et 1 mg.kg ⁻¹ /100 J.cm ⁻¹ /10 min	[175]
	2008	Phase II	2 mg.kg ⁻¹ /230 et 360 J.cm ⁻¹ /6 min	[176]
Tookad® (WST-11)	2013	Phase II	4 ou 6 mg.kg ⁻¹ /200 J.cm ⁻¹ /0 min 4 mg.kg ⁻¹ /200 et 300 J.cm ⁻¹ /0 min	[150]
	2013	Phase II	4 mg.kg ⁻¹ /200 J.cm ⁻¹ /0 min	[177]
	2015	Phase II	2, 4 et 6 mg.kg ⁻¹ /200 J.cm ⁻¹ /0 min	[178]
	2016	Phase I/II	4 mg.kg ⁻¹ /200 J.cm ⁻¹ /0 min	[179]
	2017	Phase III	4 mg.kg ⁻¹ /200 J.cm ⁻¹ /0 min	[136], [180]
	2017	Phase II	4 mg.kg ⁻¹ /150 et 200 J.cm ⁻¹ /0 min	[181]
	2018	Phase II	4 mg.kg ⁻¹ /150 et 200 J.cm ⁻¹ /0 min	[182]
	2019	Phase II	4 mg.kg ⁻¹ /200 J.cm ⁻¹ /0 m	[183]
	2022	Monde réel	4 mg.kg ⁻¹ /200 J.cm ⁻¹ /0 min	[184]

La PDT étant peu invasive paraît être un traitement à haut potentiel dans le traitement du CaP localisé en minimisant les effets sur la vessie, le rectum et le faisceau neurovasculaire. Cependant, il reste encore beaucoup d'incertitudes et de lacunes dans l'utilisation de la PDT pour le CaP. Le développement de nouveaux PS et des lasers correspondant permettront d'optimiser la PDT dans le traitement du CaP en améliorant les activités photodynamiques, avec une destruction plus profonde, une meilleure sélectivité et moins d'effets indésirables.

Partie IV. Utilisation des métaux dans les traitements contre le cancer

IV.1. Historique

Les balbutiements concernant l'utilisation des métaux dans un but thérapeutique ont eu lieu il y a quatre mille ans dans la Chine ancienne où l'on utilisait l'or pour traiter les ulcères cutanés ou les furoncles mais encore dans l'utilisation du cinabre (sulfure de mercure) dans le traitement des affections. Par la suite dans la Rome antique, l'ajout de pièces d'argent au niveau des réservoirs d'eau potable permettait d'éviter les intoxications liées à un stockage prolongé. Aux IX^e et XI^e siècles avant J.-C, les contributions de scientifiques comme Rhazes ou Avicienne ont permis la découverte des effets toxicologiques du mercure chez les animaux et son utilisation en pommade pour les maladies de peau. Un autre métal, le trioxyde d'arsenic était utilisé comme antiseptique dans le traitement des pathologies rhumatoïdes, de la syphilis ou du psoriasis dans la médecine traditionnelle chinoise. Il a été l'un des premiers composés proposés dans le traitement de la leucémie au cours des XVIII^e et XIX^e siècle jusqu'au début du XX^e siècle où son utilisation a été remplacée par la radiothérapie et la chimiothérapie cytotoxique. Au début du XX^e siècle des médicaments à base d'arsenic furent testés et commercialisés, mais ayant des effets secondaires importants, ils ont été remplacés. Le rôle dans les processus biologiques naturels de nombreux ions métalliques, en ont naturellement fait une cible privilégiée dans le développement d'agents thérapeutiques anticancéreux.

C'est en réalité grâce à la découverte de l'activité antiproliférative, du cis-diamminedichloroplatinium (II) [185] que la recherche basée sur les métaux a connu son essor. Cette découverte constitue le fondement de l'ère moderne des médicaments anticancéreux à base de métaux. De façon globale, les métaux sont des composants essentiels des cellules retrouvés au niveau des domaines catalytiques des enzymes et sont impliqués dans de multiples processus biologiques. Ces métaux comprennent : le gallium, le zinc, le cobalt, l'argent, le vanadium, le strontium, le manganèse et le cuivre. En comparaison, les métaux tels que le nickel, le cadmium, le chrome et l'arsenic peuvent induire une carcinogénèse et sont donc moins bénéfiques pour l'organisme.

IV.2. Les médicaments anti-tumoraux à base de platine

Les limites rencontrées par les autres types de métaux ont déclenché une recherche de composés à base de platine présentant une toxicité plus faible, une sélectivité plus élevée et un spectre d'activité plus large [186], [187]. Les médicaments anticancéreux à base de platine sont notamment le cisplatine [188], le carboplatine [189] et l'oxaliplatine [190] avec des effets thérapeutiques manifestes et des mécanismes d'action bien définis entraînant donc leur utilisation en clinique (Tableau 13). Le cisplatine en tant que première génération de médicaments anticancéreux possède des effets thérapeutiques sur de nombreuses tumeurs malignes telles que celles du sein, de l'ovaire ou colorectales [191], [192]. Néanmoins, le cisplatine est un médicament chimiothérapeutique non spécifique provoquant une toxicité systémique, en plus de tuer les cellules cancéreuses [193]. C'est pourquoi les médicaments anticancéreux à base de platine ont de graves effets indésirables en particulier la néphrotoxicité, neurotoxicité, l'ototoxicité et la myélosuppression [194]. De plus, l'utilisation à long terme du cisplatine entraîne de graves dommages aux tissus sains [195]. En raison de ces désavantages, diverses stratégies ont été mises au point, telles que l'encapsulation dans des liposomes [196], l'administration de médicaments par des porteurs de nanomatériaux

[197] et la bio-conjugaison ciblant des parties de protéines hautement exprimées au niveau des cellules tumorales [198].

En se basant sur le cisplatine, le carboplatine (médicament de deuxième génération) a été développé. Comparé au cisplatine, le carboplatine présente un taux d'hydratation inférieur en raison de la présence de l'acide cyclobutane dicarboxylique [199]. En raison de sa faible toxicité, le carboplatine peut être utilisé comme chimiothérapie à haute dose pour les tumeurs les plus agressives. Cependant, la résistance aux médicaments à base de platine est le principal problème de cette chimiothérapie. Le cisplatine et le carboplatine finissent par produire une résistance aux médicaments durant le traitement.

C'est pourquoi la troisième génération de médicaments à base de platine a été mise au point notamment par l'utilisation de l'oxaliplatine. Son mécanisme d'action est similaire à celui du cisplatine sans produire de résistance croisée avec le carboplatine ou le cisplatine. Par conséquent, l'oxaliplatine et le cisplatine peuvent être utilisés de façon simultanée dans le traitement anticancéreux [200]. Bien que de nombreux efforts aient été consacrés au développement de nouveaux médicaments à base de platine, aucun d'entre eux n'a atteint une application clinique à l'échelle mondiale.

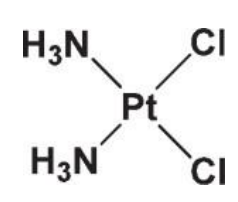
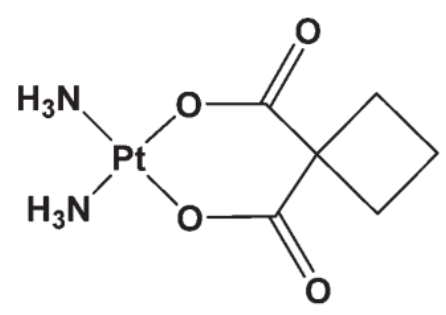
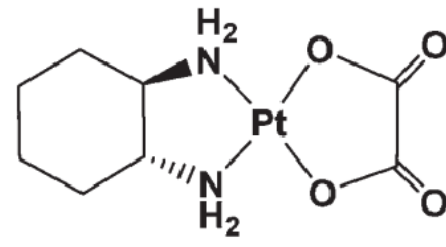
Génération	Molécule	Structure	Année et pays
Première	Cisplatine		1978 Japon et Italie
Seconde	Carboplatine		1986 Amérique
Troisième	Oxaliplatine		1996 France

Tableau 13 : Chronologie des trois générations de médicaments à base de platine et autorisation de mise sur le marché

IV.2.1. Mécanisme moléculaire du cisplatine

En tant que traitement anticancéreux à base de platine, le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine ainsi que d'autres médicaments sont largement utilisés en clinique avec des

effets thérapeutiques évidents et un mécanisme d'action clair [201]. Afin de pénétrer dans les cellules, il est généralement considéré que le cisplatine est d'abord transporté par le transporteur de cuivre 1 (CTR1). L'étape suivante correspond à une activation du complexe à base de platine par remplacement des chloro-ligands par des molécules d'eau ou d'autres petites molécules contenant des groupes sulfhydryles. Ce remplacement est déclenché par la concentration intracellulaire en ions chlorure (environ 4 mM) par rapport à la matrice extracellulaire (environ 100 nM) favorisant ainsi la transformation en hydrate cationique. Après une série de réactions chimiques dans le cytoplasme, le platine se lie à l'ADN en formant des liaisons modifiant ainsi la structure de l'ADN et causant des dommages [202] (Figure 46). Ces lésions de l'ADN peuvent bloquer le cycle cellulaire et induire l'apoptose dans les cellules tumorales à prolifération rapide [202].

Il est généralement admis que le principal mécanisme d'action anticancéreux du cisplatine est la liaison à l'ADN formant des liaisons intra et inter-brins. Cependant, il est supposé que seulement 1 à 10% du cisplatine pourrait pénétrer à l'intérieur du noyau et interagir avec l'ADN entraînant l'apoptose. Dans ce contexte, d'autres mécanismes d'action sont proposés tels que l'acidification du cytoplasme [203], le stress du récepteur des œstrogènes [204]...La découverte de mécanismes d'action susceptibles d'être affectés par le cisplatine permet d'envisager de nouvelles stratégies de traitement anticancéreux en utilisant de nouvelles cibles.

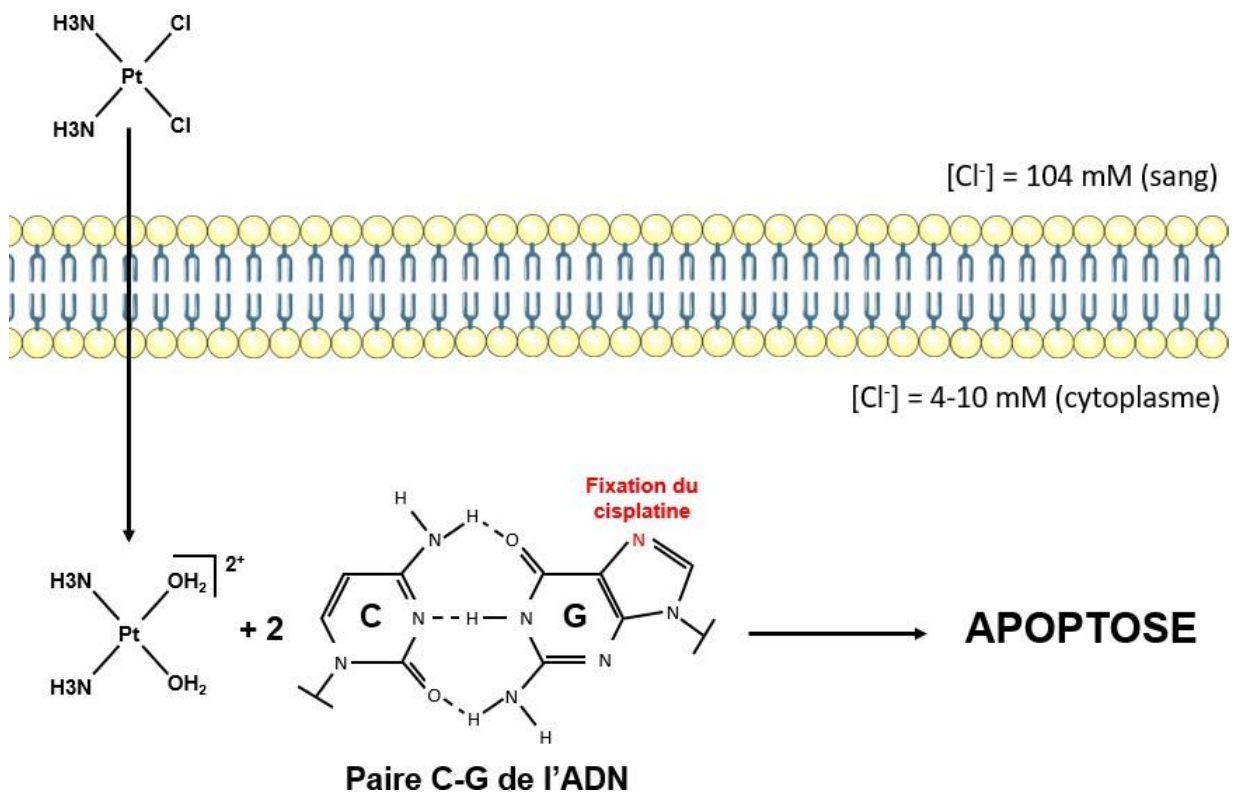


Figure 46 : Mécanisme d'action du cisplatine

IV.3. Une alternative au platine : le ruthénium

Dans la recherche d'agents anticancéreux contenant des métaux autres que le platine, les composés de ruthénium, éléments chimique ⁴⁴Ru (Ru) se sont avérés être les plus

prometteurs [205]. Le Ru a donc été considéré comme une alternative intéressante étant donné que de nombreux composés à base de Ru sont peu toxiques et que certains se sont révélés être sélectifs pour les cellules cancéreuses [206]. Cela provient probablement du fait de la capacité du Ru à être métabolisé comme le fer en se liant aux biomolécules. En effet, les cellules cancéreuses surexpriment les récepteurs de la transferrine afin de satisfaire la demande accrue en fer ; ainsi, les médicaments à base de Ru peuvent se lier au niveau de ces récepteurs et ainsi être délivrés plus efficacement aux cellules cancéreuses.

IV.3.1. Le ruthénium comme agent anticancéreux

En amont des premières études sur leur activité anticancéreuse il a été observé en 1976 que les complexes de Ru (III) *fac*-Ru(NH₃)₃Cl₃ induisaient une croissance filamenteuse des bactéries *E. coli* à la même concentration que la concentration requise en cisplatine pour obtenir le même effet [207]. Les premiers composés de Ru à avoir été étudiés pour leur activité anticancéreuse étaient des complexes chloro-amines. Le complexe Ru (III) *fac*-Ru(NH₃)₃Cl₃ ainsi que le complexe apparenté de Ru (II), le *cis*-Ru(NH₃)₄Cl₂ ont été évalués pour leurs propriétés anticancéreuses. Dans les années suivantes, de nombreux composés à base de Ru (II) et de Ru (III) ont été étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses. Il est admis que le Ru (II) se coordonne plus rapidement aux biomolécules [208], il a ainsi été suggéré que le Ru (III) serait réduit *in vitro* en Ru (II) [209]. Cela est rendu possible par la présence d'agents réducteurs tels que le glutathion au niveau des cellules, de plus, les cellules tumorales sont souvent hypoxiques et plus avides que les tissus normaux. Dans ce contexte, les complexes de Ru ont fait l'objet d'essais cliniques.

IV.3.1.1. NAMI-A

L'imidazolium - *trans* tétrachloro(diméthylsulfoxyde)imidazoleRu(III) de formule chimique (C₈H₁₅C₁₄N₄ORu(S)) aussi appelé NAMI-A est le premier composé antitumoral dérivé du Ru à être entré en essai clinique (Figure 47). NAMI-A est un composé non hygroscopique (absorbant l'humidité de l'air) ayant une bonne solubilité dans l'eau. Les propriétés et effets ainsi que les mécanismes d'action de NAMI-A sont les suivants :

- Contrôle des métastases

Grâce à une limitation de l'adhésion dépendante de l'actine *in vitro* [210]. Mais également grâce à un effet anti-invasif *in vitro* et *in vivo* : NAMI-A augmente la matrice extracellulaire autour des cellules tumorales et du système vasculaire tumoral et se lie au collagène tout en stimulant sa production [211]. De plus, NAMI-A inhibe l'effet angiogénique induit par le VEGF *in vitro* lui conférant des effets anti-angiogéniques [212]. Il va également bloquer transitoirement la progression du cycle cellulaire *in vitro* en phase G2M [213].

- Liaison à l'ADN

Par association intra-brin, NAMI-A peut se fixer au niveau de l'ADN. Néanmoins, cette association est nettement inférieure à celle du cisplatine. Bien que l'effet cytotoxique du NAMI-A (contrairement au cisplatine) ne soit pas remarquable (environ 1000 fois moins) [214], la cytotoxicité a bien été corrélée à la liaison à l'ADN (tout comme le cisplatine).

Ce composé a passé avec succès la première phase des essais clinique notamment dans le cas du cancer du poumon [215].

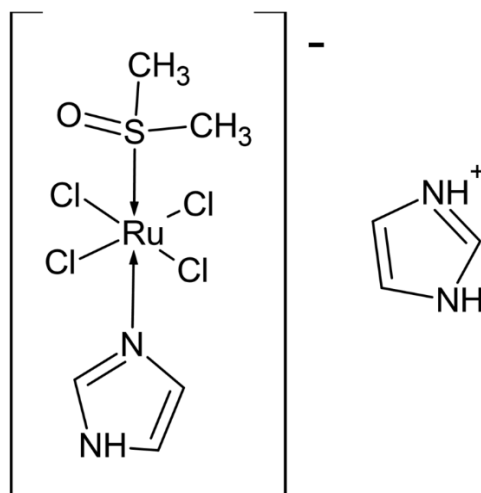


Figure 47 : Structure du NAMI-A.

IV.3.1.2. KP1019

L'indazolium *trans*-[tétrachlorobis(1*H*-indazole)ruthénate (III)] de formule chimique $C_{21}H_{19}Cl_4N_6Ru$ aussi appelé KP1019 est le deuxième composé antitumoral dérivé du Ru à être utilisé en essai clinique (Figure 48). Il présente, quant à lui, une activité contre un certain nombre de modèles de tumeurs précliniques, notamment contre les carcinomes colorectaux et les cancers primaires de tumeurs humaines explantées [216].

KP1019 induit l'apoptose de lignées cellulaires cancéreuses colorectales (SW680 et HT29) par la voie mitochondriale, via la chute du potentiel membranaire [217], [218]. Ainsi, il a été observé une activation de la caspase-3, 4 heures après ajout du complexe mais également la formation de corps apoptotiques dans les 6 à 8 heures après ajout du complexe. La mort cellulaire induite par KP1019 est indépendante du statut de p53 des cellules tumorales, ce qui suggère que les cassures au niveau des brins de l'ADN ne constituent pas les dommages majeurs [219]. Lors d'étude clinique de phase I, KP1019 n'a provoqué aucun effet secondaire [220], ces résultats prometteurs en font ainsi un complexe d'intérêt.

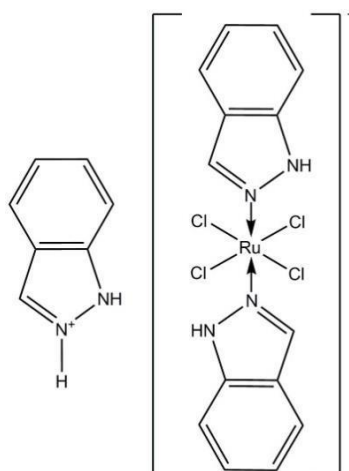
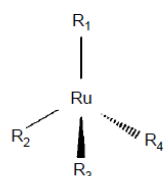


Figure 48 : Structure du KP1019.

IV.3.2. Les complexes arène-ruthénium dans le traitement anticancéreux

Les complexes arène-Ru (II) peuvent présenter des propriétés hydrophiles et hydrophobes et devraient avoir des effets additifs ainsi que synergiques. Les complexes offrent de nombreux modes d'interactions avec les biomolécules à l'intérieur des cellules ce qui contribue à leur bon potentiel pour le développement de médicaments anticancéreux. Les équipes de Dyson et Sadler ont été les pionniers dans l'utilisation des complexes arènes-Ru dans le traitement anti-métastatique.

Les travaux de l'équipe de Sadler ont porté sur une série de composés arène-Ru (Figure 49) *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de cancer de l'ovaire [221]. Des résultats prometteurs permettent d'observer une diminution de la toxicité *in vivo* ainsi qu'une non-résistance croisée dans les modèles résistants au cisplatine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [222]. Ceci permet donc de justifier le développement de ces nouveaux groupes de complexes métalliques.



COMPOUND	R1	R2	R3	R4
RM100	p-cymene	Cl	CH ₃ CN	CH ₃ CN
RM101	p-cymene	Br	CH ₃ CN	CH ₃ CN
RM114	p-cymene	Cl	Cl	isonicotinamide
RM116	p-cymene	Cl	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
RM118	C ₆ H ₆	I	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
RM119	C ₆ H ₆	Cl	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
RM121	p-cymene	I	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
RM125	C ₆ H ₅ CO ₂ CH ₃	Cl	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
RM168	C ₆ H ₅ CO ₂ CH ₂ CH ₃	Cl	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
RM175	C ₆ H ₅ C ₆ H ₅	Cl	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
HC11	Tetrahydroanthracene	Cl	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂	
HC27	Dihydroanthracene	Cl	H ₂ N(CH ₂) ₂ NH(CH ₂ CH ₃)	
HC29	C ₆ H ₅ C ₆ H ₅	Cl	H ₂ N(CH ₂) ₂ NH(CH ₂ CH ₃)	

Figure 49 : Nouveaux complexes organométalliques à base de Ru utilisés par l'étude de l'équipe de Sadler.

Source : [223]

L'équipe de Dyson a quant à elle synthétisée une série de complexe arène-Ru utilisant le 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (pta) comme ligand et les a appelé RAPTA pour Ru arène pta [224] (Figure 50). Ces complexes ont été testés biologiquement, et l'un d'entre eux s'est particulièrement démarqué : il s'agit de RAPTA-C de formule chimique brute (η^6 -*p*-MeC₆H₄Pr')Ru(pta)Cl₂. Plus récemment, en 2008, Dyson et ses collaborateurs ont synthétisés et caractérisés une nouvelle série de complexes d'adduit du RAPTA qui se sont révélés

hautement cytotoxiques pour les cellules cancéreuses ovariennes humaines (A2780) et pulmonaires (A549) connues pour être insensibles à de nombreux agents chimiothérapeutiques [225].

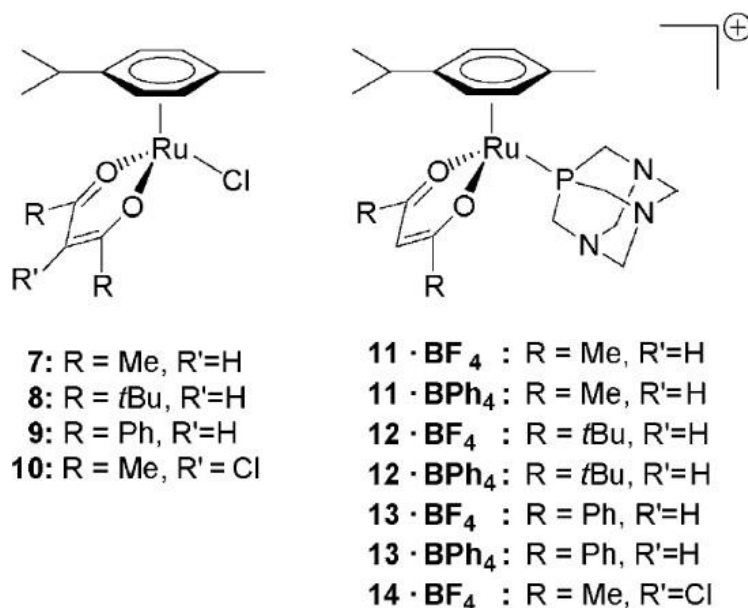


Figure 50 : Structures des complexes à base de Ru utilisés par l'équipe de Dyson.

Source : [226]

IV.3.2.1. RM175

De formule chimique brute $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{Ph})\text{Ru}(\text{N,Nen})\text{Cl}]^+$ (en = 1,2-ethylenediamine) (Figure 51) où le substituant arène facilite l'entrée du complexe au sein des cellules en raison de sa nature hydrophobe, il se lie à la guanine N7 de l'ADN. Plusieurs études ont eu lieu pour déterminer le mécanisme lié à la nature anti-métastatique de ce complexe, permettant ainsi la découverte de nouvelles cibles cellulaires potentielles. En plus de sa liaison à l'ADN, il inhibe la métalloprotéinase-2, entraînant ainsi la suppression du système immunitaire adaptatif, la dégradation de la matrice extracellulaire facilitant ainsi l'invasion et la progression des cellules tumorales [227]. Lors d'une étude sur le carcinome mammaire, il a été observé une réduction significative des métastases en présence de RM175 [228].

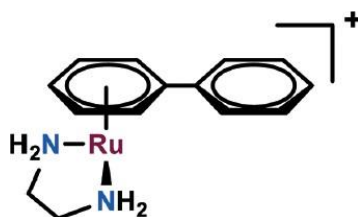


Figure 51 : Structure du RM175.

IV.3.2.2. ONCO4417

Provenant de la substitution de l'ion chlorure du RM175 par l'anion hexafluorophosphate PF₆, il a montré des activités anti-néoplasiques et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M. Ce complexe tend à avoir la même efficacité que le cisplatine

sur de nombreuses lignées cellulaires d'origine ovarienne, pulmonaire, œsophagienne, pancréatique ou encore colorectale. Cependant, il a également démontré une efficacité contre des lignées cellulaires résistantes au cisplatine, telles que la lignée A2780cisR, suggérant que ce complexe ne partage pas de mécanisme croisé avec le cisplatine [222].

IV.3.2.3. Les ruthplatines

Ce sont des médicaments bimétalliques (Figure 52) conçus pour traiter les métastases tumorales. Ces molécules sont solubles dans l'eau et ont été évaluées sur des modèles tumoraux 2D et 3D [229]. Il a été constaté une activité cytotoxique au niveau de lignées résistantes au cisplatine (A2780cisR et A549cisR). Il a également été observé une efficacité significative de ces complexes dans un modèle sphéroïde 3D dans le traitement du cancer du sein (MCF-7), où le nombre de cellules mortes était significativement plus élevé dans le cas du traitement aux ruthplatines. La cytotoxicité de ces complexes peut être attribuée à l'arrêt du cycle cellulaire en phase S.

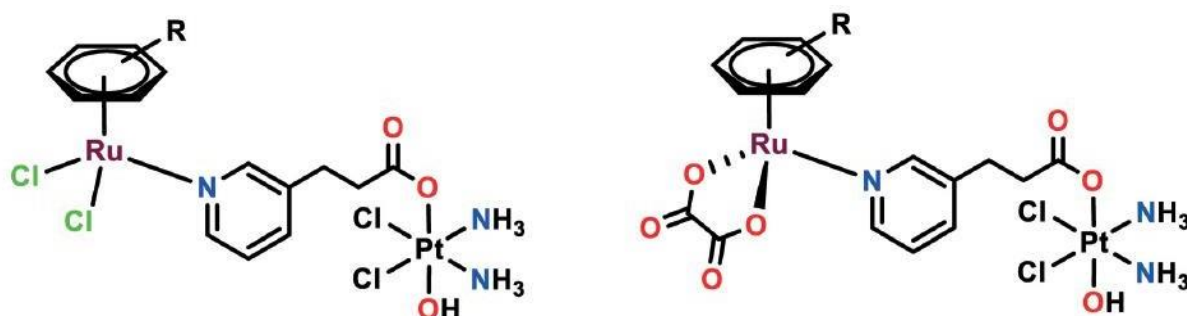


Figure 52 : Structure de deux ruthplatines.

IV.3.3. Complexe arène-Ru (II) en essais cliniques

TLD-1433

Aussi appelé Rovidar, il s'agit d'un complexe de coordination métallique non-macrocyclique et non pyrrolique (Figure 53), unique dans son activité et son mécanisme de photosensibilisation, faisant actuellement l'objet d'études cliniques. Il est étudié notamment pour le traitement du cancer de la vessie non invasif par PDT [230]. Celui-ci a déjà fait l'objet d'une étude clinique de phase Ib sur des patients atteints de cancer de la vessie non invasif sur le plan musculaire n'ayant pas répondu précédemment au traitement par le Bacillus Calmette Guérin. Lors de cette étude, 67% des patients ont présenté une réponse complète c'est-à-dire une absence de présence, de récurrence ou de progression de leur cancer de la vessie 18 mois après un unique traitement avec le TLD-1433.

Ces résultats plus que prometteurs ont ainsi permis le début d'une étude clinique de phase II en septembre 2019 [230]. L'objectif principal est de traiter 100 à 125 patients atteints de cancer de la vessie non invasif sur le plan musculaire. Le deuxième objectif de cette étude est de mesurer la durée de réponse complète.

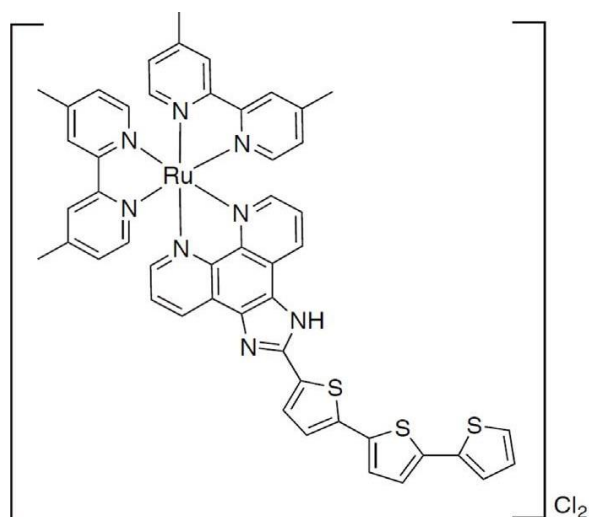


Figure 53 : Structure du TLD-1433.

IV.3.4. Les complexes arène-ruthénium en tant que vecteurs pour le transport intracellulaire de PS

L'utilisation de complexes arène-Ru en tant que vecteurs de PS repose sur le principe des complexes « hôte-invité », où la formation d'assemblage métallique prend le rôle d'hôte. Une attention toute particulière a été donnée aux complexes arène-Ru ceux-ci étant stables et solubles dans les solvants organiques ainsi que l'eau permettant leur utilisation pour des applications biologiques. La stratégie utilisée par l'équipe de Neuchâtel (Suisse) avec laquelle nous collaborons a été d'utiliser des clips métalliques dinucléaires afin de synthétiser des complexes arène-Ru. La formation des complexes arène-Ru repose sur l'utilisation de deux blocs :

- Le clip (complexe bimétallique arène-Ru) pouvant être considéré comme les bords de la cage. Les deux atomes de Ru sont séparés par un ligand espaceur tétradenté permettant d'établir la distance entre eux et ainsi la taille de la cage métallique (Figure 54).

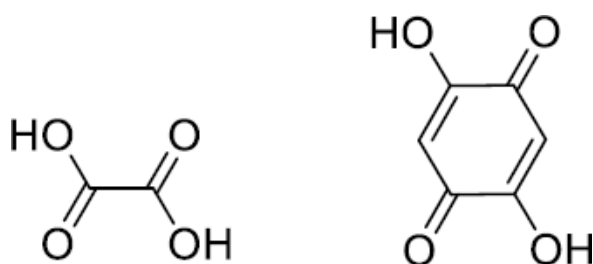


Figure 54 : Complexes bimétalliques utilisés en tant que clips.
A gauche : acide oxalique et à droite : 2,5-dioxydo-1,4-benzoquinone.

- Le ligand aussi appelé panel formant la cage (en haut et en bas de la cage). Des ligands triangulaires ou cubiques ont été utilisés formant ainsi des cages triangulaires ou cubiques (Figure 55).

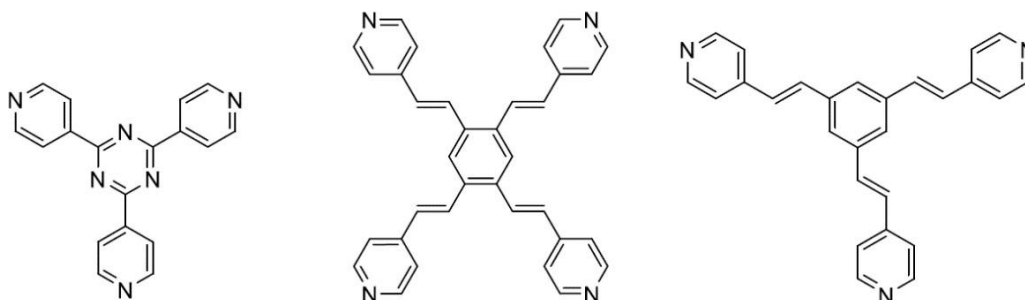


Figure 55 : Ligands ou panels utilisés afin de donner naissance à des cages prismatiques ou cubiques.

A gauche : 2,4,6-tri(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine, au centre : 1,2,4,5-tétrakis{2-(pyridine-4-yl)vinyl}benzène (non utilisée au sein de cette thèse), à droite : 1,3,5-tris{2-(pyridine-4-yl)vinyl}benzène.

Dans ce cas de figure, les cages métalliques contiennent une cavité interne de nature hydrophobe (Figure 56). Si un composé à caractère hydrophobe est ajouté au niveau du mélange « réactionnel » en même temps que le panel, cet invité (tant que sa structure et sa taille le permettent) se retrouve par affinité dans la cavité. Cette stratégie permet d'héberger des PS peu solubles à l'intérieur de cages arène-Ru s'apparentant à un « cheval de Troie » moléculaire. Au cours des travaux de thèse réalisés par Manuel Gallardo-Villagrán [231], il a été vérifié que les PS se situaient bien dans la cavité intérieure des cages métalliques.

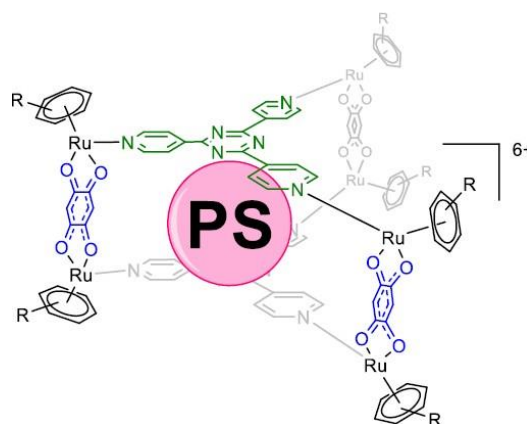


Figure 56 : Cage arène-Ru prismatique contenant un PS à l'intérieur de sa cavité.

Une autre possibilité est de construire des cages arène-Ru dans lesquelles les PS font partie de la structure même de la cage, en utilisant le PS lui-même comme panel (Figure 57). Le PS contenant des substituants pyridiniques pourra ainsi être coordonné aux atomes de Ru de la même manière que les panels triangulaires et carrés vu précédemment. Dans ce cas-ci, les systèmes de vectorisation contiennent 2 PS comme panels par cage, c'est pourquoi leurs concentrations de traitement pourront être réduites, donc une réduction de la dose nécessaire pour une même activité et efficacité en PDT par rapport à d'autres traitements [232], [233].

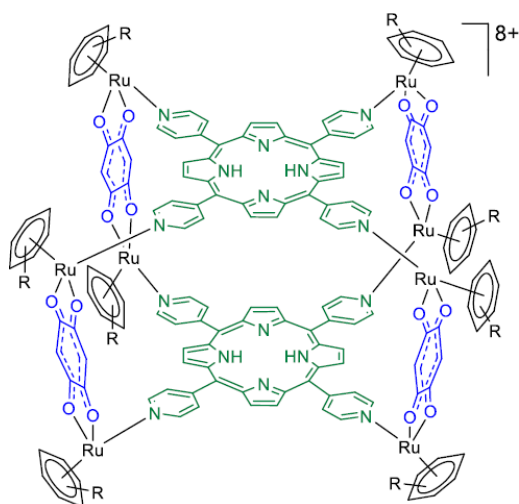


Figure 57 : Cage arène-Ru cubique utilisant le (5,10,15,20-tétra(4-pyridyl)-21H,23H-porphine) comme panel.

Plusieurs études préalables ont mis en évidence que la mauvaise solubilité de certains PS pouvait être contournée en utilisant ces cages arène-Ru comme transporteurs [234], [235]. Une autre étude a démontré l'efficacité cytotoxique dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde avec des IC_{50} de l'ordre du nanomolaire [235]. Dans le cas de traitement antitumoral, deux cages arène-Ru ont présentées une phototoxicité contre les cellules de mélanome et du cancer de l'ovaire [236].

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés aux deux types de cages décrites précédemment, en utilisant soit une cage prismatique contenant la 21H, 23H-porphine (**Por**), la Mg(II)-porphine (**Mg-Por**), la 29H,31H phthalocyanine (**Pc**) et la Zn(II)-phthalocyanine (**ZnPc**) au sein des cavités de deux cages prismatiques utilisant les clips précédemment cités (Figure 53) ; ou une cage cubique ayant 2 PS faisant partie de sa structure : la 5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**TPyP**), la Zn(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**Zn-TPyP**) ou la Co(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**Co-TPyP**) comme panel.

Afin d'évaluer l'influence de la présence de métaux, il a été introduit au centre de l'anneau tétrapyrrolique des TPyP du Zn^{2+} ou du Co^{2+} afin de vérifier si la phototoxicité des PS était modifiée (Figure 58) ; de même au sein d'une cage prismatique avec ajout de Mg^{2+} ou de Zn^{2+} (Figure 59).

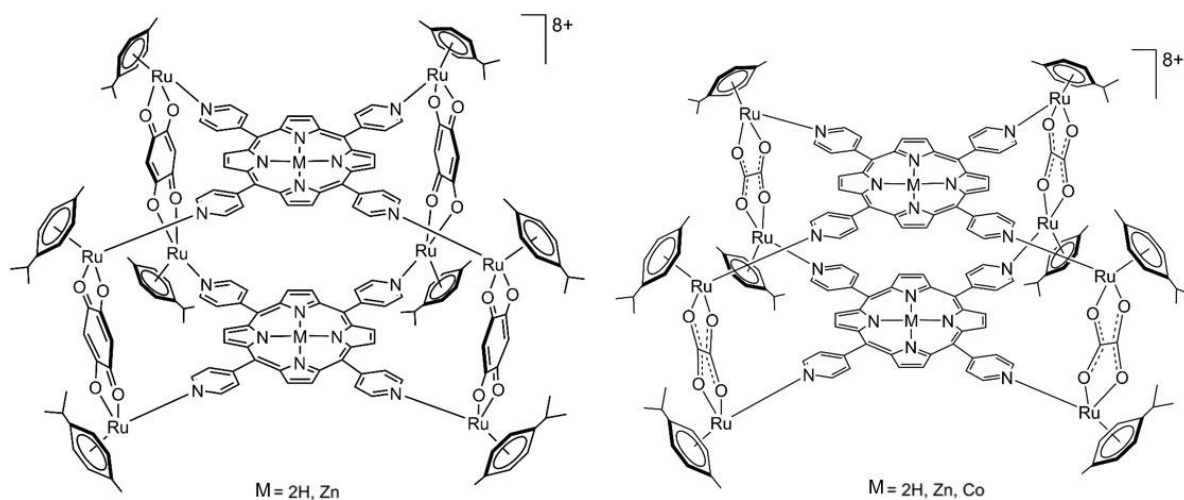


Figure 58 : Cages arène-Ru cubiques contenant de la TPyP (2H), du Zn-TPyP ou du Co-TPyP

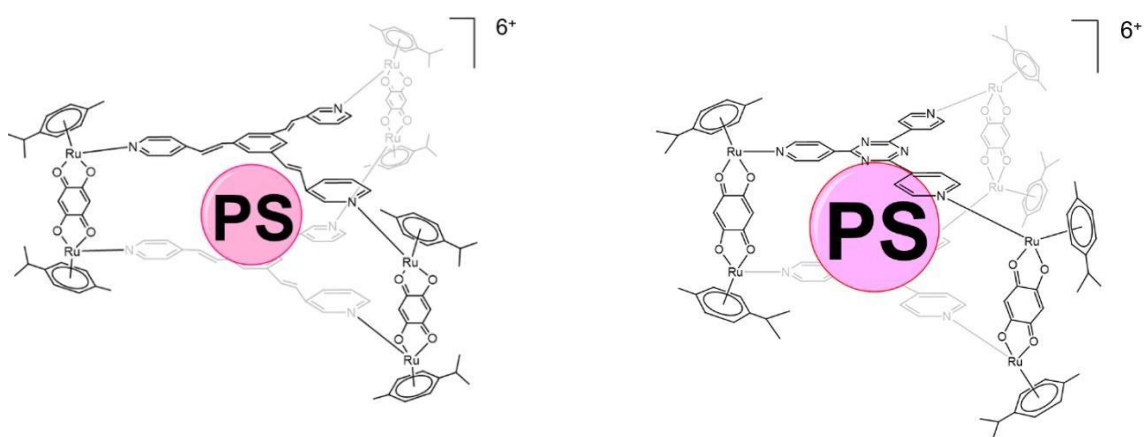


Figure 59 : Cages arène-Ru prismatiques contenant de la Por, Pc ou ZnPc à droite ou de la Por et Mg-Por à gauche

Objectifs de thèse

Comme vu précédemment, le CaP constitue un problème majeur de santé publique. La persistance d'effets secondaires dans les traitements actuels favorise le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Ainsi notre équipe a porté son intérêt sur la PDT. Les PS les plus utilisés à l'heure actuelle sont les dérivés tétrapyrroliques tels que les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines ou encore les phthalocyanines. Néanmoins, l'un des problèmes majeurs de la majorité des PS utilisés est leur absence de solubilité dans l'eau et les milieux biologiques limitant de ce fait leur utilisation en clinique. La vectorisation de ces PS permet donc de pallier ce problème et d'améliorer la distribution des PS au niveau des cellules tumorales. Pour ce faire notre stratégie repose sur l'utilisation de complexes ou cages arène-Ru synthétisés à l'Université de Neuchâtel (Suisse) par nos collaborateurs ayant été impliqués dans le projet européen Polythéa. Deux configurations sont visibles au sein de cette thèse : le PS pourra être encapsulé à l'intérieur de la cage arène-Ru ou faire partie intégrante de celle-ci. Ce projet de thèse a étudié l'effet de ces complexes afin de traiter le CaP. Dans cette étude plusieurs PS ont été utilisés : 21H, 23H-porphine (**Por**), Mg(II)-porphine (**Mg-Por**), 5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**TPyP**), Zn(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**Zn-TPyP**), Co(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**Co-TPyP**), 29H,31H phthalocyanine (**Pc**) et la Zn(II)-phthalocyanine (**Zn-Pc**).

Le but de ces travaux de recherche a été d'évaluer l'efficacité *in vitro* de ces nouveaux PS vectorisés dans le traitement antitumoral. L'objectif principal a donc été de déterminer la cytotoxicité de ces différents composés par PDT sur 2 lignées de CaP non hormonodépendant : DU145 et PC-3. Le second objectif a été de démontrer l'influence du métal sur la photoactivité des PS, en examinant la présence de métaux paramagnétiques (Co^{2+}) ou diamagnétiques (Zn^{2+} ou Mg^{2+}) au centre de l'anneau tétrapyrrole des différents PS utilisés. Par la suite, la démarche a été de comprendre par quel processus de mort cellulaire les composés induisaient leurs effets.

Résultats

V.1. Article 1

Evaluation of ruthenium-based assemblies as carriers of photosensitizers to treat rheumatoid arthritis by photodynamic therapy

Manuel Gallardo-Villagrán, **Lucie Paulus**, Jean-Louis Charissoux, Sylvain Sutour , Pascale Vergne-Salle, David Yannick Leger, Bertrand Liagre, and Bruno Therrien

Pharmaceutics **2021**, *13*, 2104 ; doi.org/10.3390/pharmaceutics13122104

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune inflammatoire chronique des articulations. Elle entraîne des lésions du cartilage et des os ou encore une invalidité. Celle-ci touche aussi bien les hommes que les femmes bien que la prévalence pour celle-ci soit 3 fois plus élevée. Il est désormais établi, que de nombreuses composantes environnementales et épigénétiques interviennent dans le développement de la PR. Bien que de nombreux progrès thérapeutiques aient eu lieu au cours des dernières années, les objectifs de rémission ou à minima une faible activité de la maladie ne sont pas toujours atteints. C'est pourquoi de nouveaux traitements locaux doivent être développés. C'est donc tout naturellement que l'attention s'est portée sur la thérapie photodynamique (PDT), permettant de soulager la douleur ou l'invalidité causée par la PR. Les cages arène-Ru synthétisés au sein de l'équipe de Neuchâtel (Suisse) ont donc été utilisées afin de vectoriser différents PS.

Les différents travaux présentés ici ont donc consisté à démontrer l'efficacité de ces complexes arène-Ru couplés aux PS *in vitro* sur des synoviocytes isolés à partir de biopsies de patients atteints de PR ayant subi une arthroplastie des doigts, des mains ou encore de la hanche. Une première étude a ainsi permis de tester différentes cages prismatiques et leur cytotoxicité sur les synoviocytes. Sur les 15 composés testés, seuls 3 utilisant la ZnPc comme PS, ont présenté une cytotoxicité à l'obscurité ne les rendant pas utilisables en PDT. Globalement, la plupart des composés utilisés ont démontré une cytotoxicité *in vitro* après irradiation. Les synoviocytes produisent un taux élevé de cytokines comme l'interleukine (IL)-1 responsables de la réponse inflammatoire. L'IL-1 induit l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) à l'origine de la production de prostaglandine E₂ (PGE₂) corrélée à une inflammation localisée. L'utilisation des composés testés en PDT a montré une augmentation de l'expression et de l'activité de COX-2 et PGE₂. Néanmoins, les concentrations en IL-1 après photoactivation étaient inchangées par rapport au témoin. La surexpression de COX-2 provient sûrement de l'implication d'autres cytokines. La majorité des complexes testés ayant entraîné une diminution de la viabilité cellulaire après photoactivation, notre stratégie de vectorisation semble prometteuse dans le traitement de la PR par PDT.

Article

Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy

Manuel Gallardo-Villagrán ^{1,2}, Lucie Paulus ², Jean-Louis Charissoux ³, Sylvain Sutour ⁴,
Pascale Vergne-Salle ⁵, David Yannick Leger ², Bertrand Liagre ^{2,*} and Bruno Therrien ^{1,*}

- ¹ Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland; manuel.gallardo@unine.ch
 - ² Laboratoire PEIRENE EA 7500, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, 87025 Limoges, France; lucie.paulus@etu.unilim.fr (L.P.); david.leger@unilim.fr (D.Y.L.)
 - ³ Service d'Orthopédie-Traumatologie, CHRU Dupuytren, 2 Avenue Martin Luther King, CEDEX, 87042 Limoges, France; jlouis.charissoux@chu-limoges.fr
 - ⁴ Neuchâtel Platform for Analytical Chemistry (NPAC), University of Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland; sylvain.sutour@unine.ch
 - ⁵ Service de Rhumatologie, CHRU Dupuytren 2, 16 rue Bernard Descottes, CEDEX, 87042 Limoges, France; pascale.vergne-salle@chu-limoges.fr
- * Correspondence: bertrand.liagre@unilim.fr (B.L.); bruno.therrien@unine.ch (B.T.)
† These authors contributed equally to the work.



Citation: Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.-L.; Sutour, S.; Vergne-Salle, P.; Leger, D.Y.; Liagre, B.; Therrien, B. Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2104. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122104>

Academic Editor: Mihaela Trif

Received: 1 November 2021
Accepted: 3 December 2021
Published: 7 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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/>).

Abstract: For the first time, ruthenium-based assemblies have been used as carriers for photosensitizers in the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy (PDT). These metallacages are totally soluble in physiological media and can transport photosensitizers (PS) in their cavity. After an incubation period, the PS is released in the cytoplasm and irradiation can take place. This strategy allows photosensitizers with low or null solubility in biological media to be evaluated as PDT agents in rheumatoid arthritis. The systems in which 21H,23H-porphine and 29H,31H-phthalocyanine are encapsulated show excellent photocytotoxicity and no toxicity in the dark. On the other hand, systems in which metalated derivatives such as Mg(II)-porphine and Zn(II)-phthalocyanine are used show good photocytotoxicity, but to a lesser extent than the previous two. Furthermore, the presence of Zn(II)-phthalocyanine significantly increases the toxicity of the system. Overall, fifteen different host-guest systems have been evaluated, and based on the results obtained, they show high potential for treating rheumatoid arthritis by PDT.

Keywords: rheumatoid arthritis; photodynamic therapy; drug delivery; host-guest system; COX-2; photosensitizer; arene ruthenium complexes

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune joint disease, leading to cartilage and bone damage, and finally disability. Occasionally, RA is complicated with extra-articular manifestations, particularly pulmonary involvement, and is associated with cardiovascular comorbidities [1]. The prevalence is 0.3% to 1%, and is 2–3 times higher in women than in men [2].

In recent years, it has become evident that RA arises based on both genetic and epigenetic components, but also has an environmental component, such as cigarette smoke, dust exposure, and particularly the effect of the microbiome [3]. Abnormalities in the cellular and humoral immune response lead to the occurrence of autoantibodies, detected many months or years before the clinical disease is apparent. These autoantibodies are rheumatoid factors (directed against the Fc fragment of immunoglobulins) and anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) [4,5].

In RA, the synovial lining, which normally is comprised of 1–3 cell layers, becomes remarkably thickened. This is due to an invasion of macrophage-like cells and the proliferation of resident synovial fibroblasts. The degree of synovial hyperplasia correlates with the severity of cartilage erosion, resulting in inflammatory pannus formation that attaches to, and invades, joint cartilage, while osteoclast activation leads to parallel bone destruction [6]. The interaction between synovial resident cells and cells of the innate and adaptative immune system leads to the production of many pro-inflammatory cytokines (TNF- α , interleukine-1 (IL-1), IL-6), proteolytic enzymes, and inflammatory molecules [1].

Treatment algorithms involve measuring disease activity with composite indices and applying a treatment-to-target strategy, with disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) to maintain stringent remission or at least low disease activity and reduce articular destruction and disability [7]. There are two major classes of DMARDs, namely synthetic (sDMARDs) and biological (bDMARDs) [8].

Despite all of the advances made over the last two decades, and given that remission or at least low disease activity are the current therapeutic goals for RA patients, a significant proportion of patients still do not reach this target. There is a need for new treatments or local treatments to control some resistant synovitis.

In recent years, promising results have been achieved using non-invasive treatments such as anti-tumor necrosis factor drugs [9], Janus kinase inhibitors [10], and photodynamic therapy (PDT) [11]. The latter involves a photoactive compound, termed the photosensitizer (PS), which is excited by suitable light radiation. Subsequently, the excitation energy gives rise to radical oxygen species (ROS) from oxygen present in the medium [12,13]. ROS show a high cytotoxicity, but also a short lifetime and reduced radius of action [14], so it is possible to treat the inflamed zone without affecting the surrounding tissue, avoiding damage to healthy structures. Accordingly, PDT could be an effective solution for cases of RA with refractory synovitis and failure of local steroid injection.

Since the late 1990s, PDT began to demonstrate its potential as a less invasive treatment for RA. Trauner and colleagues [15] reported the *in vivo* efficacy of this technique in rabbits with an antigen-induced arthritis model, using benzoporphyrin derivative monoacid ring A (one of the first-generation PSs) and intra-articular irradiation. Later, with the new generation PSs, *in vivo* results remained promising, such as the use of ATX-S10.Na (II) in collagen antibody-induced arthritis in mice [16]. Recently, it has been reported that the combined use of photothermal therapy and PDT using Cu₇S₄ nanoparticles under NIR laser in mice, improves anti-inflammatory effects and reduces cartilage and bone damage [17].

The simplicity of the technique makes PDT an ideal treatment to alleviate the pain or disability caused by RA. Unfortunately, even considering the enormous potential of PDT, conventional PSs often have some drawbacks mainly related to their chemical and structural features, as well as undesirable side effects in some cases, such as light hypersensitivity [18]. Most recent studies have focused on solving the poor solubility of PSs in biological media using soluble carriers [19] such as nanoparticles or by adding a soluble functional group in the PS structure [20]. We believe that it may be possible to solve the poor water solubility of PSs using another approach: ruthenium-based carriers (Figure 1). These organometallic complexes are soluble in biological media and have an inner cavity in which a PS can be lodged. Such metallacages have already been tested *in vitro* on cancer cells, demonstrating their potential in cells [21,22].

For the first time, we showed that such carriers can be used as PDT agents in fibroblast-like synoviocyte cells (FLS) from RA patients. We also demonstrated that commercially available PSs (Figure 2), namely 21*H*,23*H*-porphine (G1), Mg(II)-porphine (G2), 29*H*,31*H*-phthalocyanine (G3), and zinc(II)-phthalocyanine (G4), can be encapsulated in the cavity of the metallacages and, after being released, become effective PSs against RA. We have hosted these basic PSs in different ruthenium-based assemblies, showing the importance of the carrier in delivering the PS. The *in vitro* evaluation of these PS-metallacages in

human RA FLS cells is promising. The anti-proliferative assays are excellent, providing new avenues for the treatment of RA by PDT.

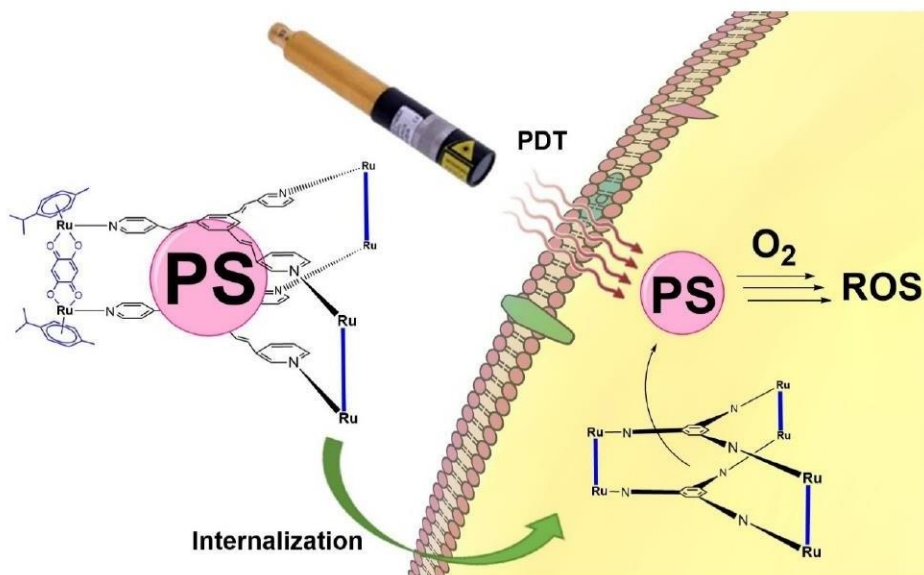


Figure 1. Typical ruthenium-based assemblies used as PS carrier for cellular internalization and subsequent activation of PS by irradiation, giving rise to ROS.

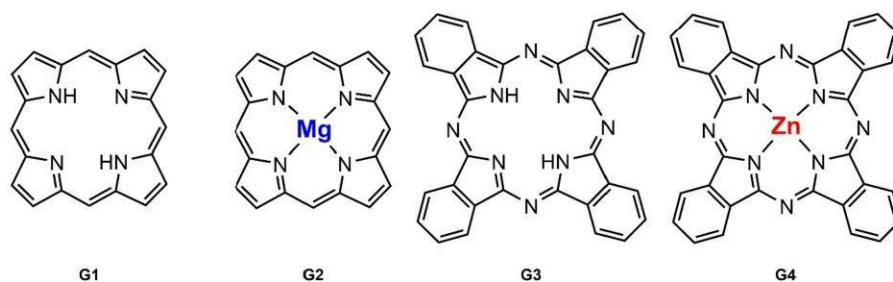


Figure 2. Photosensitizers used in this work. From left to right, 21H,23H-porphine (G1), Mg(II)-porphine (G2), 29H,31H-phthalocyanine (G3) and Zn(II)-phthalocyanine (G4).

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of Compounds

Despite the fact that the hosts **M1–M6** (Figure 3) and the guests **G1–G4** are known, several host–guest systems are new, except for **G1**⊂**M2**, **G1**⊂**M3**, **G2**⊂**M1**, **G2**⊂**M4**, and **G2**⊂**M6**. The complexes $[\text{Ru}_2(p\text{-cymene})_2(2,5\text{-dioxido-1,4-benzoquinonato})\text{Cl}_2]$, $[\text{Ru}_2(p\text{-cymene})_2(5,8\text{-dioxido-1,4-naphthoquinonato})\text{Cl}_2]$, $[\text{Ru}_2(p\text{-cymene})_2(6,11\text{-dioxido-5,12-naphthacenedionato})\text{Cl}_2]$ [23], and the ligands 2,4,6-tris(pyridin-4-yl)-1,3,5-triazine [24], 1,3,5-tris[2-(pyridin-4-yl)vinyl] benzene [25], and 1,2,4,5-tetrakis[2-(pyridine-4-yl)vinyl] benzene [26] were prepared following reported methods. The metallacages **M1** and **M4** with **G1** inside [21], **M4** with **G3** and **G4**, **M5** and **M6** with **G1**, **G3**, and **G4** [27] were

synthesized according to the literature. The photosensitizers **G1** and **G2** were synthesized as reported in the literature [28], while **G3** and **G4** were bought from Sigma-Aldrich. Dichloromethane, diethyl ether, methanol, *d*₃-acetonitrile, and *d*₆-DMSO were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. NMR spectra were measured on a Bruker Avance Neo Ascend 600 MHz spectrometer. The acquired spectra were processed using the Mnova NMR software package (v.14.2.0, MestReLab Research, Santiago de Compostela, Spain). The ¹H and ¹³C resonances of the deuterated solvents were used as internal references. The following abbreviations are used for describing the signals in the NMR spectra: s (singlet), d (doublet), m (multiplet), br (broad), q (quaternary). All described in vitro experiments were carried out under aseptic conditions. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and L-glutamine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was bought from Acros Organics (Geel, Belgium). All solvents, reagents, and products described above were used without prior treatments or purifications. IR spectra of the compounds were performed on a Frontier Perkin Elmer spectrometer (600–4000 cm⁻¹), Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. Fluorescence spectra were performed on a FLS980 spectrometer from Edinburgh instruments (550–800 nm) using 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (TPP) as an internal reference in toluene and the compounds were dissolved in DMSO (10 nM concentration). UV-vis spectra were acquired on a SI Analytics model UvLine 9400 (Xenon lamp) spectrophotometer, using 1.5 mL polystyrene cuvettes (wavelength range 280–800 nm) and diluting the compounds in DMSO (10 μM and 10 nM).

Synthesis of G1C M2. In a 250 mL round bottom flask, 50.0 mg (0.069 mmol) of [Ru₂(*p*-cymene)₂(5,8-dioxydo-1,4-naphthoquinonato)Cl₂] and 35.5 mg (0.138 mmol) of AgCF₃SO₃ were dissolved in 20 mL of MeOH and stirred for 2 h at room temperature. Next, silver chloride was filtered off. To the remaining solution, 14.6 mg (0.046 mmol) of 2,4,6-tri(pyridin-4-yl)-1,3,5-triazine and 7.1 mg (0.023 mmol) of **G1** were added, and the solution was refluxed and stirred for 18 h. The solvent was then removed at reduced pressure, and the resulting oily, dark green solid was dissolved in 20 mL of CH₂Cl₂. The solution was concentrated to approximately 3 mL, and 5 mL of Et₂O was added dropwise. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum. Yield 52% (45 mg). ¹H NMR (CD₃CN, 25 °C, 600 MHz): δ 9.17 (d, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 12H, CH_{naphce}), 8.44 (d, ³J_{HH} = 4.1 Hz, 12H, CH_{naphce}), 8.24 (d, ³J_{HH} = 6.3 Hz, 12H, CH_{py}), 8.00 (s, 4H, CH_{porphine}), 6.89 (s, 8H, CH_{porphine}), 5.91 (d, ³J_{HH} = 6.4 Hz, 12H, CH_{py}), 5.87 (d, ³J_{HH} = 5.9 Hz, 12H, CH_{cym}), 5.57 (d, ³J_{HH} = 5.8 Hz, 12H, CH_{cym}), 2.95 (m, 6H, CH_{iPr}), 1.97 (overlapped singlet, 18H, CH₃), 1.32 (d, ³J_{HH} = 7.0 Hz, 36H, CH_{3iPr}). ¹³C NMR (CD₃CN, 25 °C, 150 MHz): δ 170.4 (C-O), 164.3 (C_q), 152.1 (CH_{py}), 140.7 (C_q), 134.6 (CH_{naphce}), 130.1 (CH_{porph}), 128.4 (CH_{naphce}), 122.8 (C_q), 122.3 (CH_{py}), 120.7 (C_q), 107.9 (C_q), 104.4 (C_{cym}), 103.3 (CH_{porph}), 100.3 (C_{cym}), 84.9 (CH_{cym}), 83.0 (CH_{cym}), 31.0 (CH_{iPr}), 22.0 (CH_{3iPr}), 17.3 (CH₃). ESI-MS, m/z, 1120 [M₂+G1-3OTf]³⁺. UV/vis (DMSO), λ, nm (ε, M⁻¹·cm⁻¹): 454 (132400), 488 (117700), 567 (54300), 648 (62900). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν; br s (3700–3100), s (2995), s (1524), s (1516). Spectra in Supplementary Materials (Figures S1–S9).

Synthesis of G1C M3. In a 250 mL round bottom flask, 50.0 mg (0.060 mmol) of [Ru₂(*p*-cymene)₂(6,11-dioxydo-5,12-naphthacenedionato)Cl₂] and 31.0 mg (0.120 mmol) of AgCF₃SO₃ were dissolved in 20 mL of MeOH and stirred for 2 h at room temperature. Next, silver chloride was filtered off. To the remaining solution, 12.5 mg (0.040 mmol) of 2,4,6-tri(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine and 6.2 mg (0.020 mmol) of **G1** were added, and the solution was refluxed and stirred for 18 h. The solvent was then removed at reduced pressure, and the resulting oily, dark green solid was dissolved in 20 mL of CH₂Cl₂. The solution was concentrated to approximately 3 mL, and 5 mL of Et₂O was added dropwise. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum. Yield 76% (62 mg). ¹H NMR (CD₃CN, 25 °C, 600 MHz): δ 8.68 (s, 4H, CH_{porphine}), 8.21 (d, ³J_{HH} = 6.3 Hz, 12H, CH_{py}), 7.92 (s, 12H, CH_{naph}), 7.71 (s, 8H, CH_{porphine}), 6.12 (d, ³J_{HH} = 5.7 Hz, 12H, CH_{py}), 5.68 (d, ³J_{HH} = 5.8 Hz, 12H, CH_{cym}), 5.43 (d, ³J_{HH} = 5.9 Hz, 12H, CH_{cym}), 2.84 (m, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 6H, CH_{iPr}), 1.99 (s, 18H, CH₃), 1.33 (d, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 36H, CH_{3iPr}). ¹³C NMR

(CD₃CN, 25 °C, 150 MHz): δ 171.9 (C=O), 164.5 (C_q), 152.3 (CH_{py}), 140.9 (C_q), 138.9 (CH_{naph}), 130.9 (CH_{porph}), 124.9 (C_q), 122.8 (CH_{py}), 122.5 (CH_{py}), 120.7 (C_q), 112.5 (C_q), 104.4 (C_{cym}), 103.9 (CH_{porph}), 100.3 (C_{cym}), 85.0 (CH_{cym}), 83.7 (CH_{cym}), 31.0 (CH_{iPr}), 21.9 (CH_{3 iPr}), 16.8 (CH₃). UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , M⁻¹·cm⁻¹): 489 (53700), 573 (40200), 623 (62900). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν : br s (3700–3100), br s (3092), s (2992), s (2915), s (1531), s (1502). Spectra in Supplementary Materials (Figures S10–S17).

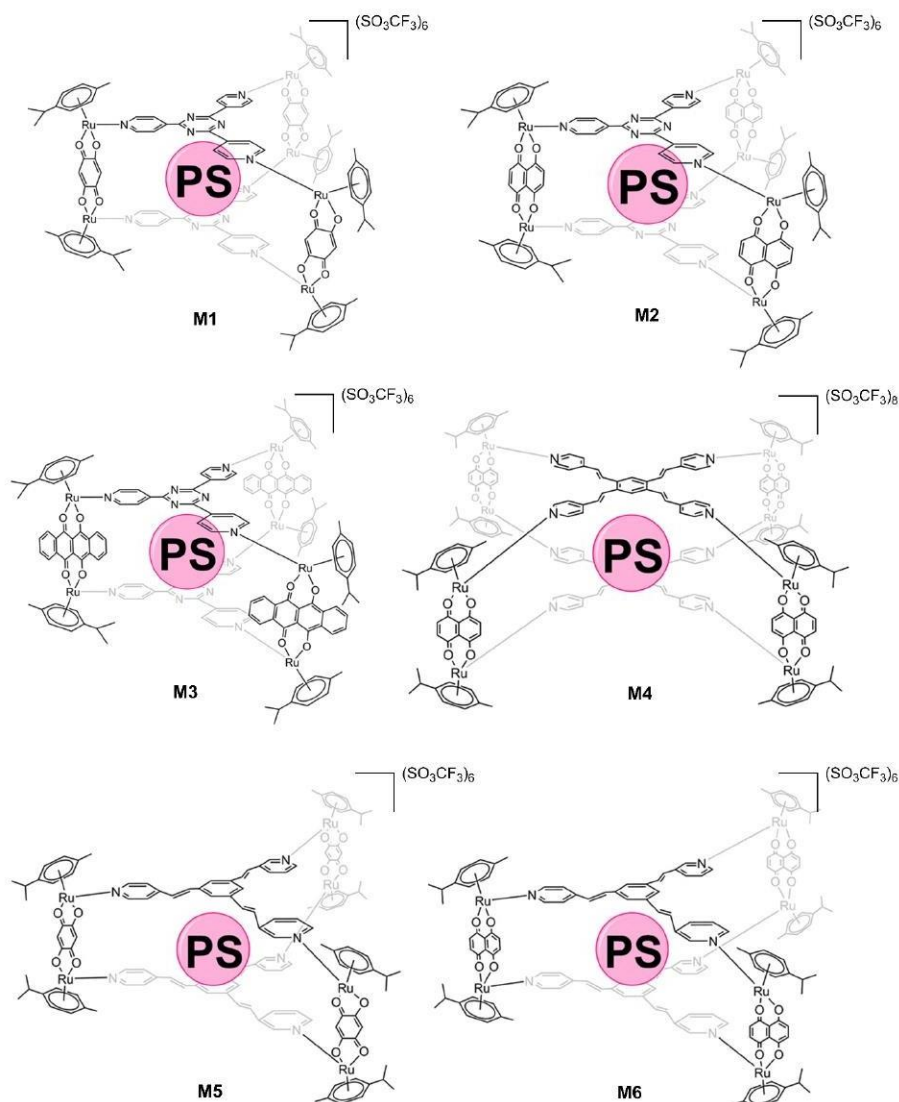


Figure 3. Structures of ruthenium(II) metallacages used in this work. The photosensitizer is represented by a sphere (PS), 21*H*,23*H*-porphine (G1) was inserted in M1–M6, Mg(II)-porphine (G2) in M1, M4, and M6, 29*H*,31*H*-phthalocyanine (G3) and Zn(II)-phthalocyanine (G4) in M4–M6.

Synthesis of G2C-M1. In a 250 mL round bottom flask, 50 mg (0.074 mmol) of $[\text{Ru}_2(p\text{-cymene})_2(2,5\text{-dioxido-1,4-benzoquinonato})\text{Cl}_2]$ and 37.8 (0.148 mmol) mg of AgCF_3SO_3 were dissolved in 20 mL of MeOH and stirred for 2 h at room temperature. Next, silver chloride was filtered off. To the remaining solution, 15.4 mg (0.049 mmol) of 2,4,6-tri(pyridin-4-yl)-1,3,5-triazine and 8.1 mg (0.025 mmol) of **G2** were added, and the solution was refluxed and stirred for 18 h. The solvent was then removed at reduced pressure, and the resulting oily, dark green solid was dissolved in 20 mL of CH_2Cl_2 . The solution was concentrated to approximately 3 mL, and 5 mL of Et_2O was added dropwise. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum. Yield 64% (59 mg). ^1H NMR (DMSO- d_6 , 25 °C, 600 MHz): δ 10.42 (s, 4H, $\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 9.61 (s, 8H, $\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 8.57 (m, 24H, CH_{py}), 5.62 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, 12H, CH_{cym}), 5.98 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, 12H, CH_{cym}), 5.91 (s, 6H, CH_{bz}), 2.82 (m, 6H, CH_{iPr}), 2.08 (s, 18H, CH_3), 1.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 36H, CH_3_{iPr}). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 25 °C, 150 MHz): δ 184.1 (C-O), 169.4 (C_q), 154.5 (CH_{py}), 149.3 (C_q), 144.6 (C_q), 132.7 ($\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 129.2 (C_q), 126.5 (C_q), 124.8 (CH_{py}), 122.2 (C_q), 120.0 (C_q), 105.9 ($\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 103.8 (C_{cym}), 101.8 (CH_{bz}), 99.7 (C_{cym}), 84.1 (CH_{cym}), 81.9 (CH_{cym}), 31.1 (CH_{iPr}), 22.4 (CH_3_{iPr}), 17.9 (CH_3). Elemental analysis: Calcd. For $\text{C}_{140}\text{H}_{126}\text{F}_{18}\text{MgN}_{16}\text{O}_{30}\text{Ru}_6\text{S}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}$, 44.42; H, 3.67; N, 5.92. Found: C, 45.23; H, 4.08; N, 6.09. ESI-MS, m/z , 770 $[\text{M1}+\text{G2-4OTf}]^{4+}$. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 500 (140700), 535 (130400). FT-IR (ATR, solid, cm^{-1}): ν ; s (3093), s (2977), s (2911), s (2804), s (1508). Spectra in Supplementary Materials (Figures S18–S26).

Synthesis of G2C-M4. In a 250 mL round bottom flask, 50 mg (0.069 mmol) of $[\text{Ru}_2(p\text{-cymene})_2(5,8\text{-dioxido-1,4-naphthoquinonato})\text{Cl}_2]$ and 35.5 mg (0.138 mmol) of AgCF_3SO_3 were dissolved in 20 mL of MeOH and stirred for 2 h at room temperature. Next, silver chloride was filtered off. To the remaining solution, 16.81 mg (0.034 mmol) of 1,2,4,5-tetrakis(2-(pyridine-4-yl)vinyl) benzene and 5.7 mg (0.017 mmol) of **G2** were added, and the solution was refluxed and stirred for 18 h. The solvent was then removed at reduced pressure, and the resulting oily, dark green solid was dissolved in 20 mL of CH_2Cl_2 . The solution was concentrated to approximately 3 mL, and 5 mL of Et_2O was added dropwise. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum. Yield 59% (52 mg). ^1H NMR (CD_3CN , 25 °C, 600 MHz): δ 10.02 (s, 4H, $\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 9.13 (s, 8H, $\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 8.18 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.1$ Hz, 16H, CH_{py}), 7.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 15.1$ Hz, 8H, $\text{CH}=\text{C}$), 7.20 (m, 40H, CH_{naph} , CH_{py} , $\text{CH}=\text{C}$), 6.90 (s, 4H, CH_{ar}), 5.60 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4.46$ Hz, 16H, CH_{cym}), 5.41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, 16H, CH_{cym}), 2.76 (m, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 8H, CH_{iPr}), 2.03 (overlapped singlet, 24H, CH_3), 1.25 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 48H, CH_3_{iPr}). ^{13}C NMR (CD_3CN , 25 °C, 150 MHz): δ 171.4 (C-O), 152.3 (CH_{py}), 149.9 (C_q), 147.7 (C_q), 138.1 (CH_{py}), 128.6 ($\text{CH}=\text{C}$), 127.6 ($\text{CH}=\text{C}$), 123.6 (CH_{naph}), 122.8 (C_q), 112.1 (C_q), 104.1 (C_{cym}), 99.7 (C_{cym}), 84.7 (CH_{cym}), 83.7 (CH_{cym}), 31.0 (CH_{iPr}), 21.9 (CH_3_{iPr}), 16.9 (CH_3). ESI-MS, m/z , 880 $[\text{M4}+\text{G2-5OTf}]^{5+}$. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 536 (137900), 572 (80300), 610 (64600). FT-IR (ATR, solid, cm^{-1}): ν ; s (3089), s (2947), s (2911), s (2861), s (1619), (1554). Spectra in Supplementary Materials (Figures S27–S35).

Synthesis of G2C-M6. In a 250 mL round bottom flask, 50 mg (0.069 mmol) of $[\text{Ru}_2(p\text{-cymene})_2(5,8\text{-dioxido-1,4-naphthoquinonato})\text{Cl}_2]$ and 35.5 mg (0.138) of AgCF_3SO_3 were dissolved in 20 mL of MeOH and stirred for 2 h at room temperature. Next, silver chloride was filtered off. To the remaining solution, 17.8 mg (0.046 mmol) of panel ligand 1,3,5-tris(2-(pyridin-4-yl)vinyl)benzene and 7.6 mg (0.023 mmol) of **G2** were added, and the solution was refluxed and stirred for 18 h. The solvent was then removed at reduced pressure, and the resulting oily, dark green solid was dissolved in 20 mL of CH_2Cl_2 . The solution was concentrated to approximately 3 mL, and 5 mL of Et_2O was added dropwise. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum. Yield 61% (56 mg). ^1H NMR (CD_3CN , 25 °C, 600 MHz): δ 10.29 (s, 4H, $\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 9.41 (s, 8H, $\text{CH}_{\text{Mg-porphine}}$), 8.57 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 12H, CH_{py}), 7.50 (s, 6H, CH_{ar}), 7.33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 12H, CH_{py}), 7.26 (s, 12H, CH_{naph}), 7.22 (overlapped doublet, 6H, $\text{CH}=\text{C}$), 6.98 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 6H, $\text{CH}=\text{C}$), 5.69 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, 12H, CH_{cym}), 5.48 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4.2$ Hz, 12H, CH_{cym}), 2.84

(m, $^3J_{HH} = 7.0$ Hz, 6H, CH_{iPr}), 2.10 (s, 18H, CH_3), 1.33 (d, $^3J_{HH} = 7.0$ Hz, 36H, CH_3_{iPr}). ^{13}C NMR (CD_3CN , 25 °C, 150 MHz): δ 171.3 (C-O), 152.3 (CH_{py}), 147.9 (C_q), 138.0 (CH_{py}), 137.0 (CH_{naph}), 135.1 (CH_{naph}), 132.5 ($CH_{Mg-Porphine}$), 127.4 ($CH=C$), 125.2 ($CH=C$), 123.1 (CH_{ar}), 120.6 (C_q), 112.0 (C_q), 105.9 ($CH_{Mg-porphine}$), 104.0 (C_{cym}), 99.7 (C_{cym}), 84.6 (CH_{cym}), 83.5 (CH_{cym}), 31.0 (CH_{iPr}), 21.9 (CH_3_{iPr}), 16.9 (CH_3). Elemental analysis: Calcd. For $C_{170}H_{150}F_{18}MgN_{10}O_{30}Ru_6S_6 + 6CH_2Cl_2$: C, 46.49; H, 3.62; N, 3.06. Found: C, 45.47; H, 3.51; N, 3.88. ESI-MS, m/z, 1177 [M_6+G_2-3OTf] $^{3+}$. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , $M^{-1}\cdot cm^{-1}$): 446 (150800), 536 (110500), 573 (53500), 610 (47100). FT-IR (ATR, solid, cm^{-1}): ν ; s (3101), s (2979), s (2914), s (1604), s (1522). Spectra in Supplementary Materials (Figures S36–S43).

2.2. Preparation of Human Synovial Cells

RA synoviocytes were isolated from fresh synovial biopsies obtained from four RA patients undergoing finger arthroplasty. All patients fulfilled the 1987 American Rheumatism Association criteria for RA [29]. The mean age of the patients was 67.4 ± 3.2 years (range 53–81 years). The mean disease duration was 8.7 ± 2.3 years. At the time of surgery, the disease activity score (DAS 28) was greater than 3.2. These activities were approved by local institutional review boards, and all subjects gave written informed consent. Synovia were minced and digested with 1.5 mg/mL collagenase-dispase for 3–4 h at 37 °C as previously described [30]. After centrifugation, cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% FCS, 4.5 g/L D-glucose, 25 mM Hepes, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco BRL) in a humidified atmosphere containing 5% (*v/v*) CO_2 at 37 °C. After 48 h, nonadherent cells were removed. Adherent cells (macrophage-like and FLS) were cultured in complete medium, and, at confluence, cells were trypsinized and only the FLS were passed. These cells were used between passages 4 and 8, when they morphologically resembled FLS after an indirect immunofluorescence study (see Culture of human RA FLS). RA FLS were cultured 45–60 days before experimentation. This delay allowed for the elimination of all possible interactions resulting from any preoperative treatment (with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, analgesics, disease-modifying antirheumatic drugs, or steroids).

2.3. Culture of Human RA FLS and Treatment

Between passages 4 and 8, RA FLS were trypsinized. Cell count and viability were determined, and cells were plated in culture plates or flasks (Falcon, Oxnard, CA, USA). Viability, measured by trypan blue dye exclusion [31] at the start and the end of culture, was always greater than 95%. FLS (10^5) from RA patients were used for an indirect immunofluorescence study [32]. The following monoclonal antibodies were used: 5B5 (anti-prolyl hydroxylase) for fibroblasts at a 1/50 dilution (Dako, Burlingame, CA, USA), JC/70A (anti-CD31), for endothelial cells at 1/50 (Dako), and RMO52 (anti-CD14) for macrophages at 1/50 (Immunotech). The negative control was a mouse antibody of the same isotype (Immunotech). Incubations were performed at room temperature for 30 min. Binding of monoclonal antibodies was visualized using fluorescein (DTAF)-conjugated goat anti-mouse antibody (Immunotech) at a 1/50 dilution.

2.4. Antiproliferative Assays

RA FLS cells were trypsinized in fresh DMEM culture medium. Homogeneous solutions were prepared in 10 mL of medium with 700,000 cells. In a 96-well plate, 100 μ L of the solution (7000 cells per well) was poured and the cells were incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 . Subsequently, 100 μ L of PS solution in increasing concentration was poured per row in the plate and incubated for 24 h in the same conditions. The compounds were dissolved in DMSO (1 mM) just before use and then added to the culture medium in the desired concentrations. The concentration of DMSO in the cell medium was never more than 0.05%. After incubation, the medium was removed and 100 μ L of complete medium without red phenol was added per well. At that point, irradiation was carried out using a red-light source, CureLight[®], PhotoCure ASA at 630 nm, at a dose of 40 mW/cm² for

30 min. After the irradiation, the wells plates were put in the incubator for 18 h. After this time, 10 μ L of MTT solution (5 g/L) was added and the plates were again placed inside the incubator for 4 h. Next, the media was removed and 200 μ L of DMSO was added per well, stirring the plate softly for 3 min. Absorbance after the MTT assay was measured at 540 nm by a Dynex Triad Multi Mode Microplate Reader, Dynex Technologies. The assays were executed in triplicate. Cytotoxicity evaluations in the dark were carried out by repeating this entire protocol without the irradiation dose. $\cdot\text{cm}^{-1}$

2.5. Protein Extraction and Western-Blot Analysis

For total protein extraction, RA FLS were washed in PBS, and the total cell pool was centrifuged at 200 g for 5 min at 4 °C and homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, and 20 mg/mL of aprotinin) containing protease inhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Proteins (60 μ g) were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France), which were then probed with a COX-2 human primary antibody (Cayman Chemical, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France). After incubation with a secondary antibody (Dako France S.A.S., Trappes, France), blots were developed using the ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech) and G: BOX system (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Membranes were then reblotted with human anti- β -actin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) used as a loading control.

2.6. Assay of COX-2 Activity

RA FLS were maintained in DMEM supplemented with 10% (*v/v*) FCS, 4.5 g/L D-glucose, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. The cells were grown in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. Next, 2.10⁶ RA FLS cells were seeded in a 25 cm² flask and incubated for 24 h. Then, the IC₅₀ of each PS was added and the cells were incubated for 24 h. The medium was removed and a medium without red phenol was added. Immediately, cells were irradiated under the same conditions expressed in the MTT assays and incubated for 18 h. The non-irradiated cells were kept in the incubator. After this, LPS (1 μ g/mL) was added to the medium of both irradiated and non-irradiated cells, and the cells were incubated for 4 h. Cells were trypsinized and the culture medium supernatant was isolated. The PGE₂ levels were quantified in the culture media supernatants from treated and control cells by enzyme immunoassay using an ELISA Kit (Cayman Chemical) [33]. The results were expressed as the average of three independent experiments.

2.7. Assay of IL-1 β Production

The IL-1 β levels were quantified in the culture media supernatants, isolated by the same protocol described for PGE₂, from treated and control cells by ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific). The results were expressed as the average of three independent experiments.

2.8. Statistical Analysis

All quantitative results are expressed as the mean \pm 3 standard deviations (SEM) of separate experiments using Excel (Microsoft Office, Version 2019). Statistical significance was evaluated by the two-tailed unpaired Student's *t*-test, *p*-value < 0.001 (***).

3. Results and Discussion

3.1. Phototoxicity Tests

Although it is the first time that these PS–metallacage systems have been tested to treat RA using PDT, two of the fifteen systems described here (Figure 3) have already been tested in cancer (HeLa, Me300, A2780, A2780cisR, and A549) [21]. Specifically, the prismatic metallacage M1 and the cubic M4, both with G1 in their internal cavity. In

cancer cells, a total absence of cytotoxicity was demonstrated prior to cell internalization. Once inside the cells, the PS is released from the cage and can be irradiated giving rise to photocytotoxicity. Two mechanisms have been suggested to explain the releasing of the PS from the metallacage: (i) from a partial or total rupture of the cage; or (ii) through an aperture [21,22]. Furthermore, intracellular ruthenium contents [22] and fluorescence studies [21] have confirmed the ability of these metallacages to cross cell membranes. Fluorescence studies also reveal that, once inside the cell and after the PS leaves the cavity of the metallacage, both are positioned in different cellular areas, which did not include the nucleus.

In this work, we wanted to demonstrate the efficacy and potential of these systems in another pathology, RA, looking for a treatment that is fairly non-invasive. In addition, we have synthesized cages with structural variations to evaluate how the different elements of the metallacage influence its PDT effect (Figure 3). Moreover, we have evaluated new PSs, such as **G2**, **G3**, and **G4**, in addition to **G1** which have been evaluated to treat RA by PDT.

First, these metallacages can be differentiated by their two main elements: the panel ligand and the dinuclear ruthenium clips. The panel ligand is a flat organic compound with three or four pyridine substituents, which give rise to prismatic or cubic cages, respectively. In this work, we used 2,4,6-tri(pyridin-4-yl)-1,3,5-triazine, 1,3,5-tris[2-(pyridin-4-yl)vinyl]benzene, or 1,2,4,5-tetrakis[2-(pyridine-4-yl)vinyl] benzene. Dinuclear arene ruthenium(II) complexes are the edges of the cage, whose two metal atoms are linked by 2,5-dioxydo-1,4-benzoquinonato, 5,8-dioxydo-1,4-naphthoquinonato, or 6,11-dioxydo-5,12-naphthacenedionato ligands (Figure 3).

The results of the photocytotoxicity tests after PDT in RA FLS were excellent (Table 1). MTT assays showed 50% inhibition concentrations (IC_{50}) lower than those seen in cancer cells [21]. The latter was to be expected, since RA FLS are primary cells and their growth is not accelerated, unlike cancer cells. As we anticipated, the structural variation in the cages gave rise to significant differences in the PDT effect.

Table 1. Results of the MTT assays. Irradiation after 24 h of incubation with $G \subset M$, $\lambda = 630$ nm, 40 mW/cm² for 30 min. IC_{50} values were calculated fitting the curve to a second degree polynomial ± 3 sigma deviations. The maximum concentration tested was 1.5 μ M. Quantum yield (Φ_F) was calculated using TPP as an internal standard in DMSO at 25 °C.

Entry	G \subset M	IC_{50} (nM) Light	IC_{50} (nM) Dark	Φ_F (%)
1	G1 \subset M1	211.7 ± 5.8	>1500	-
2	G1 \subset M2	95.0 ± 5.9	>1500	-
3	G1 \subset M3	53.6 ± 4.3	>1500	-
4	G1 \subset M4	48.1 ± 9.7	>1500	-
5	G1 \subset M5	35.4 ± 4.7	>1500	0.8
6	G1 \subset M6	31.7 ± 6.6	>1500	1.1
7	G2 \subset M1	302.6 ± 5.2	>1500	-
8	G2 \subset M4	100.7 ± 5.8	>1500	-
9	G2 \subset M6	91.8 ± 8.3	>1500	2.0
10	G3 \subset M4	>1500	>1500	-
11	G3 \subset M5	53.4 ± 4.5	>1500	0.11
12	G3 \subset M6	47.4 ± 6.3	>1500	-
13	G4 \subset M4	>1500	>1500	-
14	G4 \subset M5	66.0 ± 2.6	103.8 ± 2.9	1.6
15	G4 \subset M6	64.4 ± 4.4	163.8 ± 17.1	-

First, we have observed that when the size of the panel ligand is bigger, the photocytotoxicity is higher. For example, the structures of cages **M2**, **M4**, and **M6** differ only by the panel ligand, 2,4,6-tri(pyridin-4-yl)-1,3,5-triazine, 1,3,5-tris[2-(pyridin-4-yl)vinyl]benzene, and 1,2,4,5-tetrakis[2-(pyridine-4-yl)vinyl] benzene, respectively. When the IC_{50} values obtained with porphine as the PS are compared (entries 2, 4, and 6 in Table 1), we observed that cage **M2**, with the smallest panel, needed a higher concentration than **M4** and **M6**

(triple when compared to **M6**). This difference becomes more evident if we compare cage **M1** and **M5**, which have panels 2,4,6-tri(pyridin-4-yl)-1,3,5-triazine and 1,3,5-tris(2-(pyridin-4-yl)vinyl)benzene, respectively. With **G1** as the PS, the IC_{50} of **M1** is six times higher than that observed in **M5** (entries 1 and 5 in Table 1). This coincides with what has been reported in cancer cells [21]. A larger panel gives rise to larger apertures that facilitate the release of the PS once inside the cell, producing more ROS and, subsequently, more photocytotoxicity. This result is consistent with the other three PSs tested (Table 1).

The second of the structural elements of the cages that we can modify, the dinuclear ruthenium clip, also showed significant differences, as we expected. When the volume of the ruthenium complex is bulkier, we observed that the IC_{50} is lower, which translates into a better PDT effect. For instance, cages **M1**, **M2**, and **M3** contain the same panel ligand and differ only in the dinuclear ruthenium "edges", being 2,5-dioxydo-1,4-benzoquinonato, 5,8-dioxydo-1,4-naphthoquinonato, and 6,11-dioxydo-5,12-naphthacenedionato respectively. With **G1** as the PS, the result obtained with **M3** was four times lower than the IC_{50} obtained in **M1** (entries 1 and 3 in Table 1), while the IC_{50} of **M2** (entry 2 in Table 1) shows an intermediate value. These results are consistent with the structure of the metallacages, which suggest the release of the PS through an aperture [22]. Indeed, when the metallacage is smaller, the host-guest system is stabilized, making it difficult for the PS to escape, which translates into lower ROS production and a lower PDT effect. The same result, although in a lesser proportion, is observed with the other PSs tested (Table 1).

Finally, the four PSs tested have shown significant differences. First, it is worth noting the presence or absence of a metal in the center of the tetrapyrrole. In all cases, using the same cage, the PSs without a metal showed a better PDT effect (Table 1). The cause of this result is directly related to fluorescence [34]. When the PS is irradiated, part of the energy is absorbed and the PS reaches the excited singlet state. The PS can then return to the minimum energy state by releasing that energy, producing fluorescence, or the energy can pass through an intermediate excited triplet state. From this last state, the PS can return to the ground state, giving rise to phosphorescence, or interact with O_2 to give rise to singlet oxygen and, in turn, ROS [12,13]. Therefore, since the derivate with Zn and Mg give rise to higher fluorescence (Figure 4), lower ROS production would be expected than their equivalents without metal. This corroborates the obtained results, that is, the presence of Mg or Zn favor fluorescence and therefore reduce ROS production and PDT efficiency. Calculating the quantum yields (Table 1), we observed the same result as expected, that is, higher quantum yield equates to less of a PDT effect.

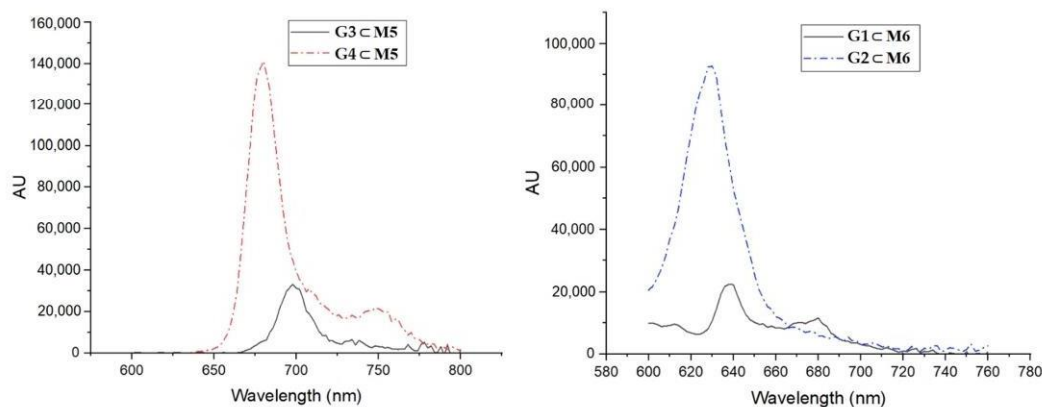


Figure 4. Emission spectra of **M5** with **G3** or **G4** (left) and **M6** with **G1** or **G2** (right), in DMSO at 25 °C (10 nM concentration).

Regarding the differences between porphine (**G1**) and phthalocyanine (**G3**), the results show that **G1** works better as a PS than **G3** when carried in the same metallacage (Table 1). However, the IC_{50} for **G3** is still excellent, with both showing great potential as PSs. Surprisingly, one of the results was unexpected. When **G3** or **G4** is transported by the cubic metallacage (**M4**), no effect on RA FLS is observed (Table 1), even at the highest concentration tested. This also suggests a stronger binding affinity between the host and the guest, thus supporting that the PS is released through an aperture, rather than having a breakage of the metallacage [22].

Another excellent result is the total absence of cytotoxicity in the dark for all compounds, except for those with **G4** in their cavity, which show dark toxicity (Figure 5). Therefore, this result suggests that **G4** is not a good PS, although it is something we could have anticipated since other zinc tetrapyrrole derivatives have already been reported to show toxicity in the dark [35,36]. Another intriguing result comes from the metallated photosensitizers (**G3** and **G4**) encapsulated in the 1,2,4,5-tetrakis[2-(pyridine-4-yl)vinyl]benzene derivative (**M4**) (entries 10 and 13, Table 1). In both systems (**G3**⊂**M4** and **G4**⊂**M4**), no phototoxicity and no toxicity is observed, suggesting the absence of a photo-response from the photosensitizers in these particular cases. When compared to the other **G**⊂**M** systems, the most plausible explanation is that the presence of Mg or Zn in the core of the PS generates a stronger interaction between the host and the guest, thus shielding the PS and blocking their release.

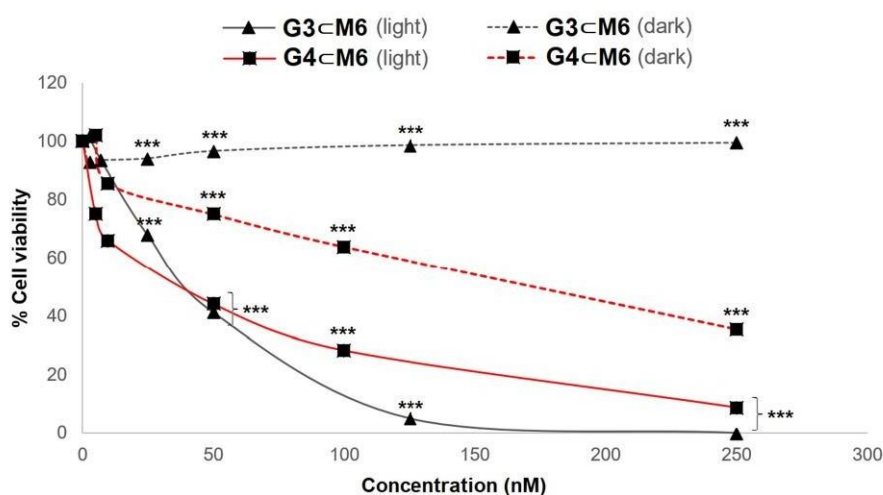


Figure 5. MTT assays of **G3**⊂**M6** (black) and **G4**⊂**M6** (red), in the dark (dashed line) and after irradiation (solid line). Statistical significance determined by the two-tailed unpaired Student's *t*-test, *p*-value < 0.001 (***).

3.2. Inflammatory Evaluation

The synovial membrane encapsulates the joint, providing structural support, lubricating the tissues, and providing nutrients to the cartilage. FLS are part of the inner lining layer of the synovial membrane. One of the main functions of FLS is the production of cytokines [37]. One of the cytokines involved in the inflammatory response is the interleukin (IL) family. IL-1 can express cyclooxygenase-2 (COX-2), an enzyme that acts as a catalyst in the production of prostaglandin E_2 (PGE₂) from arachidonic acid [38–41]. PGE₂ causes vasodilation in the synovial tissue, leading to inflammation in the area [42]. To evaluate in RA FLS the in vitro inflammatory activity after PDT, we decided to measure the production of PGE₂ and IL-1β in the supernatant, in addition to the expression of COX-2 in both the irradiated and non-irradiated treated cells.

The determination of COX-2 expression reveals that treated RA FLS with our systems by PDT generates an overexpression of this enzyme (Figure 6), when the cells were irradiated. This result was expected, since multiple examples of COX-2 overexpression after PDT have been reported. For instance, other porphyrin-based PSs such as PpIX-polyamine [43] or Photofrin [44] increased COX-2 expression. Additionally, this not only happens with PSs based on porphyrins, but also with other PSs used in PDT [45,46]. It should be noted that most of the systems with a lower IC₅₀ (Table 1) show less intensity in the COX-2 expression band (Figure 6). For instance, the compounds that obtained the lowest IC₅₀, entries 4, 5, 6, 11, and 12 (Table 1), showed a COX-2 band with the lowest intensity.

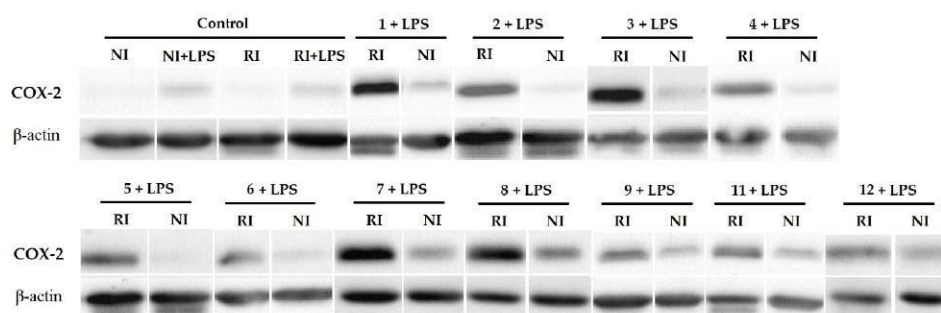


Figure 6. Effects of the systems tested on COX-2 expression after PDT. The numbers correspond to the entries in Table 1. Cells (2×10^6) were cultured in DMEM medium (FBS 10%, L-glutamine 1%, penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 μ g/mL) for 24 h and treated with the corresponding system G.C.M. After 24 h, the medium was replaced by a DMEM medium without red phenol, and then irradiated (RI) or not (NI) by 630 nm irradiation (40 mW/cm², 30 min). After 18 h, LPS (1 μ g/mL) was added to the medium to stimulate the expression of COX-2, and 4 h later the trypsinization was carried out. COX-2 expression was determined by Western Blot and β -actin was used as a protein loading control. All experiments were done in triplicate.

As expected, an overexpression of COX-2 generates a greater production of PGE₂ [43], which may lead to an increase in inflammation. That is what we see in the results obtained in the determination of PGE₂ (Table 2). As with COX-2, it can be seen that when the IC₅₀ is lower, the production of PGE₂ is also lower, which again points out that reducing the required concentration of PS could reduce the adverse effects of PDT. However, it is possible to minimize the expression of COX-2 and, consequently, the production of PGE₂ by using a COX-2 inhibitor, such as NS-398 during PDT treatment [43,47].

On the other hand, IL-1 β is known to be a pro-inflammatory cytokine that leads to the expression of COX-2, among other functions [48]. Since our experiments showed an overexpression of COX-2 and the production of PGE₂, we anticipated the presence of this cytokine as a response to the PDT treatment. Unexpectedly, the determination of IL-1 β indicates that its presence after PDT is insignificant (Table 2). It is even below the standard of lower concentration and their values were not significantly different from the control samples. This indicates that, in vitro, when RA FLS are treated with our systems by PDT, IL-1 β is not generating more COX-2 than what is already present in the cells, so it is not involved in the detected overexpression. However, also in synovial tissues, other cases have been reported in which IL-1 β was not involved in the overexpression of COX-2 [49–51], indicating that other cytokines like IL-6 or IL-8 were responsible [51].

Table 2. PGE₂ and IL-1 β results. The assays were performed using the protocol provided by the ELISA kit in triplicate. The data were treated as explained in this protocol. The cells tested were treated by PDT with each of the indicated compounds as described in the experimental section. The control sample was treated exactly as the cells tested, that is, 18 h after the irradiation dose, 1 μ g/mL of LPS was added to the medium and the cells were incubated for 4 h, then trypsinized and the cells and supernatant were isolated. The results are expressed by the average of three independent experiments. After testing the photocytotoxic activity, we chose the systems with the greatest potential to be used in PDT against RA and evaluated their inflammatory activity. Of these fifteen systems, we obviously ruled out those that did not work (cubic cage **M4** + phthalocyanines) and the systems that generated toxicity in the dark.

Entry	G \subset M	PGE ₂ (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
Ctrl	-	286.6 \pm 0.1	1.8 \pm 0.7
1	G1 \subset M1	460.8 \pm 4.3	2.3 \pm 1.2
2	G1 \subset M2	471.2 \pm 3.4	1.9 \pm 1.0
3	G1 \subset M3	445.1 \pm 4.7	2.8 \pm 0.1
4	G1 \subset M4	378.3 \pm 14.2	3.2 \pm 0.4
5	G1 \subset M5	407.4 \pm 14.5	2.1 \pm 0.2
6	G1 \subset M6	439.2 \pm 10.1	1.6 \pm 0.1
7	G2 \subset M1	476.8 \pm 3.4	1.9 \pm 0.6
8	G2 \subset M4	473.6 \pm 7.5	1.4 \pm 0.2
9	G2 \subset M6	430.6 \pm 1.4	2.2 \pm 0.2
10	G3 \subset M5	368.2 \pm 26.5	2.4 \pm 0.4
11	G3 \subset M6	425.2 \pm 2.7	0.1 \pm 0.1

4. Conclusions

A series of photosensitizers (**G**) encapsulated in arene ruthenium metallacages (**M**) have been synthesized and characterized. The PDT effect of these host-guest systems (**G** \subset **M**) has been evaluated on fibroblast-like synoviocyte cells (FLS). With the exception of the zinc phthalocyanine derivatives (**G4** \subset **M5** and **G4** \subset **M6**), all **G** \subset **M** compounds show no toxicity in the dark at the highest concentration tested (1.5 μ M). When under light, the most photoactive compounds appear to be those with the largest cavity and the smallest guest, suggesting that the release of the photosensitizers from the host occurs without any breakage of the metallacage. However, when **G4** is encapsulated in the metallacages built with 1,3,5-tris(2-(pyridin-4-yl)vinyl) benzene panels (**M5** and **M6**), the difference between phototoxicity and toxicity is limited. On the other hand, when the metallated photosensitizers (**G3** and **G4**) are encapsulated in the 1,2,4,5-tetrakis(2-(pyridine-4-yl)vinyl) benzene derivative (**M4**), no phototoxicity is observed, suggesting a strong interaction between the host and guest, which shields the photosensitizer. Nevertheless, in all systems, PDT gives rise to the overexpression of COX-2 and PGE₂. However, we have also observed that when a lower concentration of the drug is used, this overexpression is significantly reduced. Surprisingly, IL-1 β does not seem to be involved in this COX-2 overexpression, despite being previously reported. This indicates that other cytokines are responsible for this overexpression of COX-2. With a few exceptions, all systems show encouraging results, and further in vitro investigations should be performed and other host-guest systems evaluated in order to validate our strategy; however, we think our results show an interesting method for the treatment of RA by PDT. This work, added to those already reported in the last three decades, both in vitro and in vivo, show the inherent potential that PDT could have in the treatment of RA.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13122104/s1>, Figure S1: ¹H NMR spectrum of **G1** \subset **M2** in CD₃CN at 25 °C, Figure S2: ¹³C NMR spectrum of **G1** \subset **M2** in CD₃CN at 25 °C, Figure S3: ¹H-¹H COSY NMR spectrum of **G1** \subset **M2** in CD₃CN at 25 °C, Figure S4: DOSY NMR spectrum of **G1** \subset **M2** in CD₃CN at 25 °C, Figure S5: ¹H-¹³C HSQC NMR spectrum of **G1** \subset **M2** in CD₃CN at 25 °C, Figure S6: ¹H-¹³C HMQC NMR spectrum of **G1** \subset **M2** in CD₃CN at 25 °C, Figure S7: ESI-MS spectrum

of **G1C M2**, Figure S8: UV-vis absorbance spectrum of **G1C M2** (10 μ M in DMSO), Figure S9: ATR FT-IR spectrum of **G1C M2**, Figure S10: ^1H NMR spectrum of **G1C M3** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S11: ^{13}C NMR spectrum of **G1C M3** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S12: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of **G1C M3** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S13: DOSY NMR spectrum of **G1C M3** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S14: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of **G1C M3** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S15: ^1H - ^{13}C HMQC NMR spectrum of **G1C M3** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S16: UV-vis absorbance spectrum of **G1C M3** (10 μ M in DMSO), Figure S17: ATR FT-IR spectrum spectrum of **G1C M3**, Figure S18: ^1H NMR spectrum of **G2C M1** in DMSO-d_6 at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S19: ^{13}C NMR spectrum of **G2C M1** in DMSO-d_6 at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S20: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of **G2C M1** in DMSO-d_6 at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S21: DOSY NMR spectrum of **G2C M1** in DMSO-d_6 at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S22: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of **G2C M1** in DMSO-d_6 at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S23: ^1H - ^{13}C HMQC NMR spectrum of **G2C M1** in DMSO-d_6 at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S24: ESI-MS spectrum of **G2C M1**, Figure S25: UV-vis absorbance spectrum of **G2C M1** (10 μ M in DMSO), Figure S26: ATR FT-IR spectrum spectrum of **G2C M1**, Figure S27: ^1H NMR spectrum of **G2C M4** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S28: ^{13}C NMR spectrum of **G2C M4** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S29: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of **G2C M4** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S30: DOSY NMR spectrum of **G2C M4** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S31: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of **G2C M4** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S32: ^1H - ^{13}C HMQC NMR spectrum of **G2C M4** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S33: ESI-MS spectrum of **G2C M4**, Figure S34: UV-vis absorbance spectrum of **G2C M4** (10 μ M in DMSO), Figure S35: ATR FT-IR spectrum spectrum of **G2C M4**, Figure S36: ^1H NMR spectrum of **G2C M6** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S37: ^{13}C NMR spectrum of **G2C M6** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S38: ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of **G2C M6** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S39: ^1H - ^{13}C HSQC NMR spectrum of **G2C M6** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S40: ^1H - ^{13}C HMQC NMR spectrum of **G2C M6** in CD_3CN at 25 $^\circ\text{C}$, Figure S41: ESI-MS spectrum of **G2C M6**, Figure S42: UV-vis absorbance spectrum of **G2C M6** (10 μ M in DMSO), Figure S43: ATR FT-IR spectrum spectrum of **G2C M6**.

Author Contributions: Conceptualization, M.G.-V., B.L., and B.T.; Methodology, M.G.-V., L.P., J.-L.C., and S.S.; Validation, D.Y.L., B.L., and B.T.; Writing—original draft preparation, M.G.-V. and P.V.-S.; Writing—review and editing, B.L. and B.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by European Union's Horizon 2020 under the Marie Skłodowska-Curie, grant agreement no. 764837.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank all of the people involved in the project POLYTHEA, funding by European Union's Horizon 2020 under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 764837. M.G.-V. thanks Stéphanie Leroy-Lhez, Johann Bouclé, and Nidia Maldonado-Carmona for access to fluorescence equipment and for their great help, and Daniel Stares and Christoph A. Schalley for their excellent work in mass spectrometry.

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

References

- Smolen, J.S.; Aletaha, D.; McInnes, I.B. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **2016**, *388*, 2023–2038. [[CrossRef](#)]
- Roux, C.H.; Sarau, A.; Le Bihan, E.; Fardellone, P.; Guggenbuhl, P.; Fautrel, B.; Masson, C.; Chary-Valckenaere, I.; Cantagrel, A.; Juvin, R.; et al. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: Geographical variations in prevalence in France. *J. Rheumatol.* **2007**, *34*, 117–122.
- Scherer, H.U.; Häupl, T.; Burmester, G.R. The etiology of rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **2020**, *110*, 102400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kerkman, P.F.; Fabre, E.; van der Voort, E.I.; Zaldumbide, A.; Rombouts, Y.; Rispens, T.; Wolbink, G.; Hoeben, R.C.; Spits, H.; Baeten, D.L.; et al. Identification and characterization of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2016**, *75*, 1170–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aletaha, D.; Alasti, F.; Smolen, J.S. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 229. [[CrossRef](#)]
- McInnes, I.B.; Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2205–2219. [[CrossRef](#)]

7. Smolen, J.S.; Landewé, R.B.; Bijlsma, J.W.; Burmester, G.R.; Dougados, M.; Kerschbaumer, A.; McInnes, I.B.; Sepriano, A.; van Vollenhoven, R.F.; de Wit, M.; et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis.* **2020**, *79*, 685–699. [[CrossRef](#)]
8. Smolen, J.S.; van der Heijde, D.; Machold, K.P.; Aletaha, D.; Landewé, R. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 3–5. [[CrossRef](#)]
9. Ma, X.; Xu, S. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Biomed. Rep.* **2013**, *1*, 177–184. [[CrossRef](#)]
10. Dowty, M.E.; Lin, T.H.; Jesson, M.L.; Hegen, M.; Martin, D.A.; Katkade, V.; Menon, S.; Telliez, J.B. Janus kinase inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis demonstrate similar profiles of in vitro cytokine receptor inhibition. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2019**, *7*, e00537. [[CrossRef](#)]
11. Gallardo-Villagrán, M.; Leger, D.Y.; Liagre, B.; Therrien, B. Photosensitizers used in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3339. [[CrossRef](#)]
12. 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](#)]
13. 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. [[CrossRef](#)]
14. Hopper, C. Photodynamic therapy: A clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **2000**, *1*, 212–219. [[CrossRef](#)]
15. Trauner, K.B.; Gandour-Edwards, R.; Bamberg, M.; Shortkroff, S.; Sledge, C.; Hasan, T. Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 133–139. [[CrossRef](#)]
16. Miyazawa, S.; Nishida, K.; Komiyama, T.; Nakae, Y.; Takeda, K.; Yorimitsu, M.; Kitamura, A.; Kunisada, T.; Ohtsuka, A.; Inoue, H. Novel transdermal photodynamic therapy using ATX-S10- Na (II) induces apoptosis of synovial fibroblasts and ameliorates collagen antibody-induced arthritis in mice. *Rheumatol. Int.* **2006**, *26*, 717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lu, Y.; Li, L.; Lin, Z.; Wang, L.; Lin, L.; Li, M.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Li, Q.; Xia, H. A new treatment modality for rheumatoid arthritis: Combined photothermal and photodynamic therapy using Cu7. 2S4 nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1800013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Koderhold, G.; Jindra, R.; Koren, H.; Alth, G.; Schenk, G. Experiences of photodynamic therapy in dermatology. *J. Photochem. Photobiol. Biol.* **1996**, *36*, 221–223. [[CrossRef](#)]
19. Búzová, D.; Kasák, P.; Miškovský, P.; Jancura, D. Solubilization of poorly soluble photosensitizer hypericin by polymeric micelles and polyethylene glycol. *Gen. Physiol. Biophys.* **2013**, *32*, 201–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Yang, X.; Bai, J.; Qian, Y. The investigation of unique water-soluble heptamethine cyanine dye for use as NIR photosensitizer in photodynamic therapy of cancer cells. *Spectrochim. Acta A* **2020**, *228*, 117702. [[CrossRef](#)]
21. Schmitt, F.; Freudenreich, J.; Barry, N.P.; Juillerat-Jeanneret, L.; Süß-Fink, G.; Therrien, B. Organometallic cages as vehicles for intracellular release of photosensitizers. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 754–757. [[CrossRef](#)]
22. Barry, N.P.E.; Zava, O.; Dyson, P.J.; Therrien, B. Excellent Correlation between Drug Release and Portal Size in Metalla-Cage Drug-Delivery Systems. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9669–9677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Barry, N.P.; Edfate, F.; Therrien, B. Anticancer activity of tetracationic arene ruthenium metalla-cycles. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7172–7180. [[CrossRef](#)]
24. Xu, F.; Zhu, X.H.; Shen, Q.; Lu, J.; Li, J.Q. Catalytic cyclotrimerization of aryl nitriles using the novel samarium (II) complexes as catalysts. *Chin. J. Chem.* **2002**, *20*, 1334–1339. [[CrossRef](#)]
25. Amoroso, A.J.; Thompson, A.M.C.; Maher, J.P.; McCleverty, J.A.; Ward, M.D. Di-, tri-, and tetranucleating pyridyl ligands which facilitate multicenter magnetic exchange between paramagnetic molybdenum centers. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 4828–4835. [[CrossRef](#)]
26. Wang, L.; Tao, X.T.; Yang, J.X.; Yu, W.T.; Ren, Y.; Xin, Q.; Liu, Z.; Jiang, M.H. Synthesis, structure and two-photon absorption properties of a new multi-branched compound, 1, 2, 4, 5-tetrakis (4-pyridylvinyl) benzene. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 4293–4299. [[CrossRef](#)]
27. Freudenreich, J.; Dalvit, C.; Süß-Fink, G.; Therrien, B. Encapsulation of photosensitizers in hexa- and octanuclear organometallic cages: Synthesis and characterization of carceplex and host-guest systems in solution. *Organometallics* **2013**, *32*, 3018–3033. [[CrossRef](#)]
28. Dogutan, D.K.; Ptaszek, M.; Lindsey, J.S. Direct synthesis of magnesium porphyrin via 1-formyldipyromethane. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5008–5011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Arnett, F.C.; Edworthy, S.M.; Bloch, D.A.; McShane, D.J.; Fries, J.F.; Cooper, N.S.; Healey, L.A.; Kaplan, S.R.; Liang, M.H.; Luthra, H.S.; et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **1988**, *31*, 315–324. [[CrossRef](#)]
30. Liagre, B.; Vergne-Salle, P.; Corbiere, C.; Charissoux, J.L.; Beneytout, J.L. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synovial cells with cyclooxygenase-2 overexpression. *Arthritis Res. Ther.* **2004**, *6*, R373. [[CrossRef](#)]
31. Glant, T.T.; Jacobs, J.J.; Molnár, G.; Shanbhag, A.S.; Valyon, M.; Galante, J.O. Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. *J. Bone Miner. Res.* **1993**, *8*, 1071–1079. [[CrossRef](#)]

32. Bonnet, C.; Bertin, P.; Cook-Moreau, J.; Chable-Rabinovitch, H.; Treves, R.; Rigaud, M. Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells. *Prostaglandins* **1995**, *50*, 127–135. [[CrossRef](#)]
33. Semaan, J.; Pinon, A.; Rioux, B.; Hassan, L.; Limami, Y.; Pouget, C.; Fagnère, C.; Sol, V.; Diab-Assaf, M.; Simon, A.; et al. Resistance to 3-HTMC-induced apoptosis through activation of PI3K/Akt, MEK/ERK, and p38/COX-2/PGE2 pathways in human HT-29 and HCT116 colorectal cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **2016**, *117*, 2875–2885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kamkaew, A.; Lim, S.H.; Lee, H.B.; Kiew, L.V.; Chung, L.Y.; Burgess, K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lutton, J.D.; Abraham, N.G.; Drummond, G.S.; Levere, R.D.; Kappas, A. Zinc porphyrins: Potent inhibitors of hematopoiesis in animal and human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1432–1436. [[CrossRef](#)]
36. Yang, G.; Nguyen, X.; Ou, J.; Rekulapelli, P.; Stevenson, D.K.; Dennery, P.A. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Am. J. Hematol.* **2001**, *97*, 1306–1313. [[CrossRef](#)]
37. Bartok, B.; Firestein, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **2010**, *233*, 233–255. [[CrossRef](#)]
38. Park, C.; Moon, D.O.; Choi, I.W.; Choi, B.T.; Nam, T.J.; Rhu, C.H.; Kwon, T.K.; Lee, W.H.; Kim, G.Y.; Choi, Y.H. Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E2 production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, *20*, 365–372. [[CrossRef](#)]
39. Nasry, W.H.S.; Rodriguez-Lecompte, J.C.; Martin, C.K. Role of COX-2/PGE2 mediated inflammation in oral squamous cell carcinoma. *Cancers* **2018**, *10*, 348. [[CrossRef](#)]
40. Sung, M.S.; Lee, E.G.; Jeon, H.S.; Chae, H.J.; Park, S.J.; Lee, Y.C.; Yoo, W.H. Quercetin inhibits IL-1 β -induced proliferation and production of MMPs, COX-2, and PGE2 by rheumatoid synovial fibroblast. *Inflammation* **2012**, *35*, 1585–1594.3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Agostinis, P.; Breysens, H.; Buytaert, E.; Hendrickx, N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 721–729. [[CrossRef](#)]
42. Downey, G.P.; Gumbay, R.S.; Doherty, D.E.; LaBrecque, J.F.; Henson, J.E.; Henson, P.M.; Worthen, G.S. Enhancement of pulmonary inflammation by PGE2: Evidence for a vasodilator effect. *J. Appl. Physiol.* **1988**, *64*, 728–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fidanzi-Dugas, C.; Liagre, B.; Chemin, G.; Perraud, A.; Carrion, C.; Couquet, C.Y.; Granet, R.; Sol, V.; Léger, D.Y. Analysis of the in vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on prostate cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamine derivatives. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 1676–1690. [[CrossRef](#)]
44. Luna, M.; Wong, S.; Ferrario, A.; Gomer, C.J. Cyclooxygenase-2 Expression Induced by Photofrin Photodynamic Therapy Involves the p38 MAPK Pathway. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 509–514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rayar, A.M.; Lagarde, N.; Martin, F.; Blanchard, F.; Liagre, B.; Ferroud, C.; Zagury, J.F.; Montes, M.; Veitia, M.S.I. New selective cyclooxygenase-2 inhibitors from cyclocoumarol: Synthesis, characterization, biological evaluation and molecular modeling. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 577–587. [[CrossRef](#)]
46. Hendrickx, N.; Volanti, C.; Moens, U.; Seternes, O.M.; De Witte, P.; Vandenheede, J.R.; Piette, J.; Agostinis, P. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52231–52239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ferrario, A.; Von Tiehl, K.; Wong, S.; Luna, M.; Gomer, C.J. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3956–3961. [[PubMed](#)]
48. Williams, C.S.; Mann, M.; DuBois, R.N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* **1999**, *18*, 7908–7916. [[CrossRef](#)]
49. van Dalen, S.C.M.; Blom, A.B.; Sløetjes, A.W.; Helsen, M.M.A.; Roth, J.; Vogl, T.; van de Loo, F.A.; Koenders, M.I.; van der Kraan, P.M.; van den Berg, W.B.; et al. Interleukin-1 is not involved in synovial inflammation and cartilage destruction in collagenase-induced osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2017**, *25*, 385–396. [[CrossRef](#)]
50. Nasi, S.; Ea, H.K.; So, A.; Busso, N. Revisiting the role of interleukin-1 pathway in osteoarthritis: Interleukin-1 α and -1 β , and NLRP3 inflammasome are not involved in the pathological features of the murine meniscectomy model of osteoarthritis. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 282. [[CrossRef](#)]
51. Shimomura, K.; Kanamoto, T.; Kita, K.; Akamine, Y.; Nakamura, N.; Mae, T.; Yoshikawa, H.; Nakata, K. Cyclic compressive loading on 3D tissue of human synovial fibroblasts upregulates prostaglandin E2 via COX-2 production without IL-1 β and TNF- α . *Bone Jt. Res.* **2014**, *3*, 280–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Ruthenium-based assemblies incorporating tetrapyrrolylporphyrin panels : a photosensitizer delivery strategy for the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy

Manuel Gallardo-Villagrán, **Lucie Paulus**, Jean-Louis Charissoux, David Yannick Leger, Pascale Vergne-Salle, Bruno Therrien and Bertrand Liagre,

Dalton Trans **2022**, 51, 9673-9680; doi.org/10.1039/D2DT00917J

Cette deuxième étude a cette fois-ci permis l'utilisation de cages cubiques arène-Ru dans l'utilisation de la PDT pour le traitement de la PR. Sur les 5 cages testées, aucune ne présente de cytotoxicité à l'obscurité et seule la cage contenant le Co^{2+} au centre du noyau tétrapyrrolique ne montre pas de photoactivité. Il a également pu être démontré *in vitro* que l'utilisation de ces composés (excepté celui contenant le Co^{2+}) limitent potentiellement le processus inflammatoire car l'expression de COX-2 et la synthèse de PGE post-PDT s'avèrent être plus proches des échantillons témoins.

Cite this: *Dalton Trans.*, 2022, **51**,
9673

Ruthenium-based assemblies incorporating tetrapyrrolylporphyrin panels: a photosensitizer delivery strategy for the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy†

Manuel Gallardo-Villagrán,^{a,b} Lucie Paulus,^b Jean-Louis Charissoux,^c David Yannick Leger,^b Pascale Vergne-Salle,^d Bruno Therrien^e ‡^a and Bertrand Liagre*^{†,b}

Ruthenium-based assemblies containing tetrapyrrolylporphyrins (TPyP) in their structure have been evaluated as photosensitizers (PS) to treat rheumatoid arthritis (RA) by photodynamic therapy (PDT). TPyP is useless by itself as a PS due to its low solubility in biological media, however, incorporated in metallacages it can be internalized in cells. The study shows a cellular antiproliferative activity in fibroblast-like synovio-cyte (FLS) in the lower nanomolar range in the presence of light, and no dark toxicity at 1 μM concentration, thus having an excellent photoactivity index. The presence of diamagnetic (Zn^{2+}) and paramagnetic (Co^{2+}) metals in the center of TPyP impairs the effectiveness of PDT, showing no (Co) or reduced (Zn) photoactivity. A total of five metallacages with different structural characteristics have been evaluated, and our results suggest that the incorporation of PS in metalla-assemblies is not only an elegant method to increase solubility in biological media for TPyP but also appears to be an efficient hybrid system to treat RA by PDT.

Received 25th March 2022,
Accepted 29th May 2022

DOI: 10.1039/d2dt00917j

rsc.li/dalton

Introduction

Achieving a high concentration of photosensitizer (PS) in target tissues remains a challenge in photodynamic therapy (PDT). When the concentration of PS in the cells is high, the absorption of energy is increased and consequently the possibility of transferring this energy to O_2 to generate radical oxygen species (ROS) is enhanced.^{1–3} However, most synthetic photoactive compounds are poorly soluble in biological media, and to circumvent this drawback, they are often coupled to carriers. Among stratagems to transport PS, the most common is to encapsulate or bind the PS to nanoparticles.^{4–6} The use of nanoparticles not only increases the physiological solubility of

the PS but also, in the case of tumors, favours its accumulation through the enhanced permeability and retention (EPR) effect.^{6,7} Alternative systems reported to deliver PSs use dendritic micelles.⁸ Micelles not only help to transport PSs, but also largely prevent degradation before reaching their target.⁹ Low-density lipoproteins (LDLs) associated to PSs is another of the many promising delivery systems.¹⁰ LDLs have a high propensity to accumulate preferably within tumors whereby the concentration of PS in these cells can be amplified, thus enhancing the PDT effect.

In recent years, our group has demonstrated the great potential of ruthenium-based assemblies to transport PSs and other drugs to cells.^{11,12} These physiologically soluble structures have an internal cavity in which a compound of the appropriate size and lipophilicity can be hosted. In addition, the toxicity is generally low (μM range) and the stability in biological media high. Once inside cells, the PS guest can be released from the cage and activated, thus giving rise to ROS. The effectiveness *in vitro* has already been demonstrated in cancer cells.^{12,13} Herein, a different approach is used, which instead of transporting the PS inside the metallacage as a guest, the PS itself is part of the metallacage structure (Fig. 1).¹⁴ Therefore, we eliminate the need of releasing the PS from the cage once inside the cells,¹⁵ as the PS is available for irradiation at all times.

^aInstitut de Chimie, Université de Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland. E-mail: bruno.therrien@unine.ch

^bUniversité de Limoges, Laboratoire PEIRENE UR 22722, Faculté de Pharmacie, F-87025 Limoges, France. E-mail: bertrand.liagre@unilim.fr

^cService d'Orthopédie-Traumatologie, CHRU Dupuytren 2, avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France

^dService de Rhumatologie, CHRU Dupuytren 2, 16 rue Bernard Descottes, 87042 Limoges Cedex, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: UV-vis and fluorescence spectra of C1, C2, Zn-C1, Zn-C2 and Co-C2. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2dt00917j>

‡ These authors contributed equally to the work.

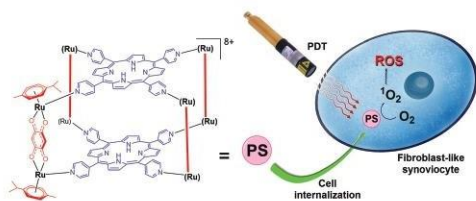


Fig. 1 Cellular uptake of physiologically soluble ruthenium metallacages containing TPYP (blue) in its structure, and subsequent PDT and production of ROS after internalization.

Compounds derived from porphyrins have already been tested in PDT to treat rheumatoid arthritis (RA) with different outcomes.^{16–21} The structure of porphyrins is based on a tetrapyrrole ring. It is a rigid structure with conjugated double bonds that allows efficient delocalization of electrons. This favours the excitation of the system by irradiation and energy transmission to another molecule, explaining its extensive use in PDT. We have used TPYP as a PS because it can be coordinated directly to dinuclear arene ruthenium(II) complexes, such as $[\text{Ru}_2(\eta^6\text{-}p\text{-}^1\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_2\text{Cl}_2(\mu\text{-C}_6\text{H}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})]$ and $[\text{Ru}_2(\eta^6\text{-}p\text{-}^1\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_2\text{Cl}_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})]$, via Ru–N_{py} bond, to give rise to cubic cages (C). We also believe that the presence of two TPYP panels per metallacages can reduce the dose necessary for PDT activity.^{22–24} Therefore, to verify the effectiveness of our arene ruthenium tetrapyrrolyporphyrin-based assemblies, we have tested five compounds with different structural features including three TPYP derivatives and two dinuclear arene ruthenium clips (Fig. 2). The benzoquinonato and oxalato dinuclear arene ruthenium clips modulate the distance between the two panels of the cube, thus modifying the structure and potentially the electronic property of the assembly. The influence of metals in the center of the tetrapyrrole ring, diamagnetic (Zn²⁺) and paramagnetic (Co²⁺), was also studied. In addition, we have carried out photocytotoxicity and inflammatory activity evaluations in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with RA. The purpose of PDT in RA is to reduce

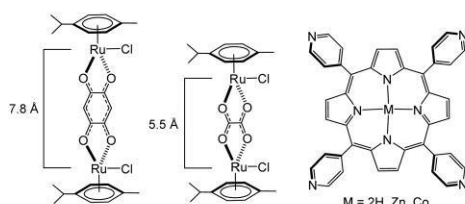


Fig. 2 The benzoquinonato and oxalato dinuclear arene ruthenium clips with the distances between the metallic atoms, as well as the structures of the TPYP porphyrin derivatives: 5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21*H*,23*H*-porphine (2*H*-TPYP), Zn(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)porphine (Zn-TPYP) and Co(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)porphine (Co-TPYP).

persistent synovitis, despite targeted biological and synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs, and to avoid surgery.^{25,26}

Materials and methods

Synthesis of compounds

Porphyrin 2*H*-TPYP was purchased from Sigma-Aldrich, while Zn-TPYP and Co-TPYP were obtained from Porphyrchem (Dijon, France), and all compounds were used as received. The metallacages $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-}p\text{-}^1\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^3\text{-}2\text{H-TPYP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_6\text{H}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (**C1**), $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-}p\text{-}^1\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-Zn-TPYP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_6\text{H}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (**Zn-C1**), $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-}p\text{-}^1\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-}2\text{H-TPYP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (**C2**), $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-}p\text{-}^1\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-Zn-TPYP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (**Zn-C2**) and $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-}p\text{-}^1\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-Co-TPYP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (**Co-C2**), were synthesized as reported in the literature.^{27,28}

The fluorescence quantum yields of the metallacages were determined using standard instruments. Fluorescence spectra (Fig. S6–S10†) were performed in dimethyl sulfoxide (DMSO) on a FLS980 spectrometer from Edinburgh Instruments (550–800 nm), using 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin dissolved in toluene as an internal reference. UV-vis spectra were carried out on a SI Analytics model UvLine 9400 (Xenon lamp) spectrophotometer (Fig. S1–S5†), in 1.5 mL polystyrene cuvettes (wavelength range 280–800 nm). Both, fluorescence and UV-vis spectra were carried out by dilution of compounds (10 nM) in DMSO, which was bought from Acros Organics and used as received.

Preparation of human synovial cells

RA synoviocytes were isolated from fresh synovial biopsies obtained from four RA patients undergoing finger arthroplasty. All patients fulfilled the 1987 American Rheumatism Association criteria for RA.²⁹ The mean age of the patients was 67.4 ± 3.2 years (range 53–81 years). The mean disease duration was 8.7 ± 2.3 years. At the time of surgery, the disease activity score (DAS 28) was greater than 3.2. These activities were approved by local institutional review boards, and all subjects gave written informed consent. Synovia were minced and digested with 1.5 mg mL^{-1} collagenase-dispase for 3–4 h at 37°C as previously described.³⁰ After centrifugation, cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% FCS, 4.5 g L^{-1} D-glucose, 25 mM HEPES, 100 U mL^{-1} penicillin, and $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin (Gibco BRL) in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO_2 at 37°C . After 48 h, nonadherent cells were removed. Adherent cells (macrophage-like and FLS) were cultured in complete medium, and at confluence, cells were trypsinized and only the FLS were passed. These cells were used between passages 4 and 8, when they morphologically resembled FLS after an indirect immunofluorescence study (see Culture of human RA FLS). RA FLS were cultured 45–60 days before experimentation. This delay allowed the elimination of all possible interactions resulting from any preoperative treatment (with nonsteroidal anti-inflammatory drugs,

analgesics, disease-modifying antirheumatic drugs, or steroids).

Culture of human RA FLS and treatment

Between passages 4 and 8, RA FLS were trypsinized. Cell count and survival rate were determined, and cells were plated in culture plates or flasks (Falcon, Oxnard, CA, USA). Survival rate, measured by trypan blue dye exclusion³¹ at the start and the end of culture, was always greater than 95%. FLS (10^5) from RA patients were used for an indirect immunofluorescence study.³² The following monoclonal antibodies were used: 5B5 (anti-prolyl hydroxylase) for fibroblasts at a 1/50 dilution (Dako, Burlingame, CA, USA), JC/70A (anti-CD31), for endothelial cells at 1/50 (Dako), and RMO52 (anti-CD14) for macrophages at 1/50 (Immunotech). The negative control was a mouse antibody of the same isotype (Immunotech). Incubations were performed at room temperature for 30 min. Binding of monoclonal antibodies was visualized using fluorescein (DTAF)-conjugated goat anti-mouse antibody (Immunotech) at a 1/50 dilution.

Antiproliferative assays

The *in vitro* evaluation was carried out under aseptic conditions. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and L-glutamine were purchased from Sigma-Aldrich. RA FLS cells were collected in fresh DMEM culture medium by trypsinization. Approximately 700 000 cells were poured in 10 ml of medium and softly homogenized. 100 μ l of this solution were added per well in a 96-well plate (7000 cells per well) and the cells were incubated for 24 h at 37 °C in the presence of 5% CO₂. Then, 100 μ l of the PS solution in increasing concentration were dispensed per row in the plate and incubated 24 h in the same conditions. The compounds were dissolved in DMSO (1 mM) just before use and then added in the culture medium in the desired concentrations. The concentration of DMSO in the cell medium was never exceeding 0.025%. After incubation, the medium was changed carefully with 100 μ l of complete medium (without red phenol). Subsequently, irradiation was performed using a red-light source, CureLight®, PhotoCure ASA at 630 nm for 30 min (dose 72 J cm⁻²). After the irradiation, the 96-well plate was incubated 18 h. After that, 10 μ l of a MTT solution (5 g l⁻¹) was added and the 96-well plate was put again inside the incubator for 4 h. Then, the media was removed and 200 μ l of DMSO added in each well, followed by stirring the plate softly for 3 min. Absorbance after the MTT assay was carried out at 540 nm by a Dynex Triad Multi Mode Microplate Reader (Dynex Technologies). The assays were executed in triplicate. Cytotoxicity evaluation in the dark was carried out by repeating the same protocol without irradiation.

Protein extraction and western-blot analysis

For total protein extraction, RA FLS were washed in PBS, and the total cell pool was centrifuged at 200g for 5 min at 4 °C and homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS,

and 20 mg mL⁻¹ of aprotinin) containing protease inhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Proteins (60 μ g) were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France), which were then probed with a cyclooxygenase-2 (COX-2) human primary antibody (Cayman Chemical, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France). After incubation with a secondary antibody (Dako France S.A. S., Trappes, France), blots were developed using the ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech) and G: BOX system (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Membranes were then reblotted with human anti- β -actin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) used as a loading control.

Assay of COX-2 activity and IL-1 β production

RA FLS were maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS, 4.5 g l⁻¹ D-glucose, 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 μ g mL⁻¹ streptomycin. The cells were grown in a humidified incubator at 37 °C in the presence of 5% CO₂. The 2×10^6 RA FLS cells were seeded in a 25 cm² flask and incubated during 24 h. Then, the volume of the PS solution to reach the IC₅₀ values was added, and the cells incubated for 24 h. The medium was removed and replaced by medium without red phenol, like previously. Then, cells were irradiated at 630 nm for 30 min (dose 72 J cm⁻²) and incubated 18 h. The non-irradiated cells were kept in the incubator the same time. After this, LPS (1 μ g mL⁻¹) was added to the medium of irradiated and non-irradiated cells, and the cells were incubated for an additional 4 h. Cells were trypsinized and culture medium supernatant isolated. The prostaglandin E₂ (PGE₂)³³ and interleukin-1 β (IL-1 β)³⁴ levels were quantified in culture media supernatants from treated and control cells by enzyme immunoassay using an ELISA Kit (Cayman Chemical and Thermo Fisher Scientific, respectively). The results were expressed by the average of three independent experiments.

Statistical analysis

All quantitative results were expressed as the mean \pm 3 standard deviations (SEM) of separate experiments using Excel (Microsoft Office, Version 2019). Statistical significance was evaluated by the two-tailed unpaired Student's *t*-test, *P*-value <0.001 (***)

Results and discussion

Structural features of ruthenium-based assemblies

The metallacages (C), which are soluble in physiological media, are synthesized by reacting dinuclear arene ruthenium complexes with tetrapyrrolylporphyrins (TPyP). Introduction of different building blocks (clips and panels) in the metallacages (Fig. 3) allows an evaluation of the influence of these modifications on the PDT effect. First, these cubic cages present three different PS (2H-TPyP, Zn-TPyP and Co-TPyP) separated

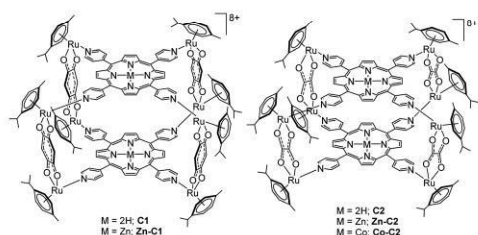


Fig. 3 Arene ruthenium metallacages used in this work. All octa-cationic assemblies were isolated as their triflate salts.

by a distance that is determined by the size of the dinuclear arene ruthenium clip (Fig. 2). Therefore, by changing the size of the ruthenium clip, we can modulate the PS separation, and determine how the distance between the two PS influences their PDT efficiency. It is known that other tetrapyrroles can give rise to aggregation phenomena, which reduces the production of singlet oxygen and then limits the production of ROS.^{35,36} This is because tetrapyrroles like porphyrin show strong π - π coupling, thanks to their planar structure. However, it was demonstrated how similar cubic metalla-assemblies with TPyP efficiently inhibit the intramolecular stacking of porphyrin blocks.³⁷ Furthermore, these compounds are positively charged (8^+), and electronic repulsion between these cationic assemblies should prevent the formation of large aggregates. These two characteristics might have a positive impact on the PDT effect.

In addition, we have used a zinc (Zn-TPyP) and a cobalt-based tetrapyrrolylporphyrin panel (Co-TPyP) to prepare analogous assemblies (**Zn-C1**, **Zn-C2** and **Co-C2**). The influence of the diamagnetic and paramagnetic metals on the PS can therefore be evaluated. It has been reported that diamagnetic metals such as Zn^{2+} can favour fluorescence and consequently reduce ROS production, worsening the efficacy of PDT.³⁸ Furthermore, paramagnetic metals such as Co^{2+} quench fluorescence due to electron transfer between the excited compound and the metal cation,³⁹ and therefore, no PDT effect should be observed for the **Co-C2** derivative. Therefore, introduction of metals within the TPyP panels can indicate if the photoactivity of the PS is modified or not when being part of a metalla-assembly.

Photocytotoxicity of metallacages

The results of the photocytotoxicity are presented in Table 1. The influence of the different structural parameters is evident and they alter the PDT effect. First of all, it is worth highlighting the excellent result obtained with **C1**, achieving the lowest IC_{50} (8 nM) (Fig. 4). To the best of our knowledge, no compound reported in the literature has showed such a low IC_{50} in PDT for RA *in vitro*. In addition, the phototoxic index (PI), the IC_{50} ratio between non-irradiated and irradiated cells, is greater than 125 (Table 1), which makes **C1** a PDT agent with high potential. In addition, the IC_{50} of **Zn-C1**, **C2** and **Zn-C2**

Table 1 Results of the MTT assays. Irradiation after 24 h of incubation with PS, $\lambda = 630$ nm, 72 J cm^{-2} for 30 min. IC_{50} values were calculated fitting the curve to a second-degree polynomial ± 3 sigma deviations. The maximum concentration tested was $1 \mu\text{M}$. Quantum yields (ϕ_F) were calculated using TPP as an internal standard at 25°C . Phototoxic index (PI) is the ratio between living cells in the dark and after irradiation

PS	IC_{50} (nM) light	IC_{50} (nM) dark	ϕ_F (%)	PI
C1	8 ± 3	>1000	0.9	>125
Zn-C1	91 ± 7	>1000	2.7	>11
C2	22 ± 7	>1000	1.7	>46
Zn-C2	185 ± 8	>1000	2.8	>5
Co-C2	>1000	>1000	0	n.d. ^a

^a Not determined (n.d.).

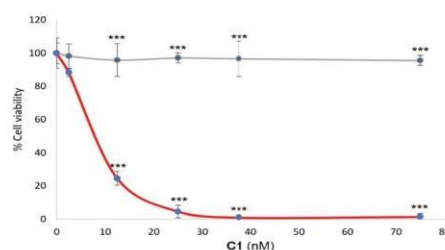


Fig. 4 MTT assays of **C1** in the dark (grey line) and after irradiation (630 nm, 72 J cm^{-2} , 30 min) in RA FLS. Statistical significance determined by the two-tailed unpaired Student's *t*-test, p -value < 0.001 (***).

are also excellent, although they are outshined by the great performance shown by **C1**. On the other hand, **Co-C2** did not show any photocytotoxic activity, as expected for $\text{Co}(\text{II})$ porphyrin derivative.³⁹ Regarding the $\text{Zn}(\text{II})$ derivatives, higher fluorescence is observed (see ESI[†]), which translates into a lower production of ROS.³⁸ Both **C1** and **C2** have a higher phototoxicity than their Zn analogues (**Zn-C1** and **Zn-C2**), the IC_{50} concentrations being more than eleven times lower for **C1** and more than eight times lower for **C2** when compared to **Zn-C1** and **Zn-C2**, respectively. It is worth noting that **C1** shows a lower fluorescence quantum yield (ϕ_F) than **C2** and the Zn-derivatives (Table 1), confirming that high ϕ_F does not necessarily translate into high phototoxicity.

The main difference between **C1** and **C2** is the distance that separate the two porphyrin units in the metallacages. The results suggest that when the distance is shorter, the PDT efficiency is reduced. The IC_{50} of **C1** and **Zn-C1**, which are built from 2,5-dioxydo-1,4-benzoquinonato spacers, are less than half the IC_{50} values of the smaller oxalato analogues, **C2** and **Zn-C2** respectively. This can be rationalized by an intramolecular energy transfer phenomena between the two porphyrin panels, thus resulting in quenching. As reported in the literature, quenching and energy transfer phenomena between photo-active molecules can appear without collision or direct contact, this phenomenon is known as Resonance Energy

Transfer (RET).⁴⁰ This energy transfer is expressed by an equation formulated by Förster, which is directly related to the distance between the photo-active molecules, and it is susceptible to small changes.⁴¹ It is established that when two PS are at short distance from each other the possibility of quenching increases significantly. The distance between the two TPYP panels is not static, since the structure can be distorted in solution.^{27,28,42} However, an approximate distance can be determined from the dinuclear arene ruthenium metallaclips (Fig. 2). In C2 and Zn-C2, the distance between the ruthenium atoms is linked to the oxalato ligand, and it is $\approx 5.5 \text{ \AA}$.⁴² On the other hand, in C1 and Zn-C1 the distance is dictated by the benzoquinonato ligand, and it is $\approx 7.8 \text{ \AA}$.⁴³ Therefore, a greater distance suggests minimal quenching, which leads to better PDT efficiency, in agreement with the results obtained. Finally, it should be noted that none of the tested compounds showed cytotoxicity in the dark at $1 \mu\text{M}$ concentration (Table 1), which is an essential characteristic for a good PS. Fig. 5 shows the comparison in RA FLS treated with C2 (22 nM), showing cellular damage in the irradiated RA FLS and no apparent changes in the non-irradiated cells.

Inflammatory study

As previously reported, PDT with porphyrin derivatives as well as other PS is susceptible to lead to overexpression of COX-2 and production of PGE₂, which could translate into inflammation in the treated tissue after therapy.³³ RA FLS give rise to cytokines such as tumor necrosis factors (TNF) and interleukins (IL), which increase COX-2 production, an enzyme that catalyzes the formation of PGE₂ from arachidonic acid.^{44,45} PGE₂ is a vasodilator that can lead to inflammation.⁴⁶ To

combat this unwanted effect, it is possible to use COX-2 inhibitors such as NS-398.³³ With this in mind, we decided to evaluate the inflammatory activity of our compounds after PDT, analyzing the expression of COX-2 in the treated cells and the production of PGE₂ and the presence of IL-1 β in the culture media. On the other hand, since the cobalt compound did not show cytotoxic activity in the MTT assays, we decided not to include this compound in the anti-inflammatory evaluation, focusing on the four most promising ruthenium-based assemblies (C1, C2, Zn-C1 and Zn-C2).

COX-2 expression

As seen in Fig. 6, these porphyrin-based compounds induce COX-2 overexpression after PDT. However, C1 shows surprising results, since the expression of COX-2 is not very different from the control experiments. Indeed, the overexpression of COX-2 was greater in the irradiated samples than in the non-irradiated ones. It should be noted that the expression of COX-2 is directly related to the results observed in the photocytotoxic evaluation. When a lower concentration is used, that is, when the IC₅₀ is lower, the overexpression of COX-2 is also lower. This suggests that by reducing the dose of the drug, one could reduce inflammatory adverse effects, while maintaining a good photoactivity.

PGE₂ production and IL-1 β level

Given the overexpression of COX-2, we can expect overproduction of PGE₂ (see Table 2). This overproduction can lead to inflammation after PDT, although as discussed above, it can be reduced or eliminated by the presence of COX-2 inhibitors. Again, it is worth noting the result of C1, whose production of PGE₂ is significantly close to that observed in the control sample. In addition, the same observation is made with the IC₅₀, although it is expected since PGE₂ is directly related to COX-2, as already mentioned.^{44,45} This again points to the fact that a lower dose of the drug might generate fewer adverse effects in PDT.

IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine and it has been reported as one of the cytokines responsible for COX-2 expression.⁴⁷ Surprisingly, IL-1 β does not appear to be directly related to the overexpression of COX-2 and overproduction of

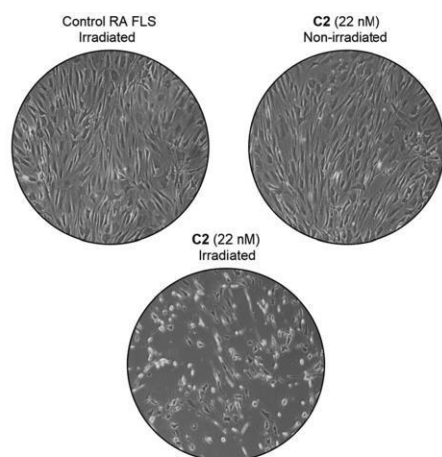


Fig. 5 Effect of PDT on RA FLS using C2 at 22 nM concentration (IC₅₀) after 24 h. Control cells 24 h after irradiation (top left), cells with C2 but not irradiated (top right), and cells with C2 and irradiation (down) (red-light 630 nm, 72 J cm⁻² for 30 min).

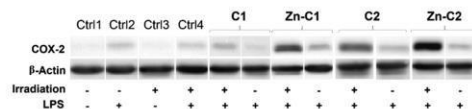


Fig. 6 Evaluation of COX-2 expression after PDT. Cells (2×10^6) were cultured in DMEM (FBS 10%, L-glutamine 1%, penicillin 100 U mL⁻¹, streptomycin 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) during 24 h and treated with the corresponding PS. After 24 h, the medium was replaced by DMEM without red phenol and irradiated at 630 nm (72 J cm⁻², 30 min). After 18 h, LPS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was added in the medium to stimulate the expression of COX-2 during 4 h. Finally, trypsinization and isolation of cells was performed. COX-2 expression was determined by western-blot using β -actin as a protein loading control. All experiments were done in triplicate. Non-irradiated cells were treated as irradiated. Control samples were treated as treated cells (see Antiproliferative assays).

Table 2 PGE₂ and IL-1 β production. The assays were performed in triplicate using the protocol provided by the ELISA kit. The data were treated as explained in this protocol. The cells were treated by PDT with each compounds as described in the experimental section. The control sample was treated exactly like others, that is, 18 h after the irradiation dose, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of LPS was added to the medium and the cells were incubated for 4 h, then trypsinized and the cells and supernatant were isolated. The results are expressed by the average of three independent experiments. The results are expressed by the average of triplicate assays \pm 3 standard deviation (SEM)

PS	PGE ₂ (pg ml ⁻¹)	IL-1 β (pg ml ⁻¹)
Ctrl	286.6 \pm 0.1	1.8 \pm 0.7
C1	352.2 \pm 21.0	2.1 \pm 0.7
Zn-C1	444.4 \pm 7.4	1.8 \pm 1.4
C2	390.0 \pm 11.8	2.0 \pm 1.2
Zn-C2	457.1 \pm 1.9	1.6 \pm 0.4
Co-C2	n.d. ^a	n.d.

^aNot determined (n.d.).

PGE₂ (Table 2). The results obtained are closed to those of the control sample. This suggests that, in our case, other cytokines are involved in this overexpression, which has also been reported in other studies.⁴⁸

Conclusions

Among the five metallacages, C1 shows the best potential as a PDT agent to treat RA synovitis, having an excellent phototoxicity (IC₅₀ = 8 nM) and a low general toxicity (IC₅₀ > 1000 nM). Moreover, as suggested by the results obtained in the inflammatory evaluation, the adverse effects associated with PDT should be significantly reduced with our compounds. Indeed, when using C1, COX-2 expression and PGE₂ production are lower and close to control samples, thus potentially limiting post-therapy joint inflammation. We have also observed that IL-1 β does not appear to be involved in the inflammation effects, indicating that other cytokines may be involved in the expression of COX-2. Overall, these results invite us to continue investigating the use of such metallacages in PDT, not only in RA, but also in other pathologies such as cancer.

Author contributions

Conceptualization, M. G.-V., B. T. and B. L.; Methodology, M. G.-V., L. P. and J.-L. C.; Validation, D. Y. L., B. T. and B. L.; Writing—original draft preparation, M. G.-V. and P. V.-S.; Writing—review and editing, B. T. and B. L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Informed consent statement

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patients for research purposes.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank all of the people involved in the project POLYTHEA, and especially Stéphanie Leroy-Lhez, Johann Bouclé, and Nidia Maldonado-Carmona for access to fluorescence equipment and for valuable discussions. Also, Aline Pinon and Dima Youssef Diab for all their help and advice during the *in vitro* evaluation.

This research was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 764837.

References

- I. J. Macdonald and T. J. Dougherty, Basic principles of photodynamic therapy, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, **5**, 105–129.
- Á. Juarraz, P. Jaén, F. Sanz-Rodríguez, J. Cuevas and S. González, Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications, *Clin. Transl. Oncol.*, 2008, **10**, 148–154.
- J. Kennedy, R. H. Pottier and D. C. Pross, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: basic principles and present clinical experience, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1990, **6**, 143–148.
- I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty and P. N. Prasad, Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug–carrier system for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7860–7865.
- S. Bouramtane, L. Bretin, A. Pinon, D. Leger, B. Liagre, L. Richard, F. Brégier, V. Sol and V. Chaleix, Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy, *Carbohydr. Polym.*, 2019, **213**, 168–175.
- L. Bretin, A. Pinon, S. Bouramtane, C. Ouk, L. Richard, M. L. Perrin, A. Chaunavel, C. Carrion, F. Brégier, V. Sol, V. Chaleix, D. Y. Leger and B. Liagre, Photodynamic therapy activity of new porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles in human colorectal cancer, *Cancers*, 2019, **11**, 1474.
- H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv. Enzyme Regul.*, 2001, **41**, 189–207.
- N. Nishiyama, Y. Morimoto, W. D. Jang and K. Kataoka, Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2009, **61**, 327–338.

- 9 C. F. van Nostrum, Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2004, **56**, 9–16.
- 10 E. Reddi, Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1997, **37**, 189–195.
- 11 B. Therrien, Transporting and Shielding Photosensitisers by Using Water-Soluble Organometallic Cages: A New Strategy in Drug Delivery and Photodynamic Therapy, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 8378–8386.
- 12 F. Schmitt, J. Freudenreich, N. P. Barry, L. Juillerat-Jeanneret, G. Süss-Fink and B. Therrien, Organometallic cages as vehicles for intracellular release of photosensitizers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 754–757.
- 13 G. Gupta, E. Denoyelle-Di-Muro, J. P. Mbakidi, S. Leroy-Lhez, V. Sol and B. Therrien, Delivery of porphyrin to cancer cells by organometallic Rh(III) and Ir(III) metalla-cages, *J. Organomet. Chem.*, 2015, **787**, 44–50.
- 14 N. P. E. Barry, O. Zava, P. J. Dyson and B. Therrien, Synthesis, Characterization and Anticancer Activity of Porphyrin-Containing Organometallic Cubes, *Aust. J. Chem.*, 2010, **63**, 1529–1537.
- 15 N. P. E. Barry, O. Zava, P. J. Dyson and B. Therrien, Excellent Correlation between Drug Release and Portal Size in Metalla-Cage Drug-Delivery Systems, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 9669–9677.
- 16 B. A. Allison, P. H. Pritchard, A. M. Richter and J. G. Levy, The plasma distribution of benzoporphyrin derivative and the effects of plasma lipoproteins on its biodistribution, *Photochem. Photobiol.*, 1990, **52**, 501–507.
- 17 K. B. Trauner, R. Gandour-Edwards, M. Bamberg, S. Shortkroff, C. Sledge and T. Hasan, Photodynamic Synovectomy Using Benzoporphyrin Derivative in an Antigen-induced Arthritis Model for Rheumatoid Arthritis, *Photochem. Photobiol.*, 1998, **67**, 133–139.
- 18 K. Trauner, R. Gandour-Edwards, M. Bamberg, N. S. Nishioka, T. Flotte, S. Autry and T. Hasan, Influence of light delivery on photodynamic synovectomy in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis, *Lasers Surg. Med.*, 1998, **22**, 147–156.
- 19 E. Torikai, Y. Kageyama, E. Kohno, T. Hirano, Y. Koide, S. Terakawa and A. Nagano, Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats, *Clin. Rheumatol.*, 2008, **27**, 751–761.
- 20 A. Hansch, O. Frey, M. Gajda, G. Susanna, J. Boettcher, R. Bräuer and W. A. Kaiser, Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints, *Lasers Surg. Med.*, 2008, **40**, 265–272.
- 21 F. Schmitt, L. Lagopoulos, P. Käuper, N. Rossi, N. Busso, J. Barge, G. Wagnières, C. Laue, C. Wandrey and L. Juillerat-Jeanneret, Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of articular joints, *J. Controlled Release*, 2010, **144**, 242–250.
- 22 S. I. Moriwaki, J. Misawa, Y. Yoshinari, I. Yamada, M. Takigawa and Y. Tokura, Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin™), *Photodermatol., Photoimmunol. Photomed.*, 2001, **17**, 241–243.
- 23 J. Usuda, H. Kato, T. Okunaka, K. Furukawa, H. Tsutsui, K. Yamada, Y. Suga, H. Honda, Y. Nagatsuka, T. Ohira, M. Tsuboi and T. Hirano, Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers, *J. Thorac. Oncol.*, 2006, **1**, 489–493.
- 24 T. J. Dougherty and S. L. Marcus, Photodynamic therapy, *Eur. J. Cancer*, 1992, **28**, 1734–1742.
- 25 M. H. Buch, Defining refractory rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, 2018, **77**, 966–969.
- 26 G. Nagy, N. M. T. Roodenrijs, P. M. J. Welsing, et al., EULAR definition of difficult-to-treat rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, 2021, **80**, 31–35.
- 27 N. P. Barry, M. Austeri, J. Lacour and B. Therrien, Highly efficient NMR enantiodiscrimination of chiral octanuclear metalla-boxes in polar solvent, *Organometallics*, 2009, **28**, 4894–4897.
- 28 A. N. Oldacre, M. R. Crawley, A. E. Friedman and T. R. Cook, Tuning the Activity of Heterogeneous Cofacial Cobalt Porphyrins for Oxygen Reduction Electrocatalysis through Self-Assembly, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 10984–10987.
- 29 F. C. Arnett, S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, T. A. Medsger, D. M. Mitchell, D. H. Neustadt, R. S. Pinals, J. G. Schaller, J. T. Sharp, R. L. Wilder and G. G. Hunder, The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatol.*, 1988, **31**, 315–324.
- 30 B. Liagre, P. Vergne-Salle, C. Corbiere, J. L. Charissoux and J. L. Beneytout, Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synovocytes with cyclooxygenase-2 overexpression, *Arthritis Res. Ther.*, 2004, **6**, 1–11.
- 31 T. T. Glant, J. J. Jacobs, G. Molnár, A. S. Shanbhag, M. Valyon and J. O. Galante, Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages, *J. Bone Miner. Res.*, 1993, **8**, 1071–1079.
- 32 C. Bonnet, P. Bertin, J. Cook-Moreau, H. Chable-Rabinovitch, R. Treves and M. Rigaud, Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells, *Prostaglandins*, 1995, **50**, 127–135.
- 33 C. Fidanz-Dugas, B. Liagre, G. Chemin, A. Perraud, C. Carrion, C. Y. Couquet, R. Granet, V. Sol and D. Y. Léger, Analysis of the in vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on prostate cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamine derivatives, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2017, **1861**, 1676–1690.
- 34 M. Gallardo-Villagrán, L. Paulus, J.-L. Charissoux, S. Sutour, P. Vergne-Salle, D. Y. Leger, B. Liagre and

- B. Therrien, Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy, *Pharmaceutics*, 2021, **13**, 2104.
- 35 C. Jing, R. Wang, H. Ou, A. Li, Y. An, S. Guo and L. Shi, Axial modification inhibited H-aggregation of phthalocyanines in polymeric micelles for enhanced PDT efficacy, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 3985–3988.
- 36 S. Tuncel, F. Dumoulin, J. Gailer, M. Sooriyaarachchi, D. Atilla, M. Durmuş, D. Bouchu, H. W. Savoie, W. R. Boyle and V. Ahsen, A set of highly water-soluble tetraethyl-ene-glycol-substituted Zn(II) phthalocyanines: synthesis, photochemical and photophysical properties, interaction with plasma proteins and in vitro phototoxicity, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 4067–4079.
- 37 X. Jiang, Z. Zhou, H. Yang, C. Shan, H. Yu, L. Wojtas, M. Zhang, Z. Mao, M. Ming Wang and P. J. Stang, Self-assembly of porphyrin-containing metalla-assemblies and cancer photodynamic therapy, *Inorg. Chem.*, 2020, **59**, 7380–7388.
- 38 A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung and K. Burgess, BODIPY dyes in photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 77–88.
- 39 V. V. Volchkov, V. L. Ivanov and B. M. Uzhinov, Induced intersystem crossing at the fluorescence quenching of laser dye 7-amino-1,3-naphthalenedisulfonic acid by paramagnetic metal ions, *J. Fluoresc.*, 2010, **20**, 299–303.
- 40 K. K. Ng and G. Zheng, Molecular interactions in organic nanoparticles for phototheranostic applications, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 11012–11042.
- 41 H. Hevekerl, T. Spielmann, A. Chmyrov and J. Widengren, Forster resonance energy transfer beyond 10 nm: exploiting the triplet state kinetics of organic fluorophores, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 13360–13370.
- 42 Y. F. Han, Y. J. Lin, L. H. Weng, H. Berke and G. X. Jin, Stepwise formation of “organometallic boxes” with half-sandwich Ir, Rh and Ru fragments, *Chem. Commun.*, 2008, **3**, 350–352.
- 43 N. P. Barry and B. Therrien, Host-guest chemistry in the hexanuclear (arene)ruthenium metalla-prismatic cage $[\text{Ru}_6(p\text{-cymene})_6(\text{tpt})_2(\text{dhnq})_3]^{6+}$, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 4695–4700.
- 44 W. H. S. Nasry, J. C. Rodriguez-Lecompte and C. K. Martin, Role of COX-2/PGE2 mediated inflammation in oral squamous cell carcinoma, *Cancers*, 2018, **10**, 348.
- 45 M. S. Sung, E. G. Lee, H. S. Jeon, H. J. Chae, S. J. Park, Y. C. Lee and W. H. Yoo, Quercetin inhibits IL-1 β -induced proliferation and production of MMPs, COX-2, and PGE₂ by rheumatoid synovial fibroblast, *Inflammation*, 2012, **35**, 1585–1594.
- 46 G. P. Downey, R. S. Gumbay, D. E. Doherty, J. F. LaBrecque, J. E. Henson, P. M. Henson and G. S. Worthen, Enhancement of pulmonary inflammation by PGE₂: evidence for a vasodilator effect, *J. Appl. Physiol.*, 1988, **64**, 728–741.
- 47 R. Newton, L. M. Kuitert, M. Bergmann, I. M. Adcock and P. J. Barnes, Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β , *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, **237**, 28–32.
- 48 K. Shimomura, T. Kanamoto, K. Kita, Y. Akamine, N. Nakamura, T. Mae, H. Yoshikawa and K. Nakata, Cyclic compressive loading on 3D tissue of human synovial fibroblasts upregulates prostaglandin E2 via COX-2 production without IL-1 β and TNF- α , *Bone Jt. Res.*, 2014, **3**, 280–288.

Dimethyl Sulfoxide : A Bio-Friendly or Bio-Hazard Chemical ? The Effect of DMSO in Human Fibroblast-like Synoviocytes

Manuel Gallardo-Villagrán, **Lucie Paulus**, David Yannick Leger, Bruno Therrien and Bertrand Liagre,

Molecules **2022**, 27, 4472; doi.org/10.3390/molecules27144472

Une dernière étude, toujours menée dans le cas de la PR s'est intéressée à l'utilisation du DMSO sur les synoviocytes. Dans cette étude, les cellules ont été isolées de biopsies auprès de 5 patients atteints de PR ayant subi des arthroplasties des doigts, des mains ou encore de la hanche. Les résultats ont permis de démontrer que l'utilisation *in vitro* du DMSO à 0,05 % pendant 24h sur les synoviocytes était possible sans impacter la viabilité cellulaire. En cas d'une exposition prolongée, un pourcentage égal à 0,01% de DMSO sera préféré. Il est important de noter que, peu importe l'origine des biopsies, cela n'impacte pas les résultats. Cette étude a ainsi montré que l'utilisation du DMSO afin de préparer des solutions mères pour un médicament peu soluble dans l'eau pour le traitement des synoviocytes de PR était réalisable.

Article

Dimethyl Sulfoxide: A Bio-Friendly or Bio-Hazard Chemical? The Effect of DMSO in Human Fibroblast-like Synoviocytes

Manuel Gallardo-Villagrán ^{1,2}, Lucie Paulus ², David Yannick Leger ², Bruno Therrien ¹ and Bertrand Liagre ^{2,*}

¹ Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland; villagran@outlook.com (M.G.-V.); bruno.therrien@unine.ch (B.T.)

² Laboratoire PEIRENE UR 22722, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, F-87025 Limoges, France; lucie.paulus@unilim.fr (L.P.); david.leger@unilim.fr (D.Y.L.)

* Correspondence: bertrand.liagre@unilim.fr

Abstract: The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) in rheumatoid arthritis (RA) human fibroblast-like synoviocytes (FLSs) has been studied on five different samples harvested from the joints (fingers, hands and pelvis) of five women with RA. At high concentrations (>5%), the presence of DMSO induces the cleavage of caspase-3 and PARP-1, two phenomena associated with the cell death mechanism. Even at a 0.5% concentration of DMSO, MTT assays show a strong toxicity after 24 h exposure (\approx 25% cell death). Therefore, to ensure a minimum impact of DMSO on RA FLSs, our study shows that the concentration of DMSO has to be below 0.05% to be considered safe.

Keywords: fibroblast-like synoviocytes; dimethyl sulfoxide; rheumatoid arthritis



Citation: Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Leger, D.Y.; Therrien, B.; Liagre, B. Dimethyl Sulfoxide: A Bio-Friendly or Bio-Hazard Chemical? The Effect of DMSO in Human Fibroblast-like Synoviocytes. *Molecules* **2022**, *27*, 4472. <https://doi.org/10.3390/molecules27144472>

Academic Editors: Albert Gandioso and Francesco Maione

Received: 30 June 2022

Accepted: 11 July 2022

Published: 13 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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

Hydrophilicity is key when designing drugs, since it helps the distribution and ensures a precise concentration. However, sometimes, the physiological solubility is poor or null, and an additional solvent is required to prepare stock solutions. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is one of the most common solvents for dissolving drugs that show low solubility in water or physiological media for in vitro and in vivo studies [1–6]. This is due to the physicochemical characteristics of this solvent (Table 1). DMSO has a high polarization, is aprotic and possesses apolar groups (Figure 1), which account for its amphiphatic nature [7]. DMSO can also pass through cell membranes and displace water, which is why it is commonly used as a cryopreservation agent [8–10]. In addition, the use of DMSO has been reported to have beneficial effects in certain diseases, such as gastrointestinal disorders [11], brain edema [12] and schizophrenia [13]. However, it is not prudent to use it lightly, since it presents drawbacks both at a chemical and biological level. At the chemical level, being a compound with a high coordinating capacity, it can lead to changes in the structure of drugs. For example, degradation and/or secondary products are often observed with metal-based compounds, and in such cases, the stability of the compounds in DMSO needs to be addressed methodically [14,15]. At the biological level, adverse effects vary enormously with experimental conditions and cell types. Although concentrations in a range of 0.1–0.5% (*v/v*) are usually recommended, there is no single criterion for DMSO concentration. It can even improve cell proliferation in small concentrations. For instance, 1.0% (*v/v*) of DMSO is enough to affect lactate dehydrogenase activity [16], more than 0.6% reduces proliferation in HepG2, MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cell lines [17], 0.01% increases proliferation in stem cells [18], 0.1% induces alterations in cardiac and hepatic cells [19] and 2% reduces the viability of human blood cells [20]. Given this lack of standardization, we decided to carry out the evaluation of DMSO toxicity in fibroblast-like synoviocytes (FLSs) from patients with rheumatoid arthritis (RA) cells, with which we currently work with and for which there is no defined criteria on the use of DMSO. In

this way, we could reliably evaluate the results of our research, confidently ruling out the significant influence of DMSO on cellular viability.

Table 1. Standard physicochemical characteristics of water (left) and DMSO (right) [21–23].

	Water	DMSO
Chemical formula	H ₂ O	C ₂ H ₆ OS
Appearance	Colorless liquid	Colorless liquid
Molecular weight	18.02	78.13
Polarity	1.000	0.444
Boiling point	100.0	189.0
Melting point	0.0	17.9
Density (g/mL)	0.9982	1.1010
Viscosity (cP) at 20 °C	1.002	1.996
Dipole moment (Debye)	1.850	3.960
Ebullioscopy constant (K·kg/mol)	0.513	3.220
Cryoscopic constant (K·kg/mol)	1.860	3.850
Specific heat at 25 °C (cal/g)	1.000	0.470
pK _a (25 °C)	14.0	35.1
Flash point (open dish, °C)	n/a	95
Dielectric constant at 20 °C	80.4	48.9
Refractive index	1.4793	1.333
Point group	C _{2v}	C _s

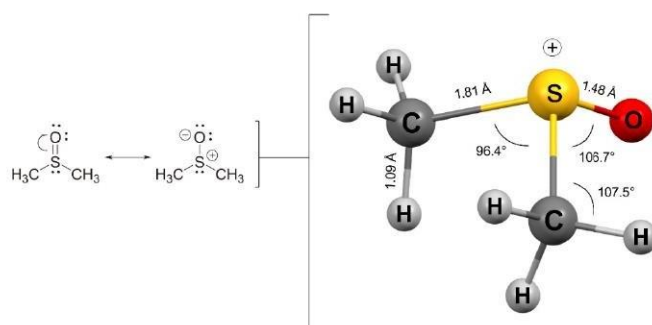


Figure 1. Formulation of the DMSO structure through a resonance hybrid (left) of the S=O double bond and the structure with a polarized S–O bond (right). This representation was more in agreement with the physical properties and reactivity observed for DMSO [22]. The angles and distances corresponded to the structure with a polarized S–O bond.

2. Results and Discussion

In order to determine the effect of DMSO on FLSs, we decided to use FLSs from five different patients with RA, and from different joints: RA FLSs from the fingers of 60-, 71- and 72-year-old women (samples 60F, 71F and 72F), RA FLSs from the hands of a 65-year-old woman (65H) and RA FLSs from the pelvis of a 69-year-old woman (69P). RA FLSs were isolated from extracted tissue in synovectomy and treated as explained in the experimental part. We first decided to find a suitable DMSO concentration range using only one of the samples (71F). To do this, we first established a wide range of concentrations and evaluated the mortality rate using flow cytometry. Next, we narrowed the range and evaluated the presence of cell death mediators using protein quantification and Western blotting. Finally, once we established a precise range of concentrations to be evaluated, antiproliferative assays (MTT) were carried out on all samples (60F, 65H, 69P, 71F and 72F).

2.1. Cell Death Evaluation

First, we performed a flow cytometry study to measure the population of alive/dead cells using a wide range of DMSO concentrations (0, 2.5, 5, 7.5 and 10%) on 71F cells. It should be noted that when using concentrations higher than 5% of DMSO, we observed that most cells were floating in the culture media 24 h after the addition of the DMSO solution. This could be indicative of damage or degradation in the cell membrane as a consequence of initial apoptotic stages and/or the downregulation of adhesion proteins located in the plasmatic membrane [24,25]. Using 7.5 and 10% of DMSO, there were no cells adhering at the bottom of the flask. The results observed in cytometry showed clear signals of high toxicity at high concentrations. While the 2.5% DMSO dose showed seven times more dead cells than the control experiment (0% DMSO), the 5% DMSO dose gave rise to thirty-five times more dead cells, forty times more dead cells with the 7.5% and forty-seven times more dead cells with the 10% DMSO concentration (Figure 2). At this point, based on the results, since our main objective was to find adequate and nontoxic concentrations of DMSO in RA FLSs, we reduced the range of the concentrations in the following tests, establishing 5% as the maximum concentration tolerated by RA FLSs.

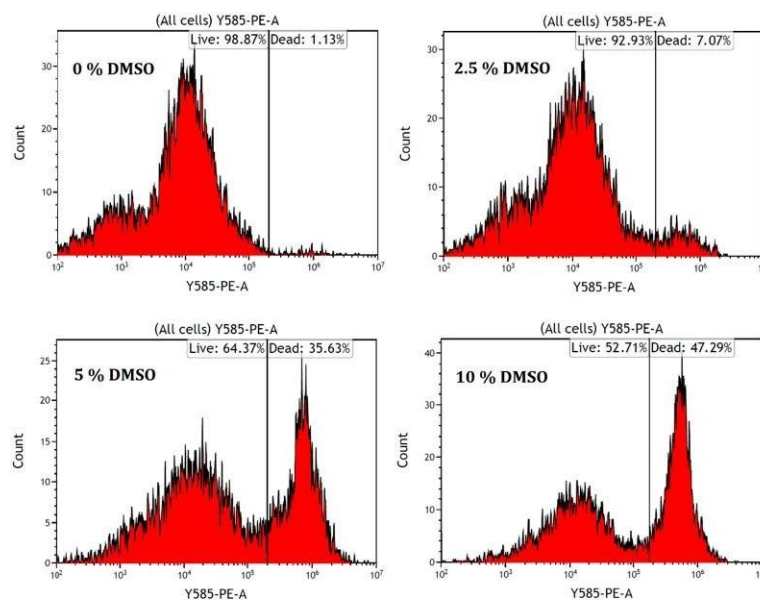


Figure 2. Graphic representation of the population of alive/dead cells determined with flow cytometry. RA FLSs were cultured and treated as described in the experimental part. Propidium iodide (PI) was used as the internal standard. No significant difference was observed with 7.5% (data not shown) and 10% DMSO.

Subsequently, we evaluated one of the main mediators of programmed cell death, the enzyme caspase-3's activity [26]. This enzyme makes the cell death process more efficient and its role in apoptosis is considered essential [27]. Caspase-3 remains inactive until it is cleaved once apoptotic signaling processes have occurred [28,29]. Increasing concentrations of DMSO were evaluated (0, 0.05, 0.5, 1, 2.5 and 5% DMSO) in 71F over a 24 h exposure. Only in the highest evaluated concentration (5%) was the cleavage of caspase-3 evidenced (Figure 3).

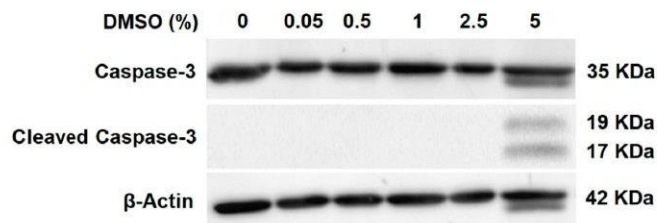


Figure 3. Identification of the presence of caspase-3 and cleaved caspase-3 using Western blot. β -actin was used as a loading control. In total, 2×10^6 RA FLSs were seeded in a 75 cm² flask and incubated 24 h at 37 °C and 5% of CO₂. After 24 h, DMSO was added and the medium homogenized gently. After 24 h, cells were trypsinized and washed with PBS. Protein extraction and Western blot were performed as described in the experimental part. All experiments were conducted in triplicate.

On the other hand, the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) family are proteins responsible for DNA repair [30]. PARP-1 perceives fractures in DNA and contributes to certain processes that lead to its reparation [31]. Caspase-3 activity is the main enzyme responsible for the cleavage and activation of PARP-1 when cell death is initiated [32]. In accordance with the results observed in the evaluation of caspase-3 activity, the 5% DMSO dose showed the cleavage of PARP-1 (Figure 4).

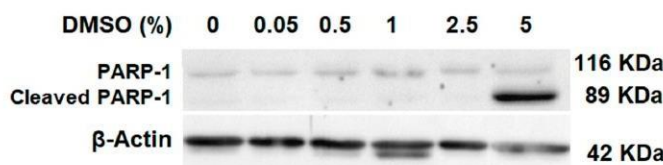


Figure 4. Identification of the presence of PARP-1 and cleavage of PARP-1 with Western blot. β -actin was used as a loading control. Same method as described for caspase-3.

Despite having no evidence of proapoptotic marker (caspase-3 or PARP-1) activity at lower concentrations, minor toxicity may still have occurred without showing signs in these tests. Nevertheless, these results helped us to determine a range to focus on during the antiproliferative assays.

2.2. Antiproliferative Assays

The antiproliferative influence of DMSO in RA FLSs was examined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assays. Looking for better precision, we narrowed the range of DMSO concentrations to 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 5%. The five different RA FLSs (60F, 71F, 72F, 65H and 69P) were evaluated. The results showed no significant differences between the RA FLSs from the five patients, regardless of age or joint (Figure 5), after 24 h exposure to DMSO. Considering the convergence of the results (Table 2), concentrations lower than 0.01% of DMSO could be considered safe in RA FLSs. For 0.05% of DMSO, approximately 1–4% of toxicity was detected (Figure 5 and Table 2). Toxicity became significant at 0.1% DMSO, as it reached approximately 5–12%. Concentrations above 0.1% should not be used, as significant toxicity was observed ($\approx 15\%$). As expected, at the 5% DMSO concentration, most of the cells were floating in the culture medium after 24 h of exposure to the solvent, suggesting apoptotic events and/or the degradation of cell membrane adhesion proteins [24,25].

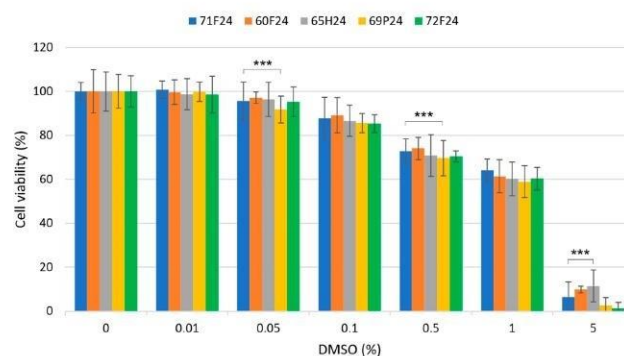


Figure 5. Results of the MTT assays in RA FLSs from the five patients after 24 h of exposure at different DMSO concentrations. Antiproliferative assays were performed as described in the experimental part. Statistical significance was evaluated with two-tailed unpaired Student's *t*-test, *p*-value < 0.001 (***).

Table 2. Results of the MTT assays carried out as described in the experimental part. The cell viability percentage is expressed as the mean of three assays \pm 3 sigma standard deviation.

Entry	DMSO (%)	60F	65H	69P	71F	72F	Average (%)
1	0	100.0 \pm 9.7	100.0 \pm 8.8	100.0 \pm 7.8	100.0 \pm 4.1	100.0 \pm 7.1	100.0 \pm 7.6
2	0.01	99.6 \pm 5.7	98.7 \pm 7.1	99.8 \pm 4.5	100.9 \pm 3.9	98.6 \pm 8.4	99.7 \pm 5.9
3	0.05	97.1 \pm 2.7	96.4 \pm 7.8	91.8 \pm 6.1	95.6 \pm 8.7	95.4 \pm 6.7	95.5 \pm 6.4
4	0.1	89.2 \pm 8.0	86.7 \pm 7.1	85.6 \pm 4.4	87.7 \pm 9.6	85.4 \pm 4.0	86.6 \pm 6.6
5	0.5	74.1 \pm 5.1	70.9 \pm 9.4	69.6 \pm 8.0	72.9 \pm 5.6	70.5 \pm 2.5	71.7 \pm 6.1
6	1	61.4 \pm 7.5	60.2 \pm 7.7	58.9 \pm 7.3	64.1 \pm 5.2	60.4 \pm 5.1	62.2 \pm 6.6
7	5	9.8 \pm 1.6	11.5 \pm 7.3	2.5 \pm 3.5	6.4 \pm 7.0	1.4 \pm 2.5	3.9 \pm 4.4

The toxicity depending on the exposure time to DMSO (24, 48 and 72 h) was also evaluated in three samples (60F, 71F and 72F). In all cases, the cells of the three patients showed a similar behavior, and this was why only the results associated with 71F were presented here. Interestingly, the results showed how the exposure time to DMSO increased the toxicity considerably (Figure 6). While a 24 h exposure using 0.01% of DMSO, or even 0.05%, can be considered safe, a longer exposure started to show significant toxicity. This was more obvious at higher concentrations, where a longer exposure time was clearly tied to higher toxicity. Therefore, 72 h exposure is not recommended when DMSO is used in vitro on FLSs.

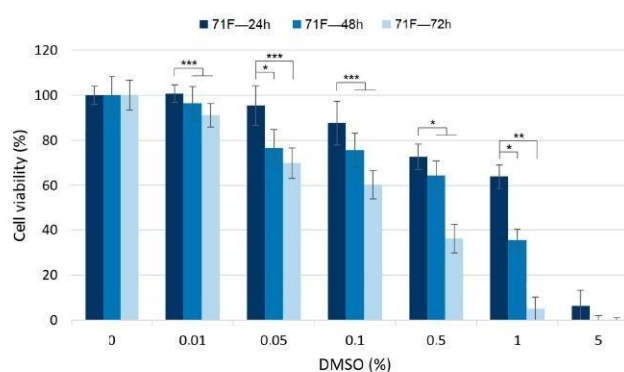


Figure 6. Results of the MTT assays in 71F RA FLSs after 24, 48 and 72 h of exposure at different DMSO concentrations. Assays were carried out as described in the experimental part. Statistical significance was evaluated with two-tailed unpaired Student's *t*-test, *p*-value < 0.001 (***), < 0.01 (**) and < 0.05 (*).

3. Conclusions

We demonstrated that DMSO can be used in human RA FLSs to a maximum of 0.05% for a 24 h exposure. For longer exposures, only 0.01% can be considered safe and nontoxic. In addition, the results suggested that DMSO toxicity does not depend on the origin of RA FLSs, since the results in the antiproliferative assays did not show significant differences between different patients and different joints. Overall, this study might help researchers working on human fibroblast-like synoviocytes to establish reliable protocols when DMSO is required for the preparation of stock solutions of a poorly water-soluble drug.

4. Materials and Methods

4.1. General

DMEM medium, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine and penicillin–streptomycin were bought from Gibco BRL. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), collagenase and dispase II were purchased from Sigma-Aldrich. Human anti- β -actin was bought from Sigma Aldrich. Caspase-3 and PARP-1 were purchased from Cell Signaling Technologies (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). All reagents used in this work were purchased from commercial sources and used without further treatment or purification.

4.2. Preparation of Human RA Fibroblast-like Synoviocytes

FLSs were extracted and isolated from fresh synovial biopsies obtained from five RA patients undergoing finger, hand and pelvis arthroplasties. All patients satisfied the 1987 American Rheumatism Association criteria for RA [33]. The mean age of the patients was 67.4 ± 4.9 years (range 60–72 years). The mean disease duration was 8.7 ± 2.3 years. At the moment of surgery, the disease activity score (DAS 28) was greater than 3.2. These scientific activities were approved by local institutional review boards, and all subjects gave written informed consent. Synovia were cut into little pieces and digested with 1.5 mg/mL collagenase–dispase for 4 h at 37 °C, as previously described [34]. After centrifugation, cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% FCS, 4.5 g/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco BRL) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% (*v/v*) CO₂. Subsequently, after 48 h, nonadherent cells were washed using phosphate-buffered saline (PBS). Adherent cells (macrophage-like and RA FLSs) were cultured in a complete DMEM medium, and, at confluence, cells were trypsinized and only RA FLSs were passed. These cells were used between passages 4 and 8, when they morphologically resembled FLSs after indirect immunofluorescence study (see subsection Culture of Human RA FLSs and Treatment). RA FLSs were cultured for 45–60 days before experimentation. This interval granted the exclusion of all possible interactions resulting from any preoperative treatment (with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, analgesics, steroids or disease-modifying antirheumatic drugs).

4.3. Culture of Human RA FLSs and Treatment

Between passages 4 and 8, RA FLSs underwent a dissociation process using trypsin. Cell count and viability were determined, and cells were plated in culture plates or flasks (Falcon, Dutscher SA, Bernolsheim, France). Viability was always greater than 95% and was measured with histological staining and exclusion using trypan blue [35], at the start and at the end of culture.

4.4. Flow Cytometry

In total, 2×10^5 RA FLSs were cultured in DMEM in a 25 cm² flask and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. Then, the desired percentage (*v/v*) of DMSO was added to the medium, carefully homogenized and the cells were incubated at the same conditions described before. After 24 h, RA FLS cells were trypsinized and added to 200 μ L of PBS. In total, 5 μ L of propidium iodide (PI) was added as internal standard. Flow cytometry was performed using a BD FACSCalibur flow cytometer.

4.5. Protein Extraction and Western Blot Assays

For total protein extraction, the RA FLSs were washed in 1 mL of PBS; then, the total cell pool was centrifuged at 4 °C at 200× *g* for 5 min. Next, it was homogenized in a radioimmunoprecipitation (RIPA) lysis buffer (50 mM HEPES ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)), pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 20 mg/mL of aprotinin) containing protease inhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. Proteins (60 µg) were separated with electrophoresis on 10% SDS-PAGE gels, transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, United Kingdom) and probed with human caspase-3 (mouse) or human PARP-1 (rabbit) antibodies. After incubation, secondary antibody blots were developed using the ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, United Kingdom) and G: BOX system (Syngene, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). Membranes were then reblotted with human anti-β-actin (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) used as a loading control.

4.6. Antiproliferative Assays

RA FLSs were trypsinized in a DMEM culture medium. Homogeneous solutions were prepared in 10 mL of medium with 7×10^5 cells. In a 96-well plate, 7000 cells per well (100 µL of the solution) were poured and the cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h of incubation, 100 µL of DMEM medium, with the desired concentration of DMSO (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 and 5%), was poured per row into the 96-well plate and then incubated for 24, 48 or 72 h in the same conditions described above. After this time, 10 µL of MTT solution (5 g/L) was added per well and the plate was then put again inside the incubator for 4 h. Following this period, the medium was removed, 200 µL of DMSO were added per well, and the plate was stirred softly for 3 min. Absorbance after the MTT assay was measured at 540 nm using a Dynex Triad Multi Mode Microplate Reader, Dynex Technologies (Chantilly, VA, USA). The assays were carried out three times.

4.7. Statistical Analysis

All quantitative results were expressed as the mean ± 3 standard deviation (SEM) of separate experiments using Excel (Microsoft Office, Version 2019, Microsoft Corporation, Washington, DC, USA). Data normalization was carried out separately between the cells of each patient, corresponding to 0% in each lineage. Statistical significance was evaluated with the two-tailed unpaired Student's *t*-test, *p*-value < 0.001 (***) and < 0.05 (*).

Author Contributions: Conceptualization, M.G.-V., B.T. and B.L.; Methodology, M.G.-V., L.P., D.Y.L. and B.L.; Writing—original draft preparation, M.G.-V. and B.T.; Writing—review and editing, B.T. and B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Union's Horizon 2020 program under the Marie Skłodowska-Curie, grant agreement no. 764837.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patients for research purposes.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank all of the people involved in the project POLYTHEA, and for the funding provided by the European Union's Horizon 2020 program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 764837.

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

References

1. Hazen, K.C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *75*, 60–63. [CrossRef] [PubMed]
2. Nazarov, A.A.; Gardini, D.; Baquié, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Serkova, T.P.; Shevtsova, E.P.; Dyson, P.J. Organometallic anticancer agents that interfere with cellular energy processes: A subtle approach to inducing cancer cell death. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 2347–2350. [CrossRef] [PubMed]
3. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.L.; Leger, D.Y.; Vergne-Salle, P.; Therrien, B.; Liagre, B. Ruthenium-based assemblies incorporating tetrapyrrolylporphyrin panels: A photosensitizer delivery strategy for the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy. *Dalton Trans.* **2022**, *51*, 9673–9680. [CrossRef] [PubMed]
4. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.L.; Sutour, S.; Vergne-Salle, P.; Leger, D.Y.; Liagre, B.; Therrien, B. Evaluation of ruthenium-based assemblies as carriers of photosensitizers to treat rheumatoid arthritis by photodynamic therapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2104. [CrossRef]
5. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Champavier, Y.; Leger, D.Y.; Therrien, B.; Liagre, B. Combination of tetrapyrrolylporphyrins and arene ruthenium (II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2021**, A–I. [CrossRef]
6. Roldán-Fidalgo, A.; Trinidad, A.; Rodríguez-Valiente, A.; García-Berrocal, J.R.; Millán, I.; Coronado, M.J.; Ramírez-Camacho, R. Effect of intratympanic dimethyl sulphoxide (DMSO) in an in vivo model of cisplatin-related ototoxicity. *Eur. Arch. Oto-Rhino Laryngol.* **2014**, *271*, 3121–3126. [CrossRef]
7. Santos, N.C.; Figueira-Coelho, J.; Martins-Silva, J.; Saldanha, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1035–1041. [CrossRef]
8. Wohnhaas, C.T.; Lepar, G.G.; Fernandez-Albert, F.; Kind, D.; Gantner, F.; Viollet, C.; Hildebrandt, T.; Baum, P. DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10699. [CrossRef]
9. Jang, T.H.; Park, S.C.; Yang, J.H.; Kim, J.Y.; Seok, J.H.; Park, U.S.; Choi, C.W.; Lee, S.R.; Han, J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr. Med. Res.* **2017**, *6*, 12–18. [CrossRef]
10. Eroglu, A.; Bailey, S.E.; Toner, M.; Toth, T.L. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biol. Reprod.* **2009**, *80*, 70–78. [CrossRef]
11. Salim, A.S. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: A new approach. *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 710–717. [CrossRef] [PubMed]
12. Ikeda, Y.; Long, D.M. Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain oedema. In *Brain Edema VIII*; Springer: Vienna, Austria, 1990; pp. 74–76. [CrossRef]
13. Smith, R.S. A comprehensive macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia. *Med. Hypotheses* **1992**, *39*, 248–257. [CrossRef]
14. Patra, M.; Joshi, T.; Pierroz, V.; Ingram, K.; Kaiser, M.; Ferrari, P.-D.D.S.; Spingler, P.-D.D.B.; Keiser, J.; Gasser, G. DMSO-Mediated Ligand Dissociation: Renaissance for Biological Activity of *N*-Heterocyclic-[Ru(η^6 -arene)Cl₂] Drug Candidates. *Eur. J. Chem.* **2013**, *19*, 14768–14772. [CrossRef] [PubMed]
15. Hall, M.D.; Telma, K.A.; Chang, K.-E.; Lee, T.D.; Madigan, J.P.; Lloyd, J.R.; Goldlust, I.S.; Hoeschele, J.D.; Gottesman, M.M. Say No to DMSO: Dimethylsulfoxide Inactivates Cisplatin, Carboplatin, and Other Platinum Complexes. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3913–3922. [CrossRef] [PubMed]
16. Rammler, D.H. The effect of DMSO on several enzyme systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1967**, *141*, 291–299. [CrossRef]
17. Nguyen, S.T.; Nguyen, H.T.L.; Truong, K.D. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed. Res. Ther.* **2020**, *7*, 3855–3859. [CrossRef]
18. Lee, H.; Park, J.B. Evaluation of the effects of dimethylsulfoxide on morphology, cellular viability, mRNA, and protein expression of stem cells culture in growth media. *Biomed. Rep.* **2017**, *7*, 291–296. [CrossRef]
19. Verheijen, M.; Lienhard, M.; Schrooders, Y.; Clayton, O.; Nudischer, R.; Boerno, S.; Timmermann, B.; Selevsek, N.; Schlapbach, R.; Gmuender, H.; et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12. [CrossRef]
20. Elisia, I.; Nakamura, H.; Lam, V.; Hofs, E.; Cederberg, R.; Cait, J.; Hughes, M.R.; Lee, L.; Jia, W.; Adomat, H.H.; et al. DMSO represses inflammatory cytokine production from human blood cells and reduces autoimmune arthritis. *PLoS ONE* **2019**, *11*, e0152538. [CrossRef]
21. Haynes, W.M.; Lide, D.R.; Bruno, T.J. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2016. [CrossRef]
22. Martin, D.; Weise, A.; Niclas, H.J. The solvent dimethyl sulfoxide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, *6*, 318–334. [CrossRef]
23. Schläfer, H.L.; Schaffernicht, W. Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel für anorganische Verbindungen. *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 618–626. [CrossRef]
24. Huang, H.-L.; Hsing, H.-W.; Lai, T.-C.; Chen, Y.-W.; Lee, T.-R.; Chan, H.-T.; Lyu, P.-C.; Wu, C.-L.; Lu, Y.-C.; Lin, S.-T.; et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* **2010**, *17*, 36. [CrossRef] [PubMed]
25. Soler, A.P.; Knudsen, K.A.; Tecson-Miguel, A.; McBrearty, F.X.; Han, A.C.; Salazar, H. Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguishes mucinous from serous and endometrioid tumors. *Hum. Pathol.* **1997**, *28*, 734–739. [CrossRef]
26. Porter, A.G.; Jänicke, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 99–104. [CrossRef] [PubMed]

References

1. Hazen, K.C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing in vitro. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *75*, 60–63. [CrossRef] [PubMed]
2. Nazarov, A.A.; Gardini, D.; Baquié, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Serkova, T.P.; Shevtsova, E.P.; Dyson, P.J. Organometallic anticancer agents that interfere with cellular energy processes: A subtle approach to inducing cancer cell death. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 2347–2350. [CrossRef] [PubMed]
3. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.L.; Leger, D.Y.; Vergne-Salle, P.; Therrien, B.; Liagre, B. Ruthenium-based assemblies incorporating tetrapyrrolylporphyrin panels: A photosensitizer delivery strategy for the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy. *Dalton Trans.* **2022**, *51*, 9673–9680. [CrossRef] [PubMed]
4. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.L.; Sutour, S.; Vergne-Salle, P.; Leger, D.Y.; Liagre, B.; Therrien, B. Evaluation of ruthenium-based assemblies as carriers of photosensitizers to treat rheumatoid arthritis by photodynamic therapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2104. [CrossRef]
5. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Champavier, Y.; Leger, D.Y.; Therrien, B.; Liagre, B. Combination of tetrapyrrolylporphyrins and arene ruthenium (II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2021**, A–I. [CrossRef]
6. Roldán-Fidalgo, A.; Trinidad, A.; Rodríguez-Valiente, A.; García-Berrocal, J.R.; Millán, I.; Coronado, M.J.; Ramírez-Camacho, R. Effect of intratympanic dimethyl sulphoxide (DMSO) in an in vivo model of cisplatin-related ototoxicity. *Eur. Arch. Oto-Rhino Laryngol.* **2014**, *271*, 3121–3126. [CrossRef]
7. Santos, N.C.; Figueira-Coelho, J.; Martins-Silva, J.; Saldanha, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1035–1041. [CrossRef]
8. Wohnhaas, C.T.; Lepar, G.G.; Fernandez-Albert, F.; Kind, D.; Gantner, F.; Viollet, C.; Hildebrandt, T.; Baum, P. DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10699. [CrossRef]
9. Jang, T.H.; Park, S.C.; Yang, J.H.; Kim, J.Y.; Seok, J.H.; Park, U.S.; Choi, C.W.; Lee, S.R.; Han, J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr. Med. Res.* **2017**, *6*, 12–18. [CrossRef]
10. Eroglu, A.; Bailey, S.E.; Toner, M.; Toth, T.L. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biol. Reprod.* **2009**, *80*, 70–78. [CrossRef]
11. Salim, A.S. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: A new approach. *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 710–717. [CrossRef] [PubMed]
12. Ikeda, Y.; Long, D.M. Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain oedema. In *Brain Edema VIII*; Springer: Vienna, Austria, 1990; pp. 74–76. [CrossRef]
13. Smith, R.S. A comprehensive macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia. *Med. Hypotheses* **1992**, *39*, 248–257. [CrossRef]
14. Patra, M.; Joshi, T.; Pierroz, V.; Ingram, K.; Kaiser, M.; Ferrari, P.-D.D.S.; Spingler, P.-D.D.B.; Keiser, J.; Gasser, G. DMSO-Mediated Ligand Dissociation: Renaissance for Biological Activity of *N*-Heterocyclic-[Ru(η^6 -arene)Cl₂] Drug Candidates. *Eur. J. Chem.* **2013**, *19*, 14768–14772. [CrossRef] [PubMed]
15. Hall, M.D.; Telma, K.A.; Chang, K.-E.; Lee, T.D.; Madigan, J.P.; Lloyd, J.R.; Goldlust, I.S.; Hoeschele, J.D.; Gottesman, M.M. Say No to DMSO: Dimethylsulfoxide Inactivates Cisplatin, Carboplatin, and Other Platinum Complexes. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3913–3922. [CrossRef] [PubMed]
16. Rammler, D.H. The effect of DMSO on several enzyme systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1967**, *141*, 291–299. [CrossRef]
17. Nguyen, S.T.; Nguyen, H.T.L.; Truong, K.D. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomed. Res. Ther.* **2020**, *7*, 3855–3859. [CrossRef]
18. Lee, H.; Park, J.B. Evaluation of the effects of dimethylsulfoxide on morphology, cellular viability, mRNA, and protein expression of stem cells culture in growth media. *Biomed. Rep.* **2017**, *7*, 291–296. [CrossRef]
19. Verheijen, M.; Lienhard, M.; Schrooders, Y.; Clayton, O.; Nudischer, R.; Boerno, S.; Timmermann, B.; Selevsek, N.; Schlapbach, R.; Gmuender, H.; et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12. [CrossRef]
20. Elisia, I.; Nakamura, H.; Lam, V.; Hofs, E.; Cederberg, R.; Cait, J.; Hughes, M.R.; Lee, L.; Jia, W.; Adomat, H.H.; et al. DMSO represses inflammatory cytokine production from human blood cells and reduces autoimmune arthritis. *PLoS ONE* **2019**, *11*, e0152538. [CrossRef]
21. Haynes, W.M.; Lide, D.R.; Bruno, T.J. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2016. [CrossRef]
22. Martin, D.; Weise, A.; Niclas, H.J. The solvent dimethyl sulfoxide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, *6*, 318–334. [CrossRef]
23. Schläfer, H.L.; Schaffernicht, W. Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel für anorganische Verbindungen. *Angew. Chem.* **1960**, *72*, 618–626. [CrossRef]
24. Huang, H.-L.; Hsing, H.-W.; Lai, T.-C.; Chen, Y.-W.; Lee, T.-R.; Chan, H.-T.; Lyu, P.-C.; Wu, C.-L.; Lu, Y.-C.; Lin, S.-T.; et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* **2010**, *17*, 36. [CrossRef] [PubMed]
25. Soler, A.P.; Knudsen, K.A.; Tecson-Miguel, A.; McBrearty, F.X.; Han, A.C.; Salazar, H. Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguishes mucinous from serous and endometrioid tumors. *Hum. Pathol.* **1997**, *28*, 734–739. [CrossRef]
26. Porter, A.G.; Jänicke, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 99–104. [CrossRef] [PubMed]

VI.1. Article 4

The effect of photosensitizers metalation incorporated in arene-ruthenium assemblies on prostate cancer

Lucie Paulus, Manuel Gallardo-Villagrán, Claire Carrion, Catherine Ouk, Frédérique Martin, Bruno Therrien, David Yannick Leger and Bertrand Liagre,

Int. J. Mol. Sci **2023**, *24*(17), 13614; doi.org/10.3390/ijms241713614

L'intérêt du traitement du CaP ainsi que les problématiques lui étant liés ont été précédemment mis en évidence. Ces travaux ont donc mis en évidence l'utilisation de différentes cages prismatiques ou cubiques utilisées sur les lignées DU145 et PC-3. L'objectif principal était de tester la cytotoxicité de ces différentes cages vectorisant différents PS. Dans un deuxième temps, nous voulions voir si l'ajout de métaux diamagnétiques ou paramagnétiques au sein des noyaux tétrapyrroliques exerçait une influence positive ou négative quant à leur efficacité *in vitro*. Des tests antiprolifératifs ont mis en évidence l'efficacité des composés de l'ordre du nanomolaire excepté pour le composé Co-TPyP ne présentant aucune cytotoxicité aux concentrations utilisées. L'augmentation de la production des EROs après photoactivation a bien été démontrée. Les différents composés sont internalisés par les cellules excepté pour le Co-TPyP expliquant ainsi son absence d'efficacité. De plus, les autres composés utilisés semblent localisés dans le cytoplasme. Après photoactivation, l'étude de la voie apoptotique démontre une diminution d'expression de la pro-caspase 3 corrélée à un clivage de la PARP, suivi de la fragmentation de l'ADN.

En conclusion, ce travail montre l'efficacité de la majorité des composés, excepté pour le Co-TPyP n'ayant aucun effet sur les deux lignées cellulaires utilisées. Il est à noter que l'ajout de Zn ou de Mg au cœur des PS entraîne une diminution de leur activité.

L'utilisation des composés actifs sur un modèle pré-clinique sur la souris permettrait de valider leur efficacité en PDT.



Article

The Effect of Photosensitizer Metalation Incorporated into Arene–Ruthenium Assemblies on Prostate Cancer

Lucie Paulus ¹, Manuel Gallardo-Villagrán ^{1,2}, Claire Carrion ³, Catherine Ouk ³, Frédérique Martin ¹, Bruno Therrien ² , David Yannick Léger ^{1,†} and Bertrand Liagre ^{1,*}

- ¹ Univ. Limoges, LABCI, UR 22722, Faculté de Pharmacie, F-87000 Limoges, France; lucie.paulus@etu.unilim.fr (L.P.); villagran@outlook.com (M.G.-V.); frederique.martin@unilim.fr (F.M.); david.leger@unilim.fr (D.Y.L.)
- ² Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland; bruno.therrien@unine.ch
- ³ Univ. Limoges, CNRS, Inserm, CHU Limoges, BISCEM, UAR 2015, US 42, F-87000 Limoges, France; claire.carrion@unilim.fr (C.C.); catherine.ouk@unilim.fr (C.O.)
- * Correspondence: bertrand.liagre@unilim.fr
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Paulus, L.; Gallardo-Villagrán, M.; Carrion, C.; Ouk, C.; Martin, F.; Therrien, B.; Léger, D.Y.; Liagre, B. The Effect of Photosensitizer Metalation Incorporated into Arene–Ruthenium Assemblies on Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13614. <https://doi.org/10.3390/ijms241713614>

Academic Editor: Philippe Pounquier

Received: 27 July 2023
Revised: 21 August 2023
Accepted: 29 August 2023
Published: 2 September 2023



Copyright: © 2023 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/>).

Abstract: Prostate cancer is the second most common cancer for men and a major health issue. Despite treatments, a lot of side effects are observed. Photodynamic therapy is a non-invasive method that uses photosensitizers and light to induce cell death through the intramolecular generation of reactive oxygen species, having almost no side effects. However, some of the PSs used in PDT show inherent low solubility in biological media, and accordingly, functionalization or vectorization is needed to ensure internalization. To this end, we have used arene–ruthenium cages in order to deliver PSs to cancer cells. These metalla-assemblies can host PSs inside their cavity or be constructed with PS building blocks. In this study, we wanted to determine if the addition of metals (Mg, Co, Zn) in the center of these PSs plays a role. Our results show that most of the compounds induce cytotoxic effects on DU 145 and PC-3 human prostate cancer cells. Localization by fluorescence confirms the internalization of the assemblies in the cytoplasm. An analysis of apoptotic processes shows a cleavage of pro-caspase-3 and poly-ADP-ribose polymerase, thus leading to a strong induction of DNA fragmentation. Finally, the presence of metals in the PS decreases PDT's effect and can even annihilate it.

Keywords: prostate cancer; photodynamic therapy; photosensitizers; arene–ruthenium complexes; apoptosis

1. Introduction

In 2020, prostate cancer (PCa) was the second most commonly occurring cancer in men and the fourth most common cancer overall. With more than 1.4 million new cases and 375,000 deaths recorded worldwide, PCa is the fifth most deadly cancer among men [1]. Following the detection, and depending on the grade and stage of the cancer, the patients are offered different treatments. If the cancer is detected early, the choice of treatment is oriented toward active surveillance or chemotherapy. Otherwise, for advanced cancer, a surgical approach with radical prostatectomy (partial or total removal of the prostate), which can be coupled to external radiotherapy or hormonal therapy, is preferred [2]. Today, those treatments coupled with early detection allow good management of the disease. Despite therapeutic advances, cancer relapse and many side effects such as pain and urinary or erectile dysfunctions are often observed [3,4]. Therefore, improving the patient's quality of life while preserving the surrounding healthy tissues remains a priority. For these reasons, photodynamic therapy (PDT) could play an important role, thanks to its minimal invasiveness and high precision of treatment [5–7].

Indeed, PDT appears to be a promising alternative, showing a reduction in side effects during clinical trials [8,9]. The molecular mechanism of PDT resides in the interaction between three main actors: a photosensitizer (PS), a light source with an appropriate wavelength to excite the PS, and molecular oxygen. In PDT, the PS is activated by light, reaching an excited singlet state (S_1). In that state, the PS is very unstable and loses its excess energy as it returns to its ground state (S_0) or to a triplet state (T_1). During this long-lived excited triplet state, the PS gradually returns to the ground state through type I or type II photochemical reactions. For type I reactions, the PS (T_1) reacts with a biological substrate via hydrogen or electron transfer, thus leading to the production of free radical species. These species can react with O_2 and induce superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical formation ($\bullet OH$), or hydrogen peroxide (H_2O_2) production. For type II reactions, the PS (T_1) transfers its energy directly to O_2 , inducing singlet oxygen (1O_2) production (Figure 1). Overall, PDT kills cells based on the generation of reactive oxygen species (ROS), which leads to cellular toxicity upon reaction with cellular molecules (lysosomes, DNA, mitochondria, etc.) [10]. Actually, tetrapyrrole compounds such as porphyrins, chlorins, bacteriochlorins, and phthalocyanines are the most commonly used PSs in PDT [11,12].

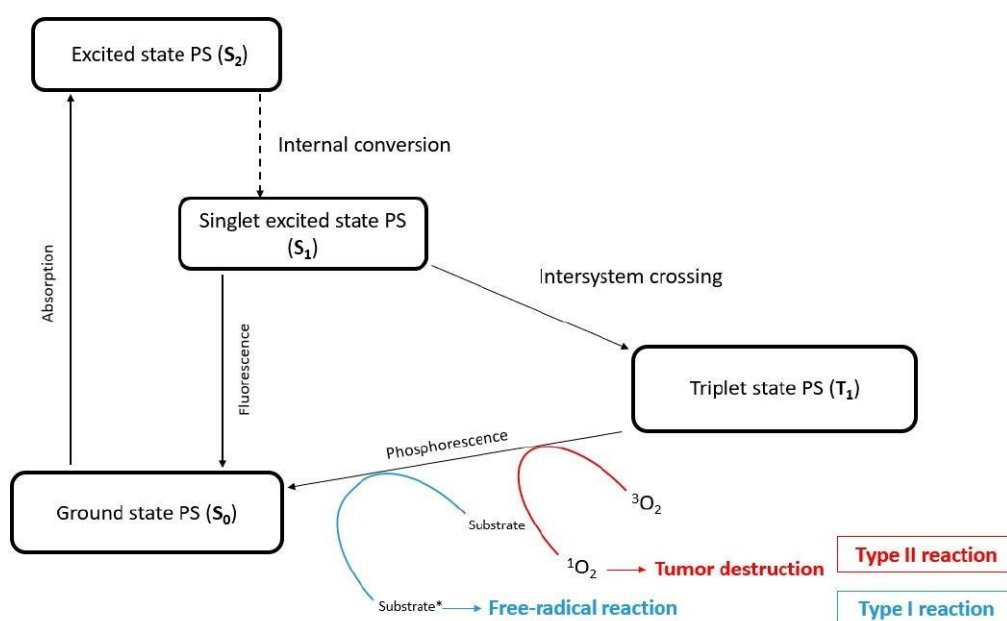


Figure 1. Representation of the Jablonski diagram. Upon light absorption, the PS moves from its ground state (S_0) to an excited state (S_2), then by internal conversion to a lower-energy singlet excited state (S_1), and finally by intersystem transition to a triplet state (T_1). Substrate*: substrate ions and radicals.

Despite all these benefits, PDT has some drawbacks, like the poor solubility of PSs in water and biological media, as well as PS aggregation and restricted tumor selectivity. Taken together, these drawbacks limit the use of standard PSs in clinical protocols. To increase the bioavailability of PSs, several new drug delivery systems are emerging through the vectorization of PSs in order to increase internalization into cells. PSs can be conjugated to polyamine, because tumor cells have a high production of polyamine and polyamine transport systems (PTS), leading to strong anticancer efficacy [13]. Nanoparticles (NPs) are

also used to transport PSs in solid tumors through passive targeting and show a strong potential for clinical use. Nevertheless, functionalization and/or vectorization are often used to optimize water solubility and increase the internalization of PSs [14–17].

Another strategy to treat cancer consists of using metal-based therapeutic agents. Metals in bioinorganic chemistry can trigger different mechanisms, modify toxicity, and provide structural diversity. Ruthenium (Ru) anticancer agents, in particular, which are less toxic than other heavy metals (like platinum) [18], are receiving a lot of attention. The application of Ru is not new since its toxicity, anticancer, antimetastatic, and antiangiogenic properties have already been highlighted [19,20]. Moreover, Ru can bind to transferrin receptors in order to enter cells, and because cancer cells contain a high transferrin receptor density, Ru accumulates preferentially into tumors [21]. Therefore, it is not surprising that Ru and PSs have been combined for PDT applications.

Merging Ru and PSs can be carried out in different ways. The metal can be introduced at the core of the photosensitizer [22] or at its periphery [23].

Another way to combine Ru and PSs is to prepare water-soluble organometallic metallacages as hosts to deliver the PS to cancer cells or to use multidentate PSs to construct Ru-based assemblies [24]. In our study, two different types of arene Ru assemblies as carriers for PSs were prepared. One is a prismatic metallacage (**C3** Figure 2), which can host a PS as a guest in its internal cavity, transporting and releasing the PS into the cells, while the others are cubic metalla-assemblies (**C1** and **C2** Figure 3), in which two PSs are part of the structure [25,26].

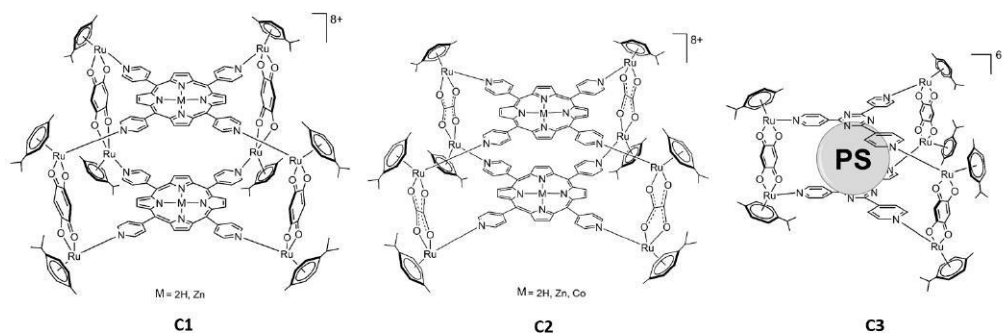


Figure 2. Structures of the Ru metalla-assemblies used in this work. TPyP and Zn-TPyP in **C1** and TPyP, Zn-TPyP, and Co-TPyP in **C2**. Photosensitizers are represented by a sphere (PS). Por and Mg-Por were inserted into **C3**.

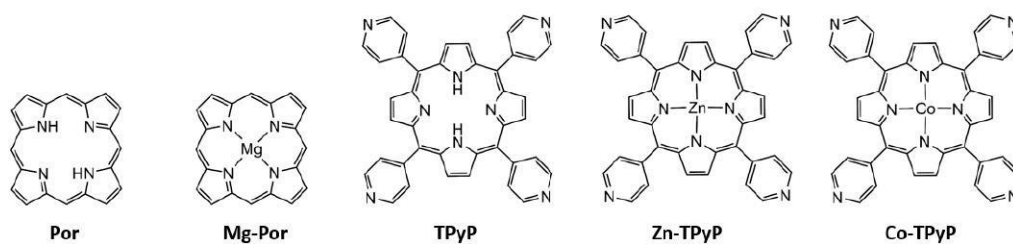


Figure 3. Photosensitizers used in this study. From left to right, 21H, 23H-porphine (**Por**), Mg(II)-porphine (**Mg-Por**), 5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**TPyP**), Zn(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**Zn-TPyP**), and Co(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (**Co-TPyP**).

In addition, the influence of the metalation of the PS on the PDT activity of these metalla-assemblies was studied by introducing diamagnetic metals (Zn^{2+} or Mg^{2+}) or a paramagnetic metal (Co^{2+}) at the core of the PS (Figure 3).

First of all, we tested the anticancer efficacy of all compounds on two human prostate cancer cell lines (DU 145 and PC-3) before investigating if metalation led to a decrease or an increase in photoactivity. We observed the strong anticancer efficacy of all compounds except for one. We also found that the addition of metals in the PS does not increase efficiency but rather reduces the photoactivity. Because PDT is based on ROS production, we demonstrated anticancer efficiency through ROS production only after the photoactivation of the compounds. Moreover, to better understand the cell death process involved, we analyzed the apoptotic pathway leading to anticancer efficiency.

2. Results

2.1. Cytotoxic and Phototoxic Effects

In order to determine the phototoxicity of our compounds *in vitro*, two human PCA cell lines (DU 145 and PC-3) were used. Cells were exposed or not to PDT with red irradiation and phototoxic effects were determined 24h post-PDT using an MTT assay. All of the seven compounds tested had no toxic effects in the dark on both cell lines (Figure 4 and Figure S1). The IC_{50} values were calculated for all compounds (Figure 4 and Figure S1). We also evaluated the effectiveness of our compounds by determining the photoindex (PI) of the compounds (IC_{50} without irradiation/ IC_{50} with irradiation) (Table 1). The IC_{50} without irradiation was not reached at the concentrations tested, except for **Mg-Por-C3** in DU145 cells. Almost all of the compounds induced a strong decrease in cell viability in a dose-dependent manner when irradiated, except **Co-TPyP-C2**, which showed no effect on both cell lines even at 4 μ M (Figure 4).

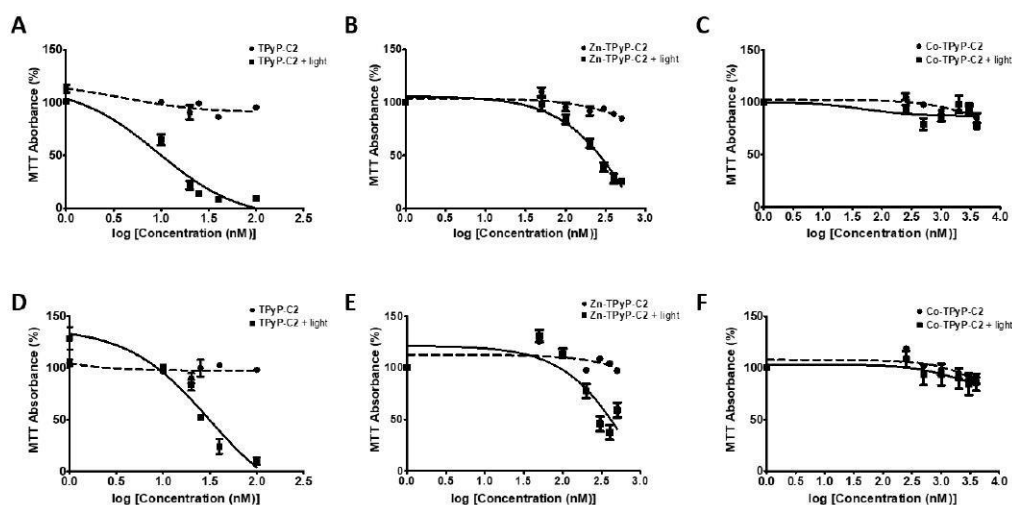


Figure 4. Phototoxicity of PSs on human prostate cancer cell lines. Cells were cultured in RPMI medium for 24 h. DU 145 were treated or not with compounds (A) TPyP-C2, (B) Zn-TPyP-C2, (C) Co-TPyP-C2 and PC-3, (D) TPyP-C2, (E) Zn-TPyP-C2, or (F) Co-TPyP-C2 for 24 h. Cells were irradiated (630 nm, 75 J/cm²) or kept in the dark. Compound toxicity at 24 h was followed by an MTT assay and IC_{50} values were calculated. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3).

Table 1. IC₅₀ values (nM) determined with MTT assays on DU 145 and PC-3 cells. PI = IC₅₀ without irradiation/IC₅₀ with irradiation. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). Not determined (n.d.).

Compounds	DU 145			PC-3		
	IC ₅₀ (nM) Light	IC ₅₀ (nM) Dark	PI	IC ₅₀ (nM) Light	IC ₅₀ (nM) Dark	PI
TPyP-C1	14 ± 4	>100	>7	53 ± 6	>100	>1
Zn-TPyP-C1	302 ± 29	>500	>1	300 ± 19	>500	>1
TPyP-C2	13 ± 2	>100	>7	28 ± 2	>100	>3
Zn-TPyP-C2	252 ± 31	>500	>1	332 ± 84	>500	>1
Co-TPyP-C2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Por-C3	504 ± 44	>4000	>7	633 ± 88	>4000	>4
Mg-Por-C3	1368 ± 130	2133 ± 690	>2	2181 ± 460	>4000	=1.5

We observed that **TPyP-C1** was much more efficient than **Zn-TPyP-C1**, particularly for DU 145 cells, with an IC₅₀ of 14 nM compared to 302 nM, respectively, and showing a very good PI of >7. Similar results were observed in PC-3 cells with respective IC₅₀ values of 53 and 300 nM. For **C2**, similar results were observed, with a better efficiency of **TPyP-C2** than **Zn-TPyP-C2** in DU 145 cells (13 nM and 252 nM) with a PI of >7 for **TPyP-C2**. Alike results were observed for PC-3 (28 nM and 332 nM) with a PI of >3 for **TPyP-C2**. Regarding **C3**, **Por-C3** demonstrated a much better efficiency than **Mg-Por-C3**. Indeed, in DU145 cells, the IC₅₀ for **Por-C3** was 504 nM compared to 1368 nM for **Mg-Por-C3**, while on PC-3 cells, the IC₅₀ was 633 nM and 2181 nM, respectively.

Taken together, these results indicate that the presence of two PSs per metallacage can reduce the dose necessary for PDT activity (**C1** and **C2** compared to **C3**) (Figure S1). Furthermore, we proved that metal-free PSs (**TPyP-C1**, **TPyP-C2**, and **Por-C3**) are far more effective than compounds with metalated PSs (**Zn-TPyP-C1**, **Zn-TPyP-C2**, and **Mg-Por-C3**).

For most of the following experiments, compounds were used at the IC₅₀ values determined upon irradiation.

2.2. ROS Production

Cell death through PDT generally occurs via the generation of intracellular ROS. Therefore, intracellular ROS levels using DCFDA staining after PDT were measured. Flow cytometry analyses show that after photoactivation, cells exposed to the compounds have enhanced intracellular ROS levels. Moreover, a greater ROS production in **TPyP-C1**+light than **Zn-TPyP-C1**+light is observed in both cell lines, suggesting that metalation reduces ROS production (Figures S2 and S3). When looking at **C2**, the results are different. Indeed, there is no significant difference between **TPyP-C2** and **Zn-TPyP-C2** in ROS production. There is still a difference between **TPyP-C2**+light and **Zn-TPyP-C2**+light compared to **Co-TPyP-C2**+light, which shows worse ROS production: 45% of positive gated in PC-3 cells (Figure 5). Regarding the third cage (**C3**), **Mg-Por-C3**+light leads to a decrease in ROS production compared to **Por-C3**+light in PC-3 cells (41% compared to 88%) (Figures S2 and S3).

Those results coincide with the phototoxicity of our compounds, in fact, metalation leads to decreased ROS production, especially for **Zn-TPyP-C1**, **Co-TPyP-C2**, and **Mg-Por-C3** (on PC-3 cells only). A shorter distance between the two PSs leads to a decrease in cytotoxicity, but no change in ROS production. The same results were observed in the DU 145 cell line except for **Mg-Por-C3**+light, which showed no significant difference from **Por-C3**+light.

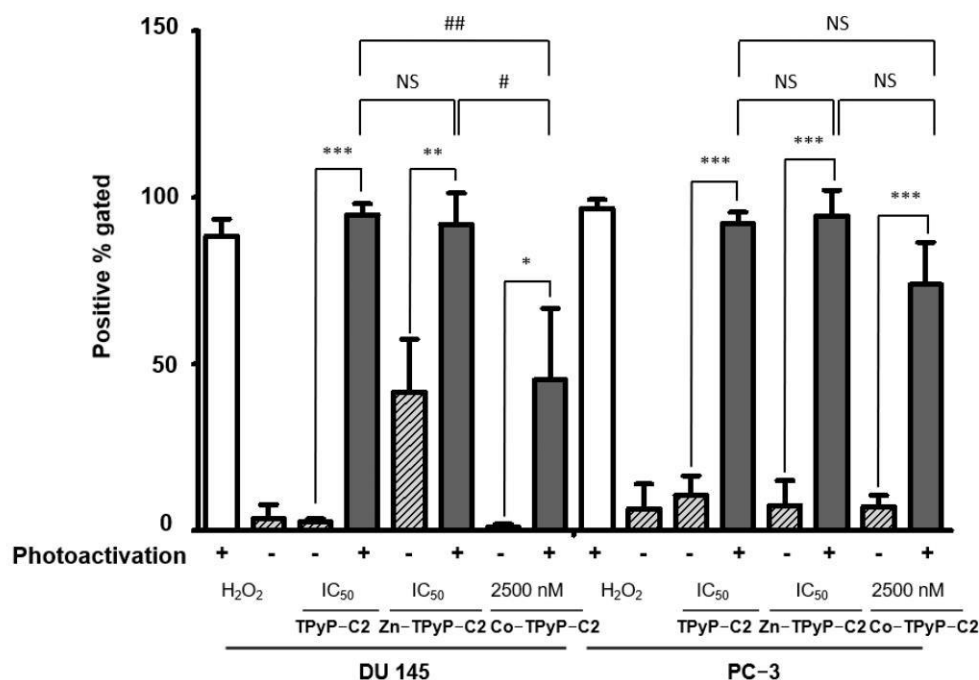


Figure 5. Induced ROS production in human prostate cancer cell lines PC-3 (right) and DU 145 (left). Cells were treated with compounds and photoactivated or not. Intracellular ROS levels using DCFDA staining were measured directly after PDT by flow cytometry. A higher fluorescence intensity resulting from a higher amount of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) formation results in a shift to the right. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ relative to H₂O₂ or # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ relative to compounds; NS: not significant.

2.3. Confocal Microscopy Analysis

For confocal microscopy analysis, the compounds were used at a concentration near the IC₅₀ observed after irradiation. All compounds possess natural fluorescence in the red or infrared region [25–27]. Red fluorescence was clearly observed in the cytoplasm, indicating cellular internalization of the compounds in both cell lines except for Co-TPyP-C2 (Figure 6). In order to see if compounds co-localized with organelles, cells were also co-treated with LysoTracker, MitoTracker, or EndoplasmicReticulum-Tracker (ER-Tracker). The results show that TPyP-C2 and Zn-TPyP-C2 do not co-localize with organelles (no yellow fluorescence) (Figure 6). Similar results were observed for other compounds (Figure S4) and they seem to be localized only in the cytoplasm, while Co-TPyP-C2 was not internalized at all. These data suggest that all compounds (except Co-TPyP-C2) were taken up by both cell lines with excellent internalization.

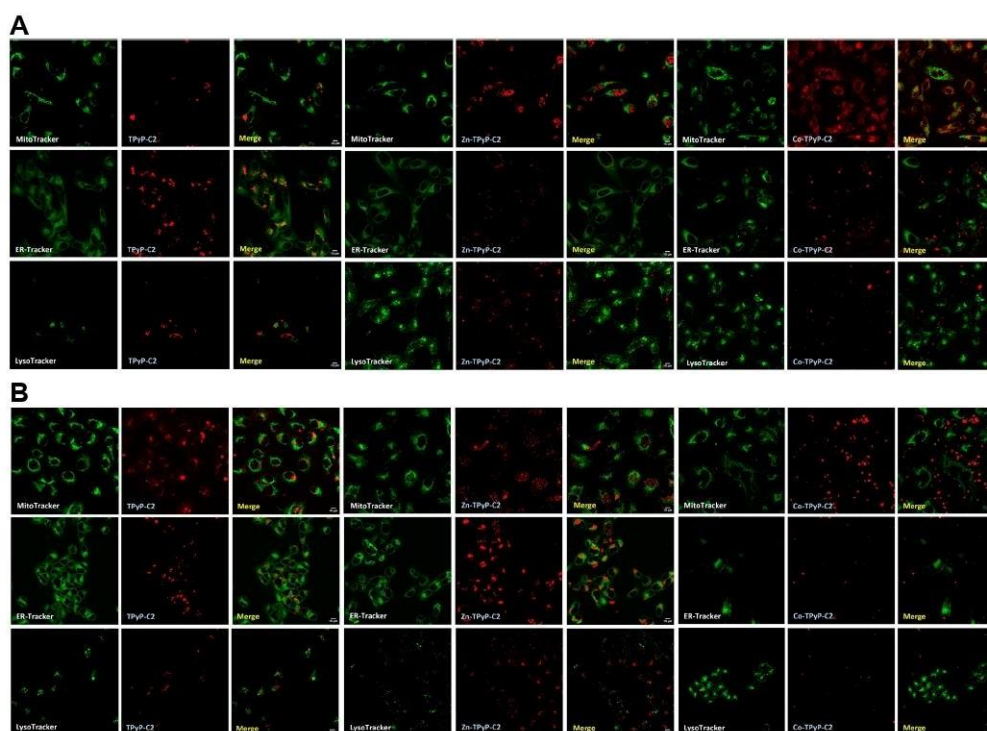


Figure 6. Localization of the C2 series on human prostate cancer cells. DU 145 (A) and PC-3 (B) were grown for 24 h prior to exposure to TPpP-C2, Zn-TPpP-C2, or Co-TPpP-C2 at IC_{50} values. After 24 h cells were treated with MitoTracker, ER-Tracker, or LysoTracker for 45, 30 min, and extemporaneously, respectively. Localization was studied by confocal microscopy and photos were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta— $\times 1000$).

2.4. Apoptosis and DNA Fragmentation

Because apoptosis is often involved in PDT treatments, we evaluated apoptosis effects at higher concentrations (10 times the IC_{50} for TPpP-C1 or C2, 8 times the IC_{50} for Por-C3 and Zn-TPpP-C2, and 3 or 2 times the IC_{50} for Zn-TPpP-C1 and Mg-Por-C3, respectively) in order to have a better response. Western blotting was performed on apoptotic-related proteins pro-caspase-3 and its cleaved form as well as native poly-ADP-ribose polymerase (PARP-1) and its cleaved form. In the case of PARP-1, it is involved in the late apoptosis pathway.

First, for the C1 series, the results show that there was no significant decrease in pro-caspase-3 on the PC-3 cell line for TPpP-C1 and no cleaved caspase-3. However, TPpP-C1 induced a major cleavage of PARP-1 at 9.5-fold at a higher concentration (150 nM) after photoactivation. Similar results were observed for Zn-TPpP-C1 at 2-fold only for cleaved PARP-1 on PC-3 cells. On the other hand, on DU 145 cells, a strong cleavage of pro-caspase-3 was spotted for Zn-TPpP-C1 (77-fold) at a very high concentration (1000 nM). Likewise, PARP-1 cleavage was higher for Zn-TPpP-C1 at 30-fold compared to 5-fold for TPpP-C1 at 1000 nM (Figure S5).

Next, for the C2 group, TPpP-C2 and Zn-TPpP-C2 were identified as good inducers of apoptosis at higher concentrations through PARP-1 cleavage at 5.4-fold and 4.6-fold, respectively (Figure 7A). Again, on DU 145 cells, a very strong cleavage of pro-caspase-3

was observed at 9-fold for **TPyP-C2** using a higher concentration related to the cleavage of PARP-1 at 21-fold for **TPyP-C2** and a lower cleavage for **Zn-TPyP-C2** (Figure 7B). As expected, and unlike the other compounds, **Co-TPyP-C2** showed no evidence of apoptosis.

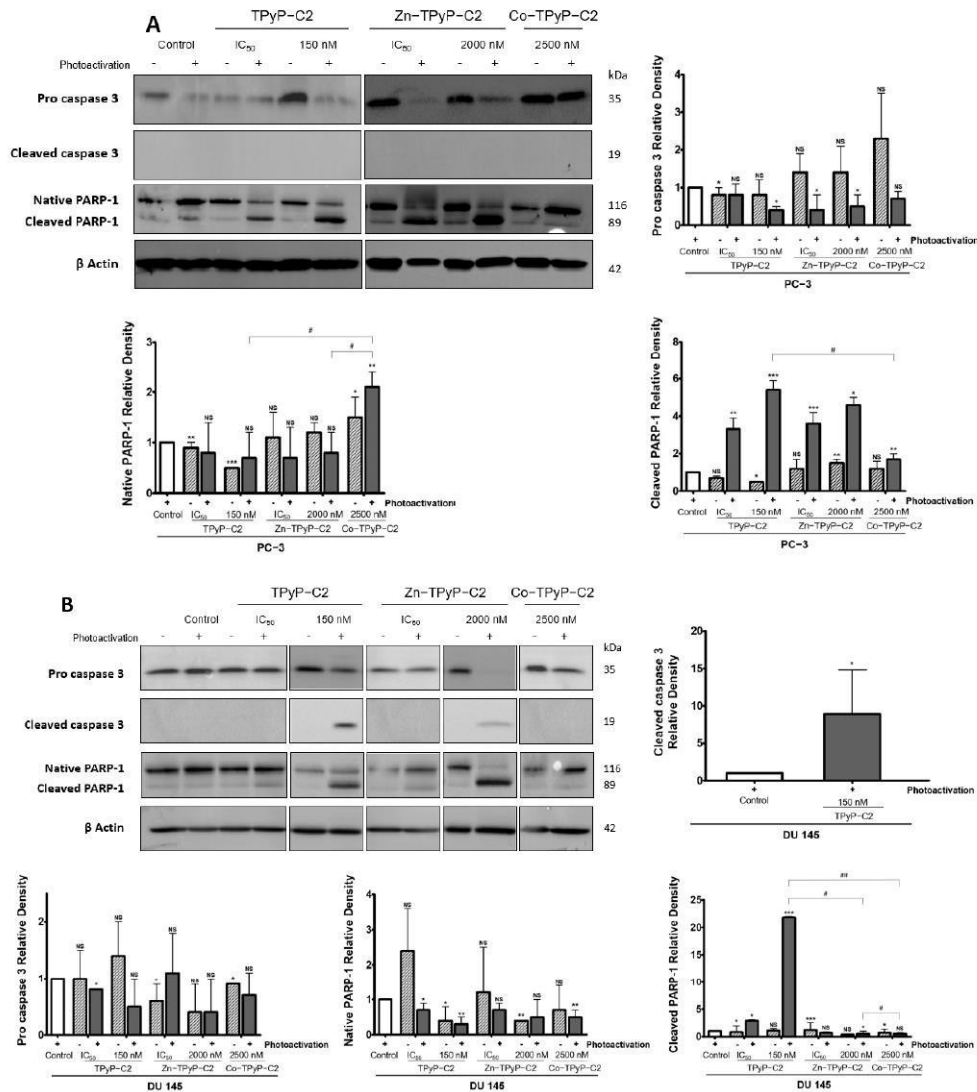


Figure 7. Effects of the C2 compounds on human prostate cancer cell lines. PC3 cells (A) were treated or not with **TPyP-C2**, **Zn-TPyP-C2**, or **Co-TPyP-C2**. DU 145 cells (B) were treated or not with **TPyP-C2**, **Zn-TPyP-C2**, or **Co-TPyP-C2**. The expression of caspase-3 activation and PARP-1 cleavage was analyzed by Western blotting 24 h post-PDT. β -actin was used as a loading control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ relative to control group or # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ relative to compounds; NS: not significant.

Finally, for the **C3** group, on the PC-3 cell line, we saw no change in pro-caspase 3 cleavage but a good cleavage of native PARP-1, mainly for **Por-C3** after photoactivation, at 10-fold for cleaved PARP-1 at IC_{50} . For the DU 145 cells, we observed a good cleavage of pro-caspase 3 for **Por-C3** only after photoactivation. As seen in Figure 7, a strong cleavage of PARP-1 is noticeable for **Por-C3** at 54-fold and 65-fold at IC_{50} and a higher concentration, respectively (Figure S5).

Furthermore, to confirm apoptosis and in order to see nuclear changes, DNA fragmentation was performed by ELISA. Overall, all compounds induced an increase in DNA fragmentation except for **Co-TPyP-C2**. In group **C1** on PC-3 cells, **TPyP-C1** showed a strong increase in DNA fragmentation at 8.67-fold compared to the other derivatives. Indeed, in the presence of Zn, DNA fragmentation still occurs, but to a lesser extent (3-fold), while no significant differences were observed on DU 145 cells (Figure S6). If we now look at the group **C2** for PC-3 cells, the results are different. In fact, **TPyP-C2** shows a DNA fragmentation (4-fold) that is much lower than **Zn-TPyP-C2** by almost 10-fold. On DU 145 cells, **TPyP-C2** displays a stronger DNA fragmentation at 4.5-fold compared to **Zn-TPyP-C2** (2-fold) (Figure 8). As for **Co-TPyP-C2**, no differences are observed on both cell lines. Then, for the **C3** group, **Por-C3** induced a much better fragmentation on PC-3 cells and DU 145 at 8-fold and 3.8-fold, respectively, compared to **Mg-Por-C3** at 5.5-fold and 2.3-fold (Figure S6).

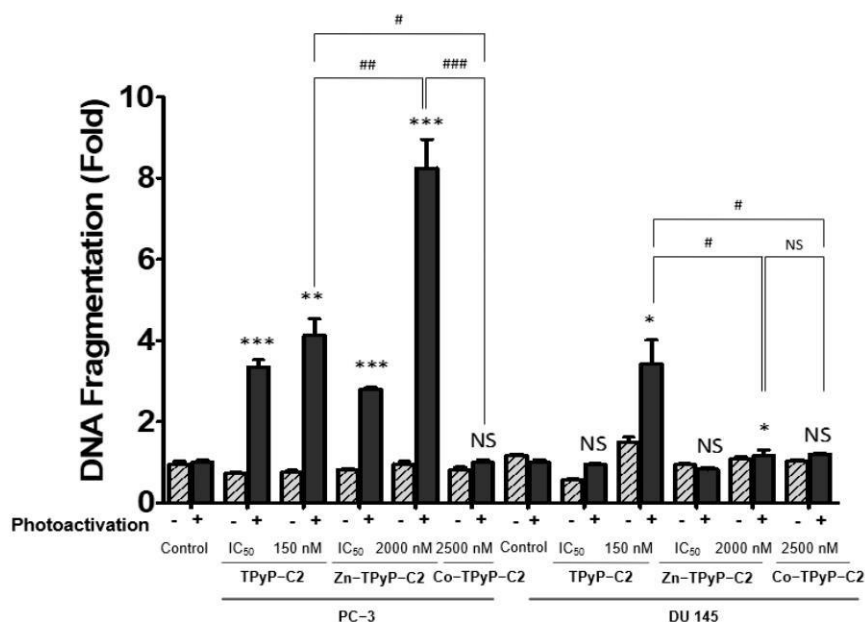


Figure 8. DNA fragmentation through ROS production in prostate cancer cell lines. DNA fragmentation in cells 24 h post-PDT was quantified from cytosol extracts by ELISA. Cells were treated with **TPyP-C2**, **Zn-TPyP-C2**, or **Co-TPyP-C2** on DU 145 and PC3 cell lines. The results are reported as n-fold compared to light control. Values are expressed as mean \pm SEM (N = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ relative to control group or # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ relative to compounds; NS: not significant.

Taken together, these results suggest that all compounds (except **Co-TPyP-C2**) induce apoptosis and DNA fragmentation. It is important to highlight that, in general, the met-

alation (Zn, Mg) of the PS reduces the cleavage of the various proteins involved in the apoptotic pathway and DNA fragmentations.

3. Discussion

In this study, we have evaluated the anticancer potential of Ru assemblies containing metal-free and metalated photosensitizers on prostate cancer cell lines (PC-3 and DU 145). First, we evaluated the phototoxicity of the compounds and we highlighted their significant cytotoxic effects with IC_{50} values in the nanomolar range. Compounds built with two PSs (C1 and C2) have a stronger effect than those with the PS inside the cavity (C3). Prior to our study, it had already been demonstrated that the release of porphyrin from cubic or prismatic cages was possible [27]. Moreover, once inside the cells (HeLa, Me300, A2780, A2780cisR, and A549), the PS was released from the cage and irradiated [28] without attempting to locate the compounds. To explain the release of the PS from the metallacages, two mechanisms have been suggested: through the opening of cages or from a rupture of the cage (partial or total) [27,28].

The main objective was to determine the difference in efficiency in the presence or absence of metals (zinc, cobalt) inside the PS in the center of the tetrapyrrolylporphyrin panels or as a guest inside the cavity of the prism (magnesium). According to our results, the presence of metal decreases PDT efficiency and annihilates it in the case of Co. Both TPYP-C1 and TPYP-C2 (the metal-free derivative) have higher phototoxicity than their Zn or Co analogs. One possible explanation is the fluorescence emission of the PS. Indeed, the fluorescence emission of PSs containing Zn or Mg as a metal center is higher than metal-free analogs [25,26]. In addition, metal coordination in porphyrins increases the rate of decay for the intersystem crossing to the triplet state (Figure 1), resulting in a decrease in the fluorescence quantum yield [29]. Co-TPYP-C2 did not show any phototoxic activity, as expected for a Co(II) porphyrin derivative, due to the absence of a triplet state [30] and also a lack of internalization. Another study goes along the same lines, in which paramagnetic species result in a reduction in the lifetime of the triplet state. Concerning the diamagnetic ion (Zn), a similar conclusion was made, as the triplet decay rates are about four times greater than metal-free porphyrins [31]. Taking this into account, a lower production of ROS is expected. Contradictory results can be explained by the formation of free radical species (Type I reaction) when using diamagnetic metals, while complexes without metal tend to produce singlet oxygen (Type II reaction).

We have found that all compounds localized into the cytoplasm, except for Co-TPYP-C2. A confocal microscopy study demonstrated that Zinc (II) phthalocyanine co-localized with the Golgi apparatus in most cases and with mitochondria only after prolonged incubation [32]. Although we are not working with phthalocyanine in our study, it is possible that our compounds act in the same way. Furthermore, the study also highlighted that 2 h incubation led to cell death through necrosis, and 24 h incubation mainly led to apoptosis, showing that it is possible in vitro to modulate cell death. Even if our compounds did not co-localize with mitochondria after prolonged incubation, it is possible that our compounds behave in the same way and could lead to necrosis, too. If so, it would be interesting to see if they co-localized with the Golgi apparatus. A previous study demonstrated that diamagnetic metals such as Zn, Pd, In, Sn, or Lu co-coordinated with the tetrapyrrole nucleus, allowing photosensitizing activity, while paramagnetic ones (Fe, Cu, Co) did not [33] in the case of phthalocyanines. In this article, we have proved that this applies to porphyrin as well.

In the dark, our compounds with the addition of metal (in the center of the PS or inside the cavity) show a greater cytotoxicity. These results correlate with an earlier study in which it was reported that the presence of Zn exhibits some toxicity in the dark at high concentrations on synovial cells [26]. Furthermore, the regression of cell growth has been attributed to the presence of Zn inside porphyrins [34,35]. Regarding the results for the apoptosis pathway, PDT is well known to lead to apoptosis. With this in mind, we validated that most of our compounds induced apoptosis through pro-caspase 3 and

PARP-1 cleavage, leading to DNA fragmentation. Once again, these results are consistent with the literature. Indeed, it has already been demonstrated that fluorinated Ru porphyrin has DNA interaction leading to its cleavage into melanoma cells [36].

Future research to determine the mechanism that some of these systems follow, once cellular internalization has taken place, could be useful. Indeed, experiments on the production of singlet oxygen could thus be carried out under optimal and reliable experimental conditions. In addition, a study of other cell death pathways (necrosis, necroptosis, etc.) should be carried out in view of the results observed. The *in vivo* use of the various compounds would be the ultimate goal of this study. However, one possible limitation would be the cytotoxicity of Ru at higher concentrations.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

RPMI 1640 medium, RPMI red-phenol-free medium, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, and penicillin–streptomycin were purchased from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), human anti- β -actin antibody, cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay^{PLUS} (ELISA), and 2',7'-dichlorofluoresceine diacetate (DCFDA) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). LysoTracker, goat anti-rabbit IgG H&L horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody, Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) antibody, caspase-3 antibody, and cleaved caspase-3 antibody were purchased from Cell Signaling Technology—Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). MitoTracker, ER-Tracker, and rabbit anti-mouse IgG-IgM H&L HRP secondary antibody were obtained from Invitrogen—Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate was acquired from Merck (Lyon, France).

4.2. Synthesis of Compounds

4.2.1. Photosensitizers

5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (TPyP) was purchased from Sigma-Aldrich, while Zn(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (Zn-TPyP) and Co(II)-5,10,15,20-tetra(pyridyl-4-yl)-21H,23H-porphine (Co-TPyP) were obtained from Porphychem (Dijon, France). The other photosensitizers, 21H,23H-porphine (Por), and Mg(II)-porphine (Mg-Por), were synthesized according to the literature [37] (Figure 3).

4.2.2. Cages

The metallacages, $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-p-}^i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-H}_2\text{-TPyP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_6\text{H}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{-SO}_3]_8$ (TPyP-C1), $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-p-}^i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-Zn-TPyP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_6\text{H}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (Zn-TPyP-C1), $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-p-}^i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-H}_2\text{-TPyP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (TPyP-C2), $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-p-}^i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-Zn-TPyP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (Zn-TPyP-C2), and $[\text{Ru}_8(\eta^6\text{-p-}^i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_8(\mu^4\text{-Co-TPyP-}\kappa\text{N})_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})_4][\text{CF}_3\text{SO}_3]_8$ (Co-TPyP-C2) were synthesized as reported in the literature [25,38]. Regarding $\{[(\eta^6\text{-p-cymene})_6\text{Ru}_6(2,5\text{-dioxido-1,4-benzoquinonato})_3(2,4,6\text{-tri(pyridin-4-yl)-1,3,5-triazine})_2][\text{SO}_3\text{CF}_3]_6\}^-\text{C}$ Porphine or Mg-Porphine), (Por-C3) or (Mg-Por-C3) were synthesized as reported in the literature [26,27] (Figure 2).

4.3. Cell Culture and Treatment

Prostate cancer cell lines (PC-3 and DU 145) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) (LGC Standards, Middlesex, UK). Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37 °C. For all experiments, cells were seeded at 1.8×10^4 cells/cm² for DU 145 and PC-3 cells. Stock solutions of all compounds were prepared in DMSO (1 mM) and prior to use were diluted in a culture medium to obtain the

appropriate final concentrations. The concentration of DMSO was never more than 0.4% in the cell medium.

4.4. *In Vitro* Protocol of PDT

Prostate cancer cells were seeded in 25 cm² or 96-well (6000 cells per well) culture plates and were grown for 24 h in a culture medium prior to exposure or not to compounds. After 24 h, the culture medium was replaced by a red-phenol-free culture medium before PDT. Then cells were irradiated or not with a 630–660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). At 24 or 48 h after irradiation, cells were removed for analysis.

4.5. *In Vitro* Phototoxicity of Compounds

Antiproliferative assays were determined using an MTT assay. Cells were seeded in 96-well culture plates and treated as described above with the compounds. After 24 h of incubation, cells were irradiated or not. MTT assays were performed 24 and 48 h after irradiation and cell viability was expressed as a percentage of each treatment condition by normalizing to untreated cells.

4.6. Intracellular ROS Generation

ROS generation was quantified using a detection assay kit that uses the cell-permeant reagent 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). The cells were seeded in 25 cm² tissue culture flasks and were grown 24 h prior to exposure or not to compounds at respective IC₅₀ values. Then, the cells were stained with DCFDA for 30 min at 37 °C. After washing, cells were irradiated or not. ROS generation was examined by flow cytometry immediately after PDT. H₂O₂ was used as a positive control at 800 μM.

4.7. Localization

To determine compound localization, cells were seeded in lab tek chamber slides and were grown for 24 h prior to exposure to compounds at IC₅₀ values. After 24 h incubation, cells were co-treated at 37 °C with MitoTracker (50 nM), ER-Tracker (500 nM), or LysoTracker (50 nM) for 45 min, 30 min, and extemporaneously, respectively. Compound localization was determined by confocal microscopy using compound fluorescence with LysoTracker fluorescence (excitation/emission: 504/511 nm), MitoTracker fluorescence (excitation/emission: 490/516 nm), and ER-Tracker fluorescence (excitation/emission 504/511 nm). Photos were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta—×1000).

4.8. *In Vitro* Apoptosis Detection

Cells were seeded in 25 cm² tissue culture flasks and were grown for 24 h prior to exposure or not to compounds at IC₅₀ values and were irradiated or not. At 24 h post-PDT, cells were recovered and divided into two groups. For the first group, cells were lysed in the RIPA lysis buffer. Protein levels were determined using the Bradford method. Western blotting was performed on apoptosis-related proteins, human anti-poly-ADP-ribose polymerase (PARP-1) (1:1000), human anti-caspase 3 (1:1000), human anti-pro caspase 3 (1:1000). Human anti-β-actin (1:5000) was used as a loading control. After incubation with the appropriate secondary antibodies, blots were developed using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate and a G:BOX system (Syngene, Cambridge, UK).

The other group was used to assess DNA fragmentation. The Cell Death ELISA^{PLUS} kit was used, allowing for the specific determination of mono- and oligonucleosomes in the cytoplasmic fraction of cell lysates. Cytosolic extracts were obtained according to the manufacturer's protocol and apoptosis was measured as previously described [13]. DNA fragmentation was measured and the results were reported as n-fold compared to control.

4.9. Statistical Analysis

All data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of separate experiments. The statistical significance of results was evaluated by a two-tailed unpaired Student's *t*-test, as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ or # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$.

5. Conclusions

Herein, we evaluated for the first time the anticancer efficacy of **TPyP-C1**, **Zn-TPyP-C1**, **TPyP-C2**, **Zn-TPyP-C2**, **Co-TpPyP-C2**, **Por-C3**, and **Mg-Por-C3** in human prostate cancer cell lines. We can conclude that the intracellular accumulation and distribution of our compounds show a strong anticancer efficacy in vitro resulting in cell death via the apoptotic pathway. The addition of Zn^{2+} or Mg^{2+} inside the tetrapyrrole ring center decreases the anticancer effect. Furthermore, the addition of Co^{2+} leads to a total absence of effect, due to the paramagnetic character of cobalt and the absence of internalization. Nevertheless, most compounds show promising results. To complete this study, it would be useful to validate the two most effective derivatives (**TPyP-C1** and **TPyP-C2**) in vivo in order to validate our findings.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241713614/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, L.P., B.T., D.Y.L. and B.L.; methodology, L.P., C.O., C.C. and F.M.; validation, M.G.-V., D.Y.L., B.T. and B.L.; writing—original draft preparation, L.P.; writing—review and editing, B.T., D.Y.L. and B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique of France, Région Nouvelle-Aquitaine and Ligue contre le Cancer (Comité départemental 87—Haute-Vienne).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to the BISCEm platform of Health Institute at Limoges University, especially Catherine OUK for assistance with flow cytometry and Claire CARRION for confocal microscopy.

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

Abbreviations

ATCC: American Type Culture Collection; Co: cobalt; CO₂: carbon dioxide; DCFDA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMSO: dimethyl sulfoxide; DNA: deoxyribonucleic acid; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ER-Tracker: endoplasmic reticulum tracker; FBS: fetal bovine serum; H₂O₂: hydrogen peroxide; HRP: horseradish peroxidase; IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration; Mg: magnesium; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NPs: nanoparticles; O₂^{•-}: superoxide anion; •OH: hydroxyl radical; ¹O₂: singlet oxygen; PARP-1: poly-ADP-ribose polymerase; PBS: phosphate-buffered saline; PCa: prostate cancer; PDT: photodynamic therapy; PI: photoindex; Por: 21H, 23H-porphine; PS: photosensitizer; PTS: polyamine transport systems; ROS: reactive oxygen species; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; Ru: ruthenium; SDS-PAGE: electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate; SEM: standard error of the mean; Zn: zinc.

References

1. Cancer Today. Available online: <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed on 11 April 2023).
2. EAU. Guidelines on Prostate Cancer—Uroweb. Available online: <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer> (accessed on 19 July 2023).
3. Fallara, G.; Capogrosso, P.; Maggio, P.; Taborelli, A.; Montorsi, F.; Dehò, F.; Salonia, A. Erectile Function after Focal Therapy for Localized Prostate Cancer: A Systematic Review. *Int. J. Impot. Res.* **2021**, *33*, 418–427. [CrossRef] [PubMed]
4. Evans, A.J. Treatment Effects in Prostate Cancer. *Mod. Pathol.* **2018**, *31*, 110–121. [CrossRef] [PubMed]
5. Malinowski, B.; Wiciński, M.; Musiała, N.; Osowska, I.; Szostak, M. Previous, Current, and Future Pharmacotherapy and Diagnosis of Prostate Cancer—A Comprehensive Review. *Diagnostics* **2019**, *9*, 161. [CrossRef]
6. Ahdoot, M.; Lebastchi, A.H.; Turkbey, B.; Wood, B.; Pinto, P.A. Contemporary Treatments in Prostate Cancer Focal Therapy. *Curr. Opin. Oncol.* **2019**, *31*, 200–206. [CrossRef]
7. Osuchowski, M.; Bartusik-Aebisher, D.; Osuchowski, F.; Aebisher, D. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer—A Narrative Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**, *33*, 102158. [CrossRef] [PubMed]
8. Azzouzi, A.-R.; Vincendeau, S.; Barret, E.; Cicco, A.; Kleinclauss, 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]
9. Vermandel, M.; Dupont, C.; Lecomte, F.; Leroy, H.-A.; Tuleasca, C.; Mordon, S.; Hadjipanayis, C.G.; Reyns, N. Standardized Intraoperative 5-ALA Photodynamic Therapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Patients: A Preliminary Analysis of the INDYGO Clinical Trial. *J. Neurooncol.* **2021**, *152*, 501–514. [CrossRef]
10. Westaby, D.; Jimenez-Vacas, J.M.; Padilha, A.; Varkaris, A.; Balk, S.P.; de Bono, J.S.; Sharp, A. Targeting the Intrinsic Apoptosis Pathway: A Window of Opportunity for Prostate Cancer. *Cancers* **2021**, *14*, 51. [CrossRef]
11. Zhu, W.; Gao, Y.-H.; Liao, P.-Y.; Chen, D.-Y.; Sun, N.-N.; Nguyen Thi, P.A.; Yan, Y.-J.; Wu, X.-F.; Chen, Z.-L. Comparison between Porphin, Chlorin and Bacteriochlorin Derivatives for Photodynamic Therapy: Synthesis, Photophysical Properties, and Biological Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 146–156. [CrossRef]
12. De Annunzio, S.R.; Costa, N.C.S.; Mezzina, R.D.; Graminha, M.A.S.; Fontana, C.R. Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3861. [CrossRef]
13. Fidanzi-Dugas, C.; Liagre, B.; Chemin, G.; Perraud, A.; Carrion, C.; Couquet, C.-Y.; Granet, R.; Sol, V.; Léger, D.Y. Analysis of the in Vitro and in Vivo Effects of Photodynamic Therapy on Prostate Cancer by Using New Photosensitizers, Protoporphyrin IX-Polyamine Derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 1676–1690. [CrossRef] [PubMed]
14. Bartelmess, J.; Milcovich, G.; Maffei, V.; d'Amora, M.; Bertozzi, S.M.; Giordani, S. Modulation of Efficient Diiodo-BODIPY in Vitro Phototoxicity to Cancer Cells by Carbon Nano-Onions. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 573211. [CrossRef] [PubMed]
15. Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.-O. Silica-Based Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1083. [CrossRef]
16. Park, J.; Jiang, Q.; Feng, D.; Mao, L.; Zhou, H.-C. Size-Controlled Synthesis of Porphyrinic Metal–Organic Framework and Functionalization for Targeted Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3518–3525. [CrossRef] [PubMed]
17. Akter, S.; Inai, M.; Saito, S.; Honda, N.; Hazama, H.; Nishikawa, T.; Kaneda, Y.; Awazu, K. Photodynamic therapy by lysosomal-targeted drug delivery using talaporfin sodium incorporated into inactivated virus particles. *Laser Ther.* **2019**, *28*, 245–256. [CrossRef]
18. Oun, R.; Moussa, Y.E.; Wheate, N.J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 6645–6653. [CrossRef]
19. Biancalana, L.; Pampaloni, G.; Marchetti, F. Arene Ruthenium(II) Complexes with Phosphorous Ligands as Possible Anticancer Agents. *Chimia* **2017**, *71*, 573. [CrossRef]
20. Gandosio, A.; Purkait, K.; Gasser, G. Recent Approaches towards the Development of Ru(II) Polypyridyl Complexes for Anticancer Photodynamic Therapy. *Chimia* **2021**, *75*, 845. [CrossRef]
21. Sava, G.; Zorzet, S.; Giraldo, T.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. Antineoplastic Activity and Toxicity of an Organometallic Complex of Ruthenium(II) in Comparison with Cis-PDD in Mice Bearing Solid Malignant Neoplasms. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1984**, *20*, 841–847. [CrossRef]
22. Bogoeva, V.; Siksjø, M.; Sæterbø, K.G.; Melø, T.B.; Bjørkøy, A.; Lindgren, M.; Gederaas, O.A. Ruthenium Porphyrin-Induced Photodamage in Bladder Cancer Cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2016**, *14*, 9–17. [CrossRef]
23. Kulkarni, G.S.; Lilge, L.; Nesbitt, M.; Dumoulin-White, R.J.; Mandel, A.; Jewett, M.A.S. A Phase 1b Clinical Study of Intravesical Photodynamic Therapy in Patients with Bacillus Calmette–Guérin–Unresponsive Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol. Open Sci.* **2022**, *41*, 105–111. [CrossRef]
24. Therrien, B.; Süß-Fink, G.; Govindaswamy, P.; Renfrew, A.K.; Dyson, P.J. The “Complex-in-a-Complex” Cations [(Acac)₂M₂C₂Ru₆(p-IPrC₆H₄Me)₆(Tpt)₂(Dhbq)₃]⁶⁺: A Trojan Horse for Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3773–3776. [CrossRef]
25. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.-L.; Leger, D.Y.; Vergne-Salle, P.; Therrien, B.; Liagre, B. Ruthenium-Based Assemblies Incorporating Tetrapyrrolylporphyrin Panels: A Photosensitizer Delivery Strategy for the Treatment of Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy. *Dalton Trans.* **2022**, *51*, 9673–9680. [CrossRef] [PubMed]

References

1. Cancer Today. Available online: <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed on 11 April 2023).
2. EAU. Guidelines on Prostate Cancer—Uroweb. Available online: <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer> (accessed on 19 July 2023).
3. Fallara, G.; Capogrosso, P.; Maggio, P.; Taborelli, A.; Montorsi, F.; Dehò, F.; Salonia, A. Erectile Function after Focal Therapy for Localized Prostate Cancer: A Systematic Review. *Int. J. Impot. Res.* **2021**, *33*, 418–427. [CrossRef] [PubMed]
4. Evans, A.J. Treatment Effects in Prostate Cancer. *Mod. Pathol.* **2018**, *31*, 110–121. [CrossRef] [PubMed]
5. Malinowski, B.; Wiciński, M.; Musiała, N.; Osowska, I.; Szostak, M. Previous, Current, and Future Pharmacotherapy and Diagnosis of Prostate Cancer—A Comprehensive Review. *Diagnostics* **2019**, *9*, 161. [CrossRef]
6. Ahdoot, M.; Lebastchi, A.H.; Turkbey, B.; Wood, B.; Pinto, P.A. Contemporary Treatments in Prostate Cancer Focal Therapy. *Curr. Opin. Oncol.* **2019**, *31*, 200–206. [CrossRef]
7. Osuchowski, M.; Bartusik-Aebisher, D.; Osuchowski, F.; Aebisher, D. Photodynamic Therapy for Prostate Cancer—A Narrative Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**, *33*, 102158. [CrossRef] [PubMed]
8. Azzouzi, A.-R.; Vincendeau, S.; Barret, E.; Cicco, A.; Kleinclauss, 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]
9. Vermandel, M.; Dupont, C.; Lecomte, F.; Leroy, H.-A.; Tuleasca, C.; Mordon, S.; Hadjipanayis, C.G.; Reyns, N. Standardized Intraoperative 5-ALA Photodynamic Therapy for Newly Diagnosed Glioblastoma Patients: A Preliminary Analysis of the INDYGO Clinical Trial. *J. Neurooncol.* **2021**, *152*, 501–514. [CrossRef]
10. Westaby, D.; Jimenez-Vacas, J.M.; Padilha, A.; Varkaris, A.; Balk, S.P.; de Bono, J.S.; Sharp, A. Targeting the Intrinsic Apoptosis Pathway: A Window of Opportunity for Prostate Cancer. *Cancers* **2021**, *14*, 51. [CrossRef]
11. Zhu, W.; Gao, Y.-H.; Liao, P.-Y.; Chen, D.-Y.; Sun, N.-N.; Nguyen Thi, P.A.; Yan, Y.-J.; Wu, X.-F.; Chen, Z.-L. Comparison between Porphin, Chlorin and Bacteriochlorin Derivatives for Photodynamic Therapy: Synthesis, Photophysical Properties, and Biological Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 146–156. [CrossRef]
12. De Annunzio, S.R.; Costa, N.C.S.; Mezzina, R.D.; Graminha, M.A.S.; Fontana, C.R. Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3861. [CrossRef]
13. Fidanzi-Dugas, C.; Liagre, B.; Chemin, G.; Perraud, A.; Carrion, C.; Couquet, C.-Y.; Granet, R.; Sol, V.; Léger, D.Y. Analysis of the in Vitro and in Vivo Effects of Photodynamic Therapy on Prostate Cancer by Using New Photosensitizers, Protoporphyrin IX-Polyamine Derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 1676–1690. [CrossRef] [PubMed]
14. Bartelmess, J.; Milcovich, G.; Maffei, V.; d'Amora, M.; Bertozzi, S.M.; Giordani, S. Modulation of Efficient Diiodo-BODIPY in Vitro Phototoxicity to Cancer Cells by Carbon Nano-Onions. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 573211. [CrossRef] [PubMed]
15. Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.-O. Silica-Based Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1083. [CrossRef]
16. Park, J.; Jiang, Q.; Feng, D.; Mao, L.; Zhou, H.-C. Size-Controlled Synthesis of Porphyrinic Metal–Organic Framework and Functionalization for Targeted Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3518–3525. [CrossRef] [PubMed]
17. Akter, S.; Inai, M.; Saito, S.; Honda, N.; Hazama, H.; Nishikawa, T.; Kaneda, Y.; Awazu, K. Photodynamic therapy by lysosomal-targeted drug delivery using talaporfin sodium incorporated into inactivated virus particles. *Laser Ther.* **2019**, *28*, 245–256. [CrossRef]
18. Oun, R.; Moussa, Y.E.; Wheate, N.J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 6645–6653. [CrossRef]
19. Biancalana, L.; Pampaloni, G.; Marchetti, F. Arene Ruthenium(II) Complexes with Phosphorous Ligands as Possible Anticancer Agents. *Chimia* **2017**, *71*, 573. [CrossRef]
20. Gandosio, A.; Purkait, K.; Gasser, G. Recent Approaches towards the Development of Ru(II) Polypyridyl Complexes for Anticancer Photodynamic Therapy. *Chimia* **2021**, *75*, 845. [CrossRef]
21. Sava, G.; Zorzet, S.; Giraldo, T.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. Antineoplastic Activity and Toxicity of an Organometallic Complex of Ruthenium(II) in Comparison with Cis-PDD in Mice Bearing Solid Malignant Neoplasms. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1984**, *20*, 841–847. [CrossRef]
22. Bogoeva, V.; Siksjø, M.; Sæterbø, K.G.; Melø, T.B.; Bjørkøy, A.; Lindgren, M.; Gederaas, O.A. Ruthenium Porphyrin-Induced Photodamage in Bladder Cancer Cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2016**, *14*, 9–17. [CrossRef]
23. Kulkarni, G.S.; Lilge, L.; Nesbitt, M.; Dumoulin-White, R.J.; Mandel, A.; Jewett, M.A.S. A Phase 1b Clinical Study of Intravesical Photodynamic Therapy in Patients with Bacillus Calmette–Guérin–Unresponsive Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol. Open Sci.* **2022**, *41*, 105–111. [CrossRef]
24. Therrien, B.; Süß-Fink, G.; Govindaswamy, P.; Renfrew, A.K.; Dyson, P.J. The “Complex-in-a-Complex” Cations [(Acac)₂M₂C₂Ru₆(p-IPrC₆H₄Me)₆(Tpt)₂(Dhbq)₃]⁶⁺: A Trojan Horse for Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3773–3776. [CrossRef]
25. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.-L.; Leger, D.Y.; Vergne-Salle, P.; Therrien, B.; Liagre, B. Ruthenium-Based Assemblies Incorporating Tetrapyrrolylporphyrin Panels: A Photosensitizer Delivery Strategy for the Treatment of Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy. *Dalton Trans.* **2022**, *51*, 9673–9680. [CrossRef] [PubMed]

VI.2. Résultats complémentaires sur le CaP

La série de complexes ci-dessous a également été testée sur les lignées DU145 et PC-3 de CaP. Cette étude repose sur l'utilisation d'une unique cage arène-Ru prismatique ayant pour panel le 1,3,5-tris{2-(pyridine-4-yl)vinyl}benzène et comme clip le dioxydo-1,4-benzoquinona (Figure 60). A l'intérieur de la cavité hydrophobe de cette cage ont été testés 3 PS : la 21*H*,23*H*-porphine (**Por**), la phtalocyanine (**Pc**) et la Zn-phtalocyanine (**ZnPc**) (Figure 61). Ainsi, en utilisant la même cage, les possibles variations d'activité viendraient uniquement des PS utilisés.

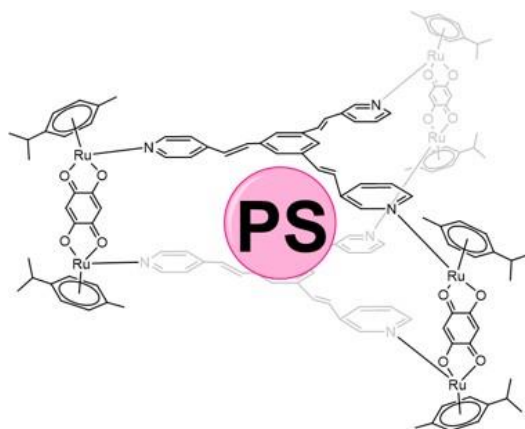


Figure 60 : Structure de la cage prismatique utilisée dans cette étude.

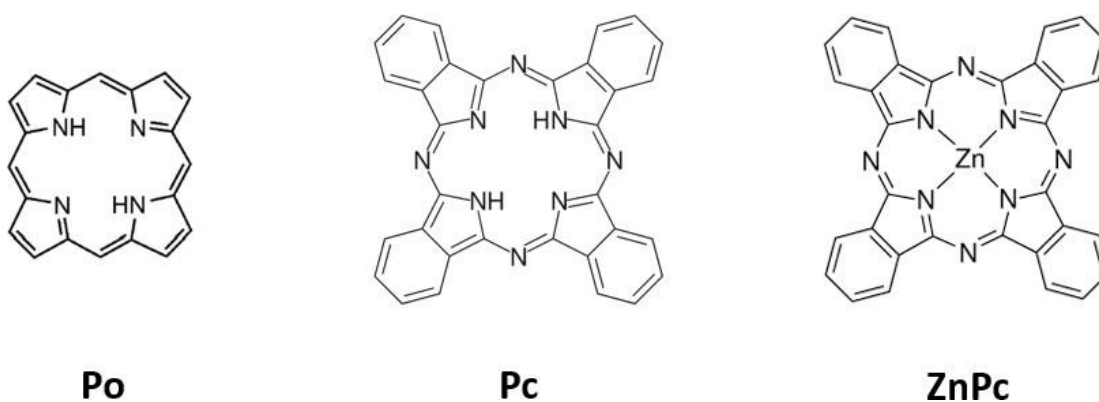


Figure 61 : Photosensibilisateurs utilisés dans cette étude.

A gauche : la 21*H*, 23*H*-porphine (**Por**), au centre : la Phtalocyanine (**Pc**), à droite : la Zn-Phtalocyanine (**ZnPc**).

VI.2.1. Etude de la viabilité cellulaire

Afin de déterminer l'activité cytotoxique de ces trois composés, les lignées PC-3 et DU145 ont étéensemencées à une densité déterminée et cultivées pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non à des concentrations croissantes avec la **Por**, la **Pc** ou la **ZnPc**. Après 24 h d'incubation et un changement avec un milieu sans rouge de phénol, les cellules ont été photoactivées ou non. La viabilité cellulaire des lignées DU145 et PC-3 a été analysée

24 h post-PDT (Figure 62). Il est important de noter que les trois composés testés n'ont aucun effet cytotoxique à l'obscurité aux concentrations utilisées. Afin de comparer les effets de ces différents PS, les IC₅₀ de chaque composé ont été calculées (Tableau 14).

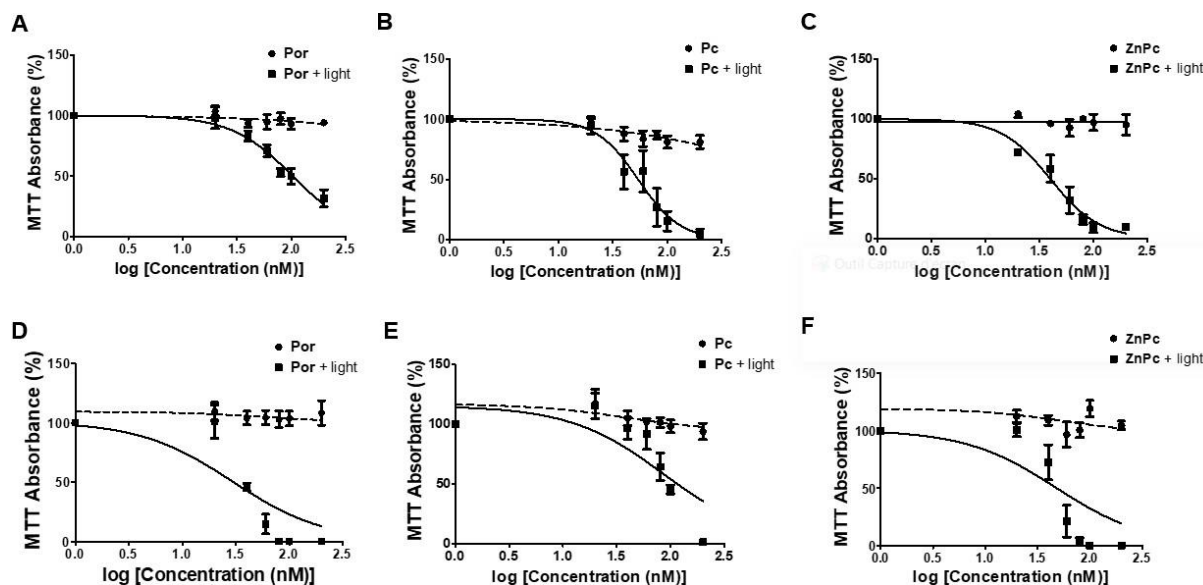


Figure 62 : Phototoxicité des PS sur les lignées DU145 et PC-3.

Les cellules DU145 (A), (B), (C) ou PC-3 (D), (E), (F) ont été traitées avec les différents composés.

Compounds	DU145		PC-3	
	IC ₅₀ (nM) light	IC ₅₀ (nM) dark	IC ₅₀ (nM) light	IC ₅₀ (nM) dark
Por	75 ± 30	> 200	60 ± 2	> 200
Pc	50 ± 33	> 200	75 ± 2	> 200
ZnPc	85 ± 14	> 200	25 ± 30	> 200

Tableau 14 : Valeurs des IC₅₀ et du PI sur les lignées PC-3 et DU145.

Les résultats ont montré que tous les composés présentent un effet cytotoxique en présence de lumière sur les 2 lignées de manière dose dépendante entraînant une IC₅₀ de l'ordre du nM. Néanmoins, il a été observé une meilleure efficacité de la **Pc** sur la lignée DU145 avec une IC₅₀ de 50 nM, contrairement à la lignée PC-3 pour laquelle la **ZnPc** est la plus efficace avec une IC₅₀ de 25 nM. La Por quant à elle présente une bonne efficacité que ce soit au sein des cellules DU145 et PC-3. Les IC₅₀ des différents composés étant très faibles et proches au sein des 2 lignées (entre 25 et 85 nM), il est difficile de déterminer avec certitude

lequel est le plus efficace. Dans la suite des expériences, les composés ont été utilisés à leurs valeurs d'IC₅₀ déterminées pour chaque lignée.

VI.2.2. Effet phototoxique médié par la production d'ERO

La mort cellulaire par PDT se produit généralement par la génération d'EROs intracellulaires. Les cellules ont donc étéensemencées à la densité déterminée et cultivées pendant 24 h puis traitées ou non aux IC₅₀. Après 24 h, les cellules ont été marquées à la DCFDA et photoactivées ou non. Nous avons donc mesuré les niveaux d'EROs intracellulaires en utilisant la DCFDA juste après la PDT. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé comme contrôle positif. Les analyses par cytométrie en flux ont clairement montré que l'exposition des cellules à tous les composés augmentait les niveaux d'EROs intracellulaires uniquement après photoactivation (Figure 63).

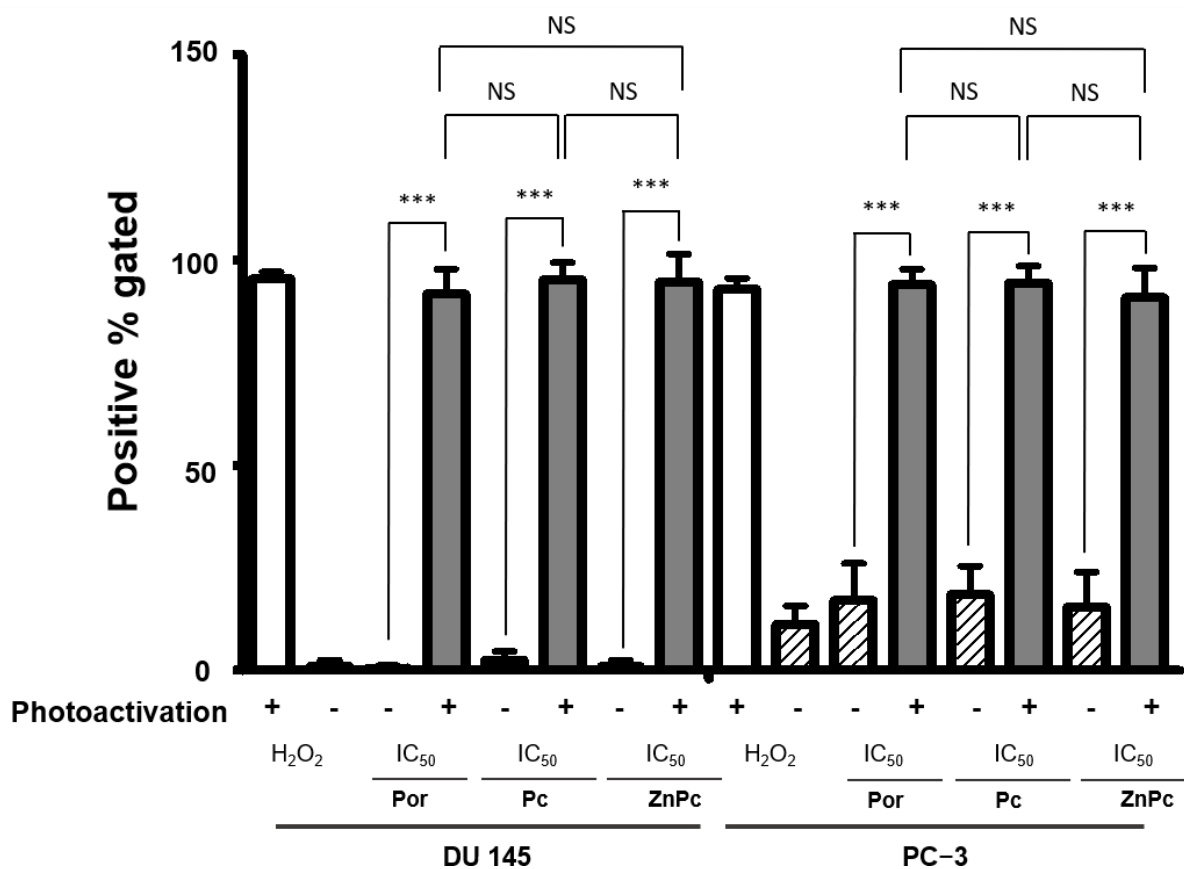


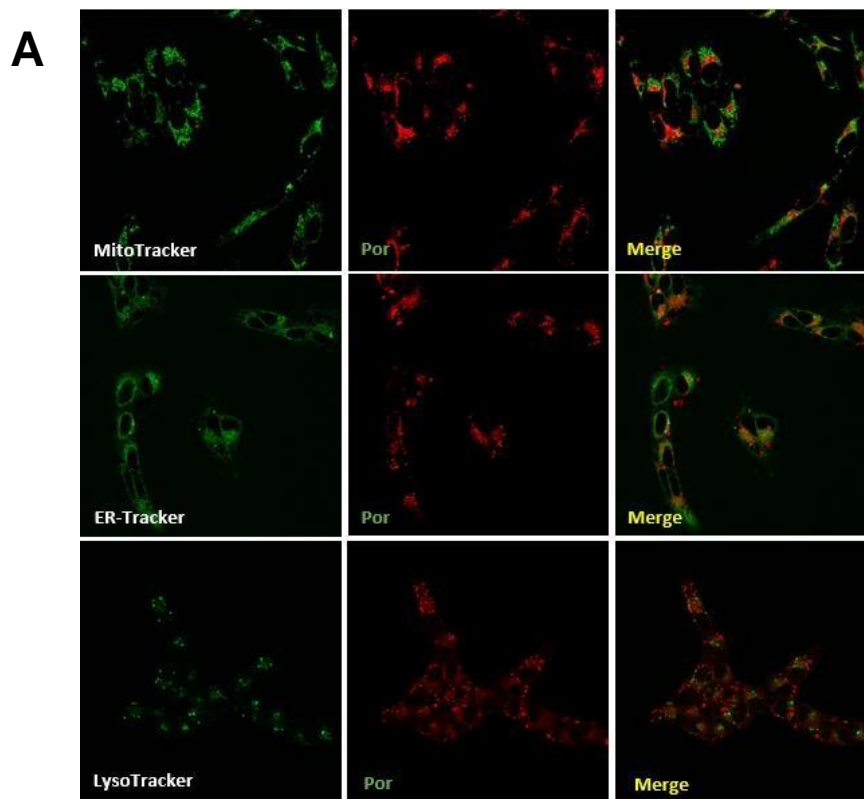
Figure 63 : Induction de la production d'EROs.

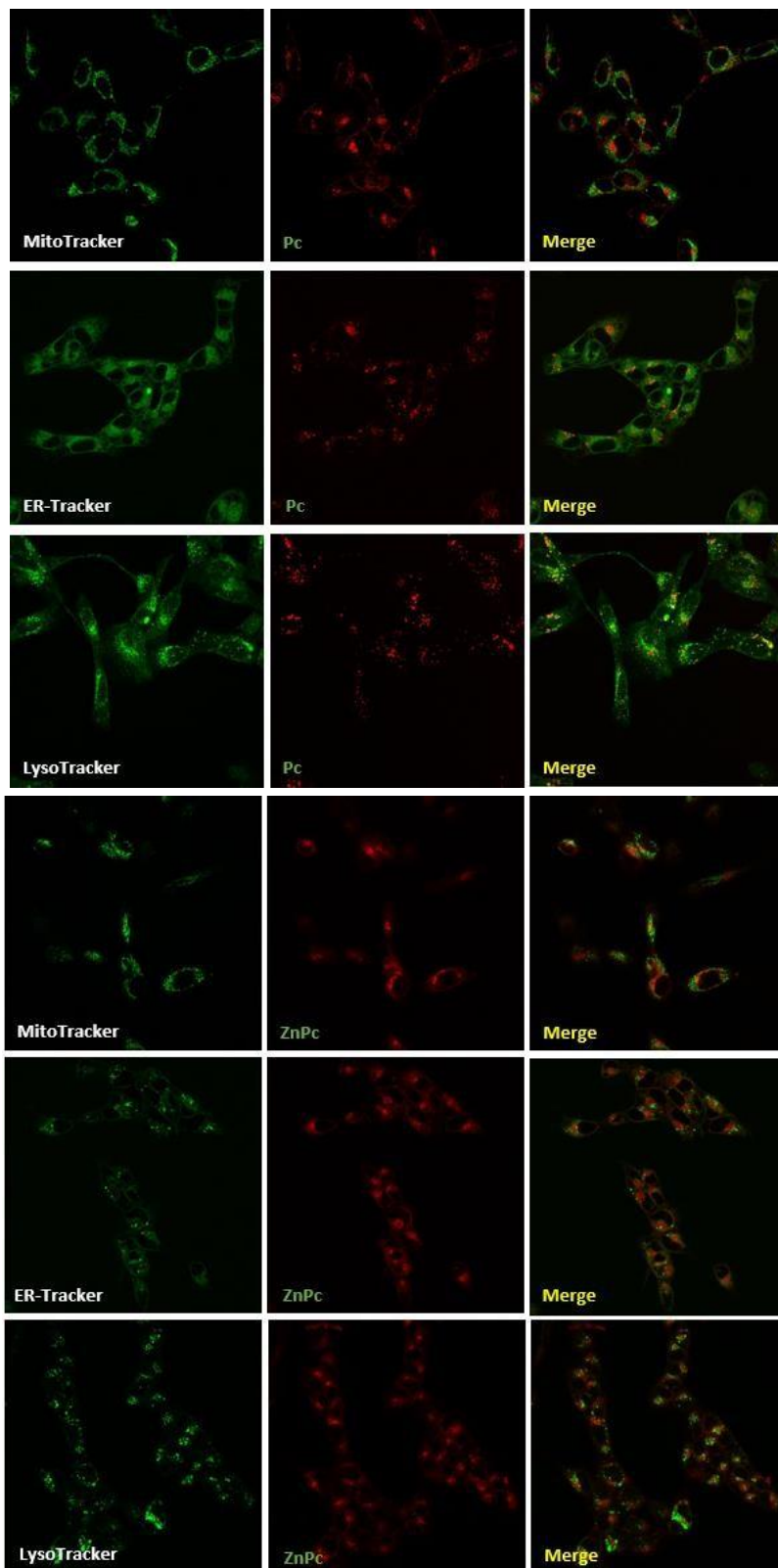
Une intensité de fluorescence plus élevée résulte d'une augmentation de la présence de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF). Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=3). *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001 par rapport à H₂O₂. NS : non significatif par rapport aux composés entre eux.

De façon globale, les 3 composés entraînent une production d'EROs lorsqu'il y a photoactivation et cela pour les 2 lignées. Il n'existe pas de différence significative dans la production d'EROs entre la **Por**, la **Pc** et la **ZnPc** avec une production supérieure à 90% pour les 3 PS. Ces résultats coïncident avec les résultats de phototoxicité décrits précédemment où il n'existe pas à ce stade de l'étude de différence importante d'activité entre les 3 PS.

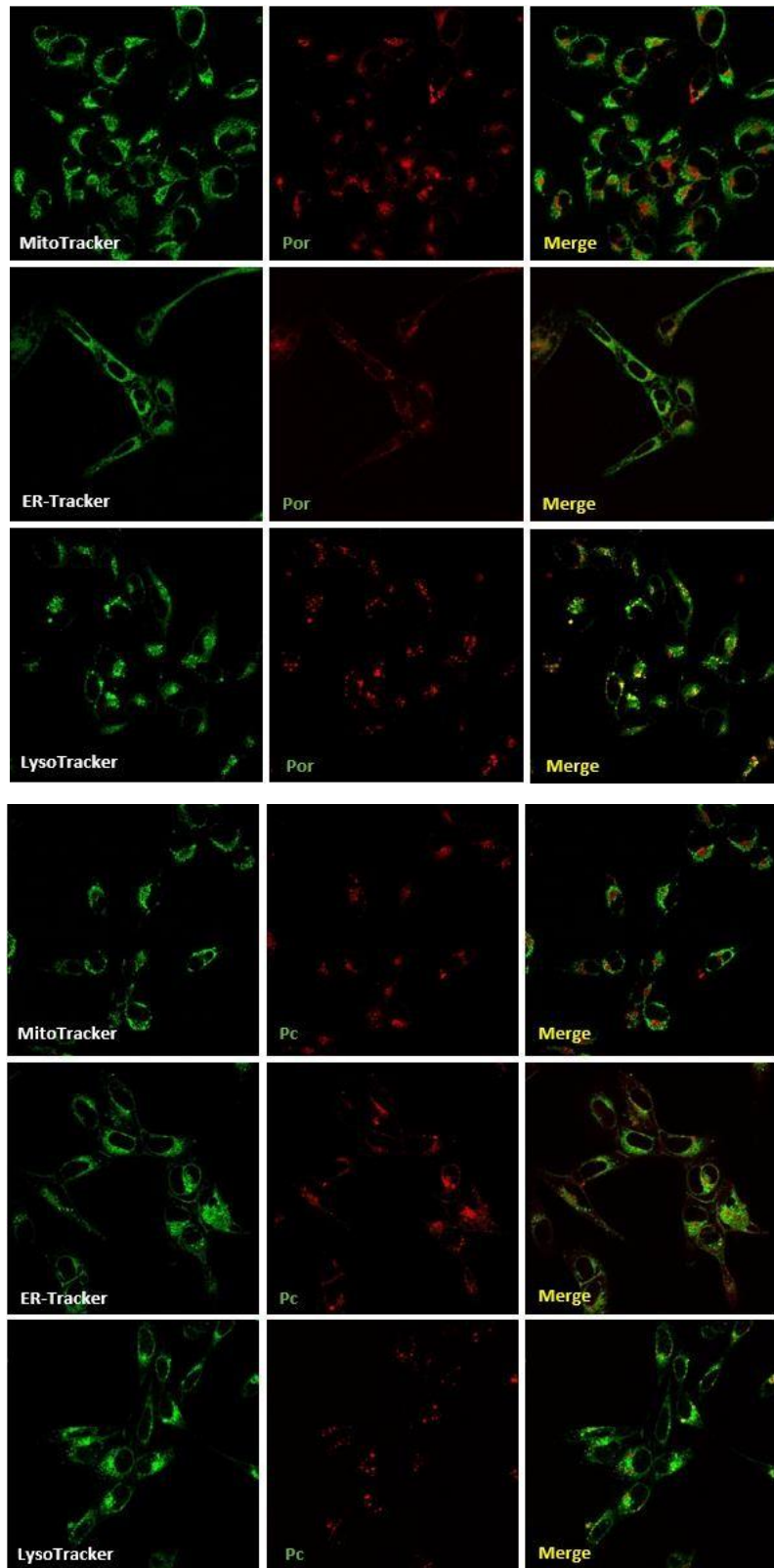
VI.2.3. Localisation des composés

Afin de démontrer l'internalisation de nos composés ainsi qu'une potentielle co-localisation, les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture de type « LabTek » à une densité déterminée et cultivées pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les composés aux IC_{50} déterminées, ceux-ci possédant naturellement des propriétés de fluorescence dans le rouge voire l'infra-rouge. Les cellules, après 24 h de traitement, ont été co-traitées par un Mito-, Lyso ou RE-Tracker. Les résultats nous permettent d'affirmer que les 3 composés sont bien internalisés au sein des cellules DU145 et PC-3 (Figure 65). En revanche, nos résultats montrent par microscopie confocale que les composés ne co-localisent pas dans la mitochondrie, le lysosome et le RE (pas de fluorescence jaune) et semblent donc être uniquement localisés dans le cytoplasme.





B



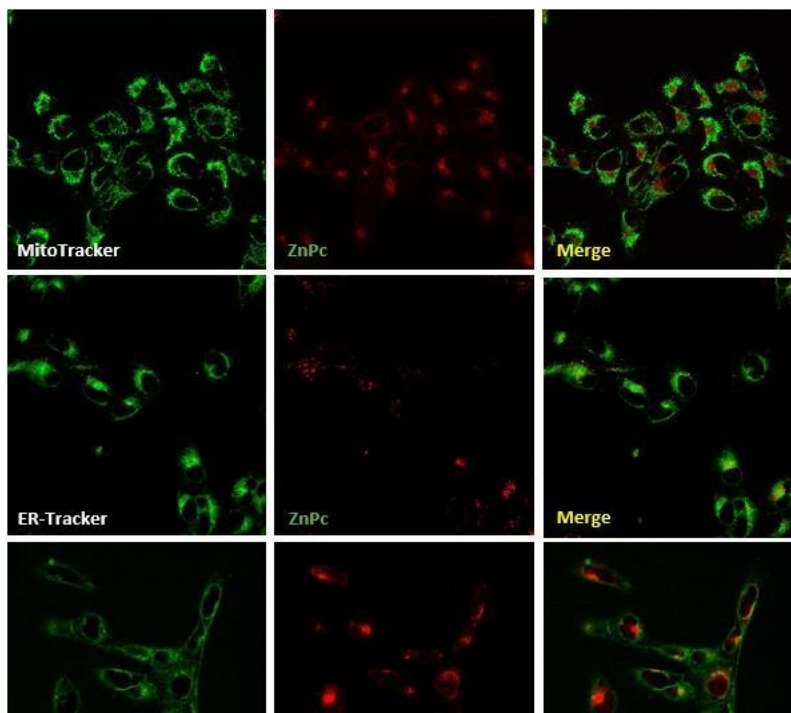


Figure 64 : Localisation des PS.

Les cellules DU145 (A) et PC-3 (B) ont été cultivées pendant 24 h puis traitées avec **Por**, **Pc** et **ZnPc** aux IC_{50} . La localisation des PS a été étudiée par microscopie confocale et les photos ont été prises avec un microscope de type laser Zeiss LSM Meta (x1000).

VI.2.4. Induction de l'apoptose

L'apoptose étant souvent impliquée après traitement par PDT, nous avons étudié les effets des composés aux IC_{50} mais également avec une concentration plus élevée (150 nM) correspondant à 2 ou 3 fois l' IC_{50} , ceci afin d'observer des effets apoptotiques importants. Une analyse par Western-blot (WB) des protéines liées à l'apoptose a été réalisée : notamment la pro-caspase-3 et la poly-ADP-ribose (PARP-1) ainsi que leurs formes clivées (Figure 65).

Les cellules DU145 et PC-3 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h puis traitées ou non avec **Por**, **Pc** et **ZnPc** aux IC_{50} déterminées. Suite au changement de milieu sans rouge de phénol, les cellules ont été photoactivées ou non. 24 h post-PDT, les cellules sont collectées et l'expression des protéines déterminées par WB. Pour rappel, le clivage de la pro-caspase-3 entraîne son activation qui induira à son tour le clivage de la PARP la rendant inactive.

Pour la lignée DU145 (Figure 65 A), la **Por** entraîne une apparition de la caspase 3 clivée corrélée à un clivage de la PARP et à la forte concentration (150 nM) uniquement lorsqu'il y a photoactivation. Concernant la **Pc**, une diminution de l'expression de la pro-caspase-3 suivie d'une augmentation de l'expression de la caspase-3 clivée corrélée à un fort clivage de la PARP sont observés et ce à l' IC_{50} ainsi qu'à la forte concentration. Néanmoins, pour la **ZnPc**, aucun effet sur ces marqueurs n'a été observé post-PDT.

Pour la lignée PC-3 (Figure 65 B), les résultats sont de façon globale les mêmes que pour la lignée DU145. Cependant, pour la **Pc**, la forme clivée de la caspase-3 ainsi que le clivage de la PARP ne se vérifie qu'à une forte concentration et non à l' IC_{50} .

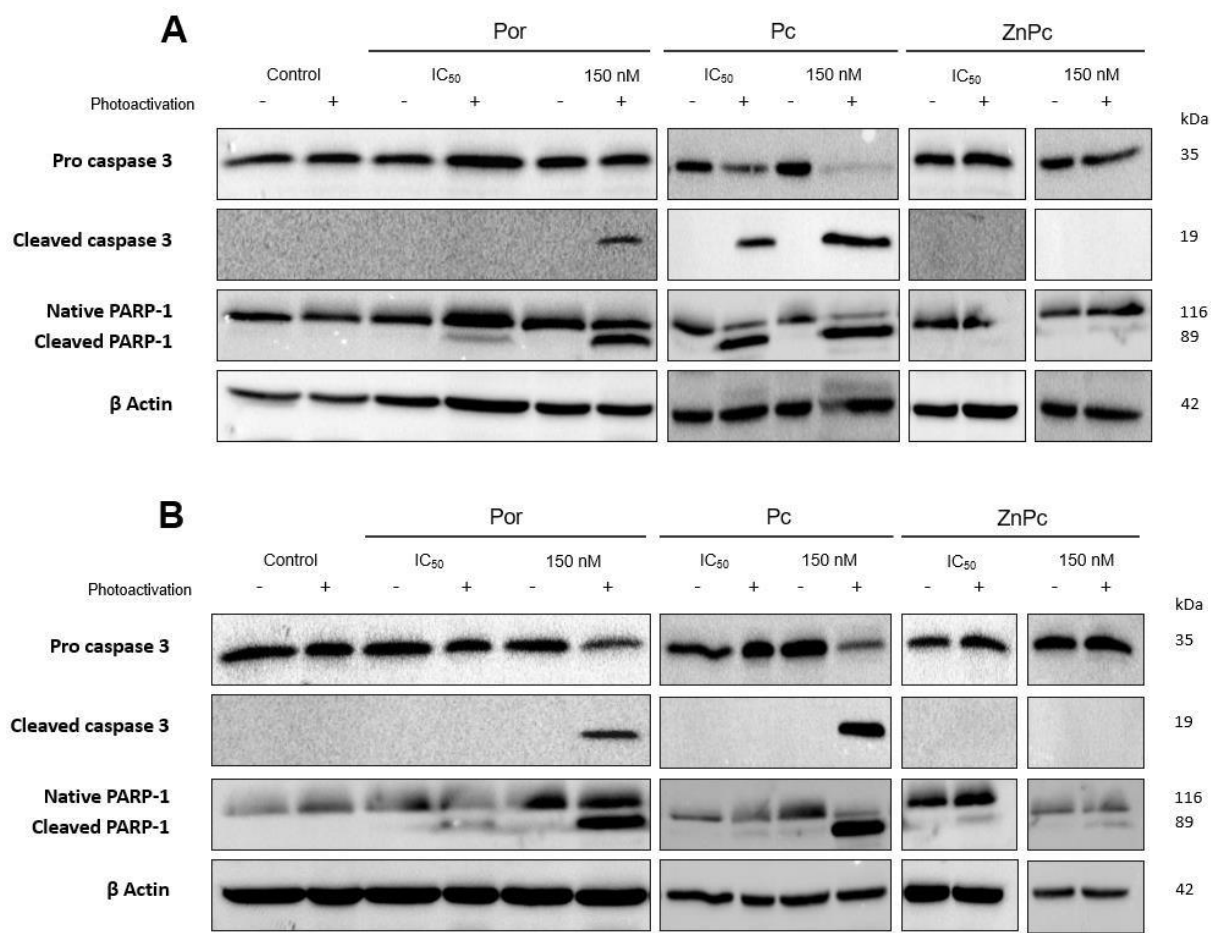


Figure 65 : Effets des composés sur les lignées du CaP.

(A) Lignée DU145 : les cellules ont été traitées ou non avec **Por**, **Pc** et **ZnPc**. (B) Lignée PC-3 : les cellules ont été traitées ou non avec **Por**, **Pc** et **ZnPc**. La β -actine a été utilisée comme contrôle de dépôt.

Afin d'étudier les dommages à l'ADN comme la formation de fragments oligonucléosomiques durant l'apoptose induite par la photoactivation des composés, le taux de fragmentation d'ADN a été déterminé par ELISA 24 h après photoactivation (Figure 66).

Comme précédemment, les cellules ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h puis traitées ou non avec les 3 composés aux IC₅₀ déterminées. Après 24 h et suite au changement de milieu de culture sans rouge de phénol, les cellules ont été photoactivées ou non. Les cellules ont ensuite été récupérées 24 h post-irradiation et le taux de fragmentation d'ADN a été quantifié par ELISA.

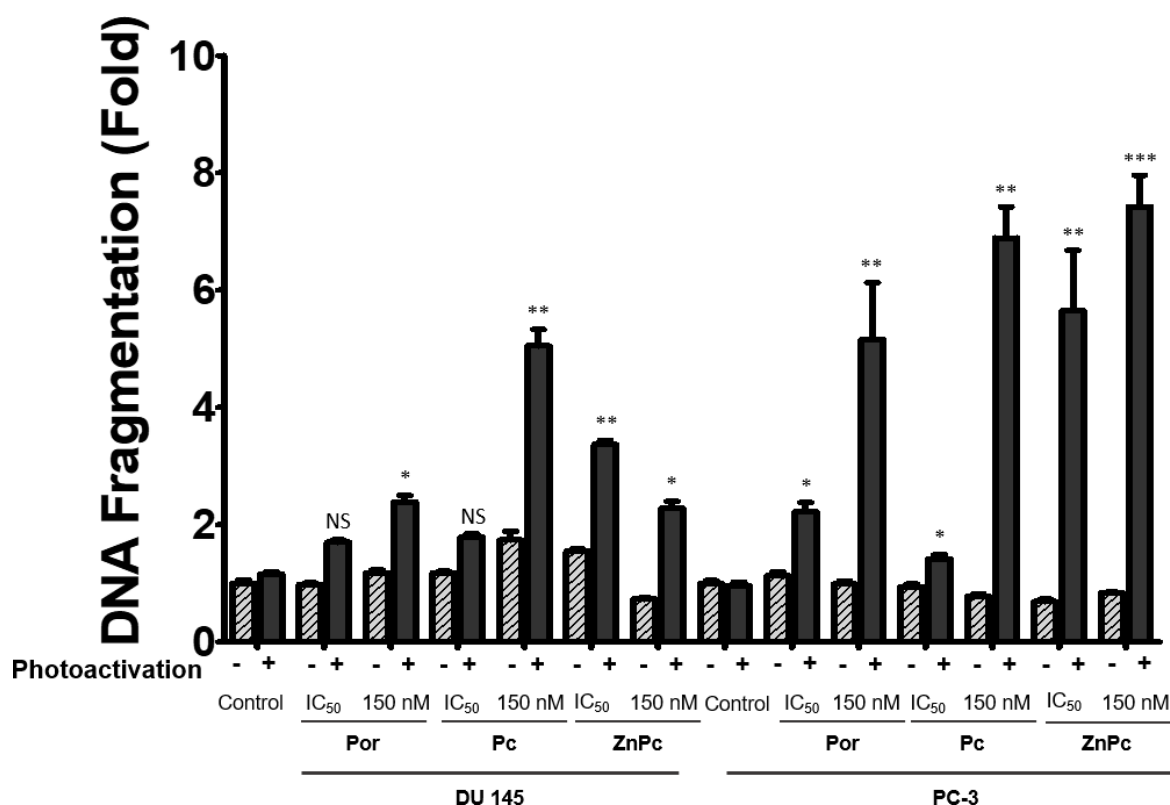


Figure 66 : Induction de la fragmentation de l'ADN.

Les résultats ont été rapportés en n-fold par rapport au contrôle (lumière seule). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (N=3). *p < 0,05 ; **p < 0,01 et ***p < 0,001 par rapport au groupe témoin .

Pour la lignée DU145, les résultats indiquent un faible clivage de l'ADN avec un « fold » de 2.4 pour la **Por** à une forte concentration, contrairement à la **Pc** qui elle induit une forte fragmentation de l'ADN avec un « fold » de 5. Il est à noter aussi que la **ZnPc** entraîne une fragmentation de l'ADN significative et ce à l'IC₅₀ comme à une forte concentration (« fold » d'environ 3 et 2 respectivement).

Les résultats sont un peu différents pour la lignée PC-3. Les 3 composés vont induire un taux élevé de fragmentation de l'ADN avec des « fold » 5, 5.5 et 7.5 pour **Por**, **Pc** et **ZnPc** respectivement. La différence majeure réside dans le fort clivage de l'ADN par la **ZnPc** à la forte concentration (« fold » 7.5) par comparaison à la lignée DU145 (« fold » 2).

VI.2.5. Conclusion

Les résultats présentés ci-dessus nous permettent d'affirmer le potentiel anticancéreux de ces 3 complexes. Ils présentent tous une cytotoxicité uniquement après photoactivation. L'analyse de l'expérience portant sur la production d'EROs nous a permis de mettre en évidence leur production uniquement après photoactivation et cela de façon très significative au sein des deux lignées. A ce stade, il nous est impossible d'affirmer qu'un composé serait plus efficace qu'un autre. Les résultats de microscopie confocale nous ont permis de mettre en évidence une bonne internalisation de nos complexes. Néanmoins aucune co-localisation n'est visible au niveau des mitochondries, lysosomes ou RE. Nous supposons donc que nos complexes se localisent au niveau du cytoplasme, mais il est possible qu'ils se co-localisent avec d'autres organites. Globalement, les résultats de WB et du test ELISA nous permettent d'affirmer que les trois complexes induisent la mort des cellules via la voie apoptotique. Il semble que les complexes arène-Ru Pc ou Por possèdent les mêmes capacités de clivage pour la pro-caspase-3, la PARP-1 et la fragmentation de l'ADN. L'ajout de Zn au centre de la Pc ne semble pas permettre de voir de clivage au niveau la pro-caspase-3 et de la PARP-1 ou de la caspase-3. Néanmoins, une augmentation fragmentation de l'ADN est observée, laissant penser que ce composé emprunte bien la voie apoptotique.

VII.1. Article 5

Combination of tetrapyrridylporphyrins and arene ruthenium(II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy

Manuel Gallardo-Villagrán, **Lucie Paulus**, Yves Champavier, David Yannick Leger, Bruno Therrien and Bertrand Liagre,

J. Porphyrins Phthalocyanines **2022**, 26, 533-541;
doi.org/10.1142/S1088424622500018

Le sarcome synovial est le 4^{ème} type de cancer des tissus mous le plus fréquent, touchant le plus souvent les hommes. Cependant, il est généralement diagnostiqué de façon tardive en raison de son évolution lente et son aspect bénin. Actuellement, le traitement correspond à une chirurgie invasive permettant de retirer les tissus tumoraux suivie d'une chimiothérapie ou radiothérapie. Ces traitements peuvent ainsi induire une perte de mobilité ou ajouter de la rigidité à l'articulation. Il est donc important de minimiser l'impact sur les tissus sains afin de préserver la mécanique de l'articulation. C'est donc dans cet objectif que la PDT pourrait jouer un rôle. Dans cette étude, il ne s'agit pas de cages cubiques ou prismatiques mais de structures arène-Ru planes. Ainsi 8 complexes ont été testés *in vitro* sur des cellules humaines de sarcome synovial (SW982). Le complexe le plus prometteur s'avère être la TPyP comme PS. Il a également été démontré que la présence de Zn²⁺ au cœur du PS augmente la toxicité et réduit l'efficacité de la PDT. Néanmoins ces résultats sont encourageants pour poursuivre l'étude de ces composés et de leurs effets dans d'autres types de cancers.



Combination of tetrapyridylporphyrins and arene ruthenium(II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy

Manuel Gallardo-Villagrán^{a,c}, Lucie Paulus^a, Yves Champavier^{a,b},
David Yannick Leger^{a*}, Bruno Therrien^{c*} and Bertrand Liagre^{a*}

^aLaboratoire PEIRENE, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, EA 7500, F-87025 Limoges, France

^bBISCEM, NMR platform, Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS), Limoges, France

^cInstitut de Chimie, Université de Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland

Received 11 October 2021

Accepted 27 October 2021

POLYTHEA special issue

ABSTRACT: Four tetrapyridylporphyrin and four dipyridylporphyrin arene ruthenium complexes have been synthesized and characterized. In these complexes, the porphyrin core is either metal-free or occupied by zinc, and the arene ligand of the arene ruthenium units are either the standard methyl-isopropyl-benzene (*p*-cymene) or the less common phenylpropanol (PhPrOH) derivative. The porphyrin derivatives are coordinated to four arene ruthenium units or only two, in accordance with the number of pyridyl substituents at the periphery of the porphyrins, 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphine (TPyP) and 5,15-diphenyl-10,20-di(pyridin-4-yl)porphyrin (DPhDPyP). All eight complexes were evaluated as anticancer agents on synovial sarcoma cells, in the presence and absence of light, suggesting that both the arene ligand and the porphyrin core substituent can play a crucial role in fine-tuning the photodynamic activity of such organometallic photosensitizers.

KEYWORDS: photodynamic therapy, porphyrins, arene ruthenium, synovial sarcoma.

INTRODUCTION

Could we cure cancer with light? The answer is yes we could, using photodynamic therapy (PDT). However, light must go hand in hand with oxygen and a chemical compound that acts as an intermediary between the other two. The energy from light can be absorbed and reused or transferred by substances that we know as photoactive compounds, chromophores or photosensitizers (PS). These substances reach a higher energy excited state as a consequence of their interaction with photons. During relaxation, the PS can interact with other molecules or substrates to transmit the absorbed energy. This is the principle on which PDT is based (Fig. 1). In PDT, the PS is irradiated at a certain wavelength (λ), reaching an excited

singlet state. During relaxation to ground state, the PS can go through an intermediate excited triplet state and interact with O₂ (Fig. 2). This interaction can produce singlet oxygen (¹O₂) that in turn can give rise to radical oxygen species (ROS) [1–4]. The key to PDT is ROS production, since it could lead to oxidative stress and consequently to cell death [5, 6]. Moreover, ROS are tremendously reactive, so their lifetime lasts only a few nanoseconds [2, 7], which makes the cell death process specifically located to the irradiated area. For these reasons, PDT is considered non-invasive, and its use is increasingly widespread in the fight against cancer and other diseases.

Throughout recent decades, PDT has been one of the most fast-growing treatments against skin cancer [8, 9], acne [10, 11] and other skin diseases [12, 13]. The FDA have already approved the use of PDT in multiple pathologies like actinic keratosis, advanced cutaneous T-cell lymphoma, Barrett's esophagus, basal cell skin cancer, esophageal cancer, non-small cell lung cancer

*Correspondence to: David Yannick Leger, email: david.leger@unilim.fr, Bruno Therrien, email: bruno.therrien@unine.ch and Bertrand Liagre, email: bertrand.liagre@unilim.fr

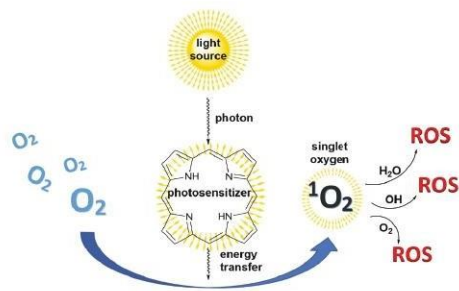


Fig. 1. Basic outline of the principles of PDT. The photosensitizer is excited by an external light source, transfers its energy to O_2 , which is transformed into singlet oxygen, giving rise to reactive oxygen species (ROS).

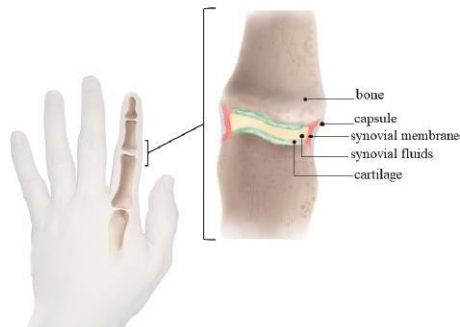


Fig. 3. Representation of the synovial tissue that connects the bones in the joints (only major tissues are represented).

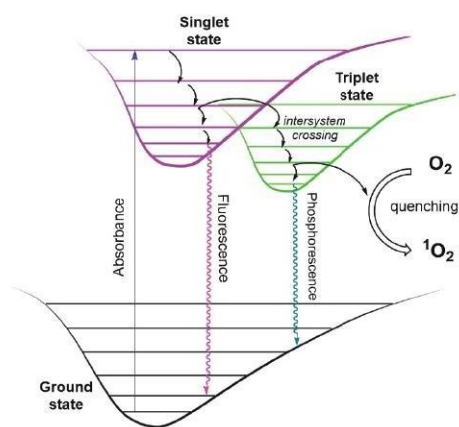


Fig. 2. Upon excitation to a singlet state, an electron can return directly to the ground state (fluorescence) or go through an intermediate triplet state (phosphorescence), where it can interact with O_2 .

and squamous cell skin cancer. Furthermore, other types of cancer and more pathologies such as synovial sarcoma [14, 15], rheumatoid arthritis [16], bacterial infections [17, 18], are also under PDT investigations.

Synovial sarcoma is the fourth most common type of soft tissue cancer [19], representing approximately 10% of such cancers. It usually occurs in the surrounding area of large joints such as the synovial membrane, tendons, bursae or joint capsules. It is more common in men than women and in ages between 15 to 40 years old [20]. However, it is usually diagnosed late due to its slow progression, its benign appearance and the fact that it is often mistaken with pain due to trauma. The causes that give rise to this type of cancer are not yet fully understood [14]. The actual treatment involves invasive

surgery where tumoral tissues are removed [21]. Often, this is followed by radiotherapy and/or chemotherapy [22]. Evidently, this treatment entails a significant loss of soft tissue that can involve loss of mobility or add rigidity to the joint (Fig. 3). Therefore, minimizing the impact on healthy tissue can help to preserve better mobility in the joint and this is why PDT could play an important role, thanks to its minimal invasiveness and high precision.

However, PDT can likewise have some limitations, as a low solubility of PS, low concentration of oxygen in the target tissue or photosensitivity of the skin after treatment [23]. Many chromophores used in PDT show low solubility in biological media. This could lead to increase doses of PS to ensure optimal concentration in the target tissue, thus by increasing the dose of PS, side effects such as skin photosensitivity can appear. On the other hand, skin photosensitivity after PDT can be resolved using PS that require very low concentrations to be effective, in addition to the fact that the PSs can be totally inactive in the absence of light. A solution to increase solubility without increasing the dose is encapsulation of the PS in nanoparticles [24], coordination to peptides [25] or entrapment in lysosomes [26]. Also, it is possible to increase the solubility by designing PSs that incorporate hydrophilic substituents like sulfonate ($-SO_3H$) [27] or phosphonate ($-PO(OR)_2$) [28]. One more common solution is to use a solvent (other than water) in which the PS is soluble. However, it is necessary to take into account the toxicity of that solvent and the stability of the PS in this media, since some of these solvents are potential ligands and could degrade a drug before activation [29]. The inactivation or photoprotection of PS is another solution to limit photosensitivity. In this approach, the PS is transported in physiological medium and released selectively when necessary, thus reducing side effects [30–32].

Regarding the lack of oxygen, the accelerated growth of cancer cells generally leads to decreasing concentrations of O_2 [33, 34], which reduces the probability of giving rise to ROS. To resolve this inconvenience, it is

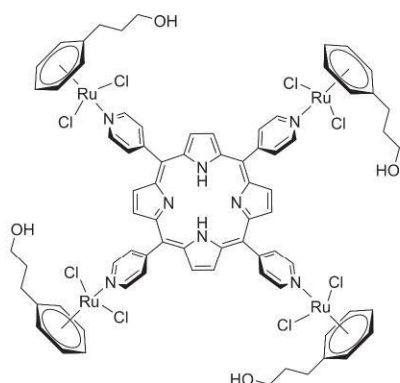


Fig. 4. Structure of a functionalized tetrapyrrolylporphyrin arene ruthenium complex.

possible to oxygenate the tumor tissue by hyperbaric oxygen therapy (HBO₂), prior to PDT [35].

Taking these aspects into account, we decided to design new PSs that increase the efficacy of PDT in synovial sarcoma based on the chromophore 5,10,15,20-tetra-(4-pyridyl)-21H,23H-porphine (TPyP). The TPyP is insoluble in water and poorly soluble in biological media. However, by coordination of arene ruthenium units to the pyridine substituents of TPyP (Fig. 4), solubility can be increased significantly. Moreover, these ruthenium complexes include arene ligands that have hydroxide groups (OH), that can potentially contribute to the presence of oxygen species, which can give rise to more ¹O₂ and ultimately increase ROS production [36].

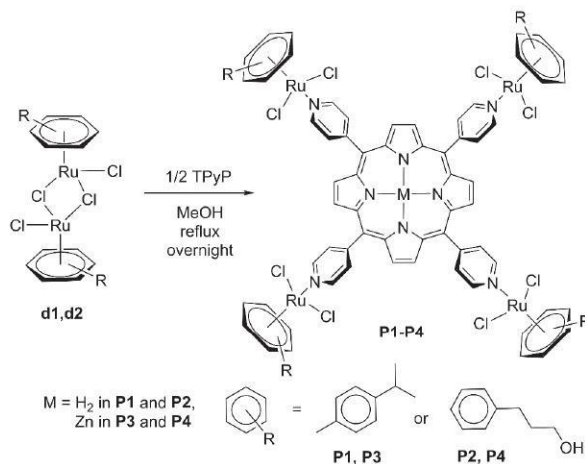
Ruthenium organometallic complexes are not new to PDT, since they have been used for years. The major reason behind that choice of metal is its oxidation state stability, being almost unreactive to air, water and O₂, unlike other metal-based compounds [37–43]. In addition, ruthenium has a high coordination number (6) and great facility to coordinate with ligands of complexed structures [37]. The arene ruthenium complexes could also improve the solubility in biological media [44]. Finally, ruthenium is less toxic than other metals such as platinum, a metal extensively used in metal-based drugs [45, 46].

In the present work, we show the synthesis and characterization of eight arene ruthenium complexes with tetrapyrrolylporphyrin or dipyrrolylporphyrin photosensitizers as a central ligand. For comparison, other derivatives incorporating different arene ligands, having two or four pyridyl groups, and with or without a metal in the core of the porphyrin have been synthesized and characterized. All new complexes were evaluated *in vitro*, in the presence and absence of light on synovial sarcoma cells.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and characterization of photosensitizers

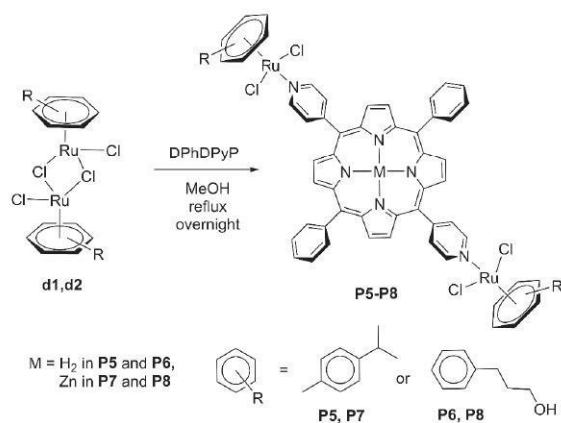
The synthesis of the arene ruthenium PSs is carried out by a one step reaction (Scheme 1). The dinuclear arene ruthenium dimers (**d1** or **d2**), synthesized as reported in the literature [47, 48], are mixed and reacted with the corresponding porphyrin (Scheme 1). Dimer **d1** is widely used [49–52] since the publication in 1972 by Zelonka and Baird [47], while the dimer **d2** is a more recent analogue and its biological activity remains unexplored [48].



Scheme 1. Reactions of dimers **d1** or **d2** with TPyP or Zn-TPyP to form photosensitizers **P1-P4**.

As illustrated in Scheme 1, the reaction involves the breakage of the dimer into two monomers prior to the coordination of the porphyrin through a Ru–N(Py) bond. The reaction is carried out at reflux in methanol for at least 8 hr with a 2:1 molar ratio. Then, the suspension is filtered off and washed repeatedly with Et₂O, to obtain the desired tetranuclear complexes **P1–P4**. We had already reported the synthesis of **P1** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(TPyP)Cl₈) [53]. However, new derivatives (with TPyP and Zn-TPyP) involving the dimer **d2**, giving rise to the photosensitizer **P2** ([Ru₂(PhPrOH)₂(TPyP)Cl₈) and **P4** ([Ru₂(PhPrOH)₂(Zn-TPyP)Cl₈), and with dimer **d1** to give **P3** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(Zn-TPyP)Cl₈), have been also synthesized following the same methodology (see ‘Experimental’). All compounds remain stable and unaltered at 4 °C for at least six months in the solid state. These compounds have acceptable solubility in DMSO and low solubility in other common solvents such as water, dichloromethane, chloroform, benzene, acetonitrile, acetone and ethanol. It should be noted that **P2** easily precipitates after minutes in DMSO. The recommended concentration of DMSO for *in vitro* tests is usually around 0.5%, although it depends on the cell line and the experimental conditions. According to the literature, 1% DMSO does not lead to toxicity in human myeloid leukemia and epithelia cancer [54]. On the other hand, in MDA-MB-231, MCF-7 and VNBRC1 cell lines it is not recommended to use more than 0.6% of DMSO [55]. The maximum concentration used in our study has been 0.25% DMSO in the highest concentration of PS tested (5 μM). We have not observed any deleterious effect on synovial sarcoma cells that could be attributed to the presence of DMSO.

Similarly, we have synthesized and characterized four new derivatives, which are based on 5,15-diphenyl-10,20-di(pyridin-4-yl)porphyrin (DPhDPyP), giving rise to the corresponding photosensitizers **P5–P8** (Scheme 2). We have decided to explore the synthesis with this new



porphyrin to study the influence of the number of ruthenium complexes coordinated to the porphyrin in terms of its efficacy in PDT, as well as the influence of the presence of phenyl groups in the porphyrinic unit. The experimental conditions are the same as those mentioned for TPyP but a 1:1 molar ratio is needed. Dimers **d1** and **d2** give rise to the photosensitizers **P5** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(DPhDPyP)Cl₄) and **P6** ([Ru₂(PhPrOH)₂(DPhDPyP)Cl₄) respectively, while **P7** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(Zn-DPhDPyP)Cl₄) and **P8** ([Ru₂(PhPrOH)₂(Zn-DPhDPyP)Cl₄) are synthesized from the Zn-porphyrin analogue, with **d1** and **d2** respectively. The yields are a bit lower than those observed with TPyP, between 51–67%. Like **P1–P4**, compounds **P5–P8** are soluble in DMSO. They also remain unaltered at 4 °C for at least 6 months in the solid state. All compounds are stable in DMSO for at least 1 hr. After that, new signals can be seen in the ¹H-NMR spectrum (< 1%), which can be attributed to the decomposition or transformation of the compound by ligand exchange with DMSO [29].

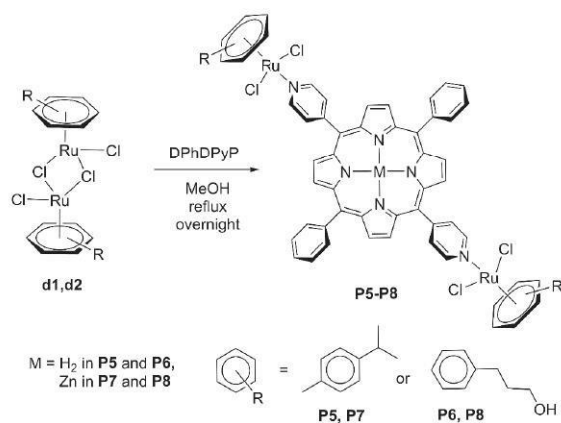
In vitro evaluation in synovial sarcoma cells

The photocytotoxicity (after irradiation) and cytotoxicity in the dark of photosensitizers **P1–P8** were evaluated *in vitro* on SW982 synovial sarcoma cells. A red-light lamp (λ = 630 nm) was used for irradiation (dose = 40 mW/cm² for 30 min). We decided to use red light because it is the only visible radiation that can pass through the skin and tissues of the synovial area of the joints. Blue radiation penetrates the skin for approximately 1 mm, green for about 2.5 mm, yellow not more than 4 mm, and red can penetrate as much as 5 mm before being fully absorbed [56]. The thickness of the human skin varies depending on the location between 0.5 - 4 mm, so to adapt our study to the future least invasive conditions possible, that is, transcutaneous PDT (without incision), irradiation with red light was the most appropriate.

Cell viability was analyzed by MTT assays for both, irradiated and non-irradiated cells. The results are shown in Table 1. The irradiated cells curve was fitted to the second order polynomial and from the resulting equation the IC₅₀ (inhibitory concentration at 50% viability) was calculated (Fig. 5). All PSs showed good photocytotoxic activity after irradiation and no significant toxicity in the dark. The synthesized PSs present three structural variations. One of them is the arene ligand, which is *p*-cymene or phenylpropanol. Interestingly, the four PSs with PhPrOH groups (**P2**, **P4**, **P6** and **P8**) improve the result when compared to their *p*-cymene analogues (**P1**, **P3**, **P5** and **P7**) (Table 1). The higher activity might be attributed to the presence of OH groups, which can help to increase the production of ROS after irradiation, either by direct interaction with another excited PS molecules or

As illustrated in Scheme 1, the reaction involves the breakage of the dimer into two monomers prior to the coordination of the porphyrin through a Ru–N(Py) bond. The reaction is carried out at reflux in methanol for at least 8 hr with a 2:1 molar ratio. Then, the suspension is filtered off and washed repeatedly with Et₂O, to obtain the desired tetranuclear complexes **P1–P4**. We had already reported the synthesis of **P1** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(TPyP)Cl₈) [53]. However, new derivatives (with TPyP and Zn-TPyP) involving the dimer **d2**, giving rise to the photosensitizer **P2** ([Ru₂(PhPrOH)₂(TPyP)Cl₈) and **P4** ([Ru₂(PhPrOH)₂(Zn-TPyP)Cl₈), and with dimer **d1** to give **P3** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(Zn-TPyP)Cl₈), have been also synthesized following the same methodology (see ‘Experimental’). All compounds remain stable and unaltered at 4 °C for at least six months in the solid state. These compounds have acceptable solubility in DMSO and low solubility in other common solvents such as water, dichloromethane, chloroform, benzene, acetonitrile, acetone and ethanol. It should be noted that **P2** easily precipitates after minutes in DMSO. The recommended concentration of DMSO for *in vitro* tests is usually around 0.5%, although it depends on the cell line and the experimental conditions. According to the literature, 1% DMSO does not lead to toxicity in human myeloid leukemia and epithelia cancer [54]. On the other hand, in MDA-MB-231, MCF-7 and VNBRC1 cell lines it is not recommended to use more than 0.6% of DMSO [55]. The maximum concentration used in our study has been 0.25% DMSO in the highest concentration of PS tested (5 μM). We have not observed any deleterious effect on synovial sarcoma cells that could be attributed to the presence of DMSO.

Similarly, we have synthesized and characterized four new derivatives, which are based on 5,15-diphenyl-10,20-di(pyridin-4-yl)porphyrin (DPhDPyP), giving rise to the corresponding photosensitizers **P5–P8** (Scheme 2). We have decided to explore the synthesis with this new



porphyrin to study the influence of the number of ruthenium complexes coordinated to the porphyrin in terms of its efficacy in PDT, as well as the influence of the presence of phenyl groups in the porphyrinic unit. The experimental conditions are the same as those mentioned for TPyP but a 1:1 molar ratio is needed. Dimers **d1** and **d2** give rise to the photosensitizers **P5** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(DPhDPyP)Cl₄) and **P6** ([Ru₂(PhPrOH)₂(DPhDPyP)Cl₄) respectively, while **P7** ([Ru₂(*p*-cymene)₂(Zn-DPhDPyP)Cl₄) and **P8** ([Ru₂(PhPrOH)₂(Zn-DPhDPyP)Cl₄) are synthesized from the Zn-porphyrin analogue, with **d1** and **d2** respectively. The yields are a bit lower than those observed with TPyP, between 51–67%. Like **P1–P4**, compounds **P5–P8** are soluble in DMSO. They also remain unaltered at 4 °C for at least 6 months in the solid state. All compounds are stable in DMSO for at least 1 hr. After that, new signals can be seen in the ¹H-NMR spectrum (< 1%), which can be attributed to the decomposition or transformation of the compound by ligand exchange with DMSO [29].

In vitro evaluation in synovial sarcoma cells

The photocytotoxicity (after irradiation) and cytotoxicity in the dark of photosensitizers **P1–P8** were evaluated *in vitro* on SW982 synovial sarcoma cells. A red-light lamp ($\lambda = 630$ nm) was used for irradiation (dose = 40 mW/cm² for 30 min). We decided to use red light because it is the only visible radiation that can pass through the skin and tissues of the synovial area of the joints. Blue radiation penetrates the skin for approximately 1 mm, green for about 2.5 mm, yellow not more than 4 mm, and red can penetrate as much as 5 mm before being fully absorbed [56]. The thickness of the human skin varies depending on the location between 0.5 - 4 mm, so to adapt our study to the future least invasive conditions possible, that is, transcutaneous PDT (without incision), irradiation with red light was the most appropriate.

Cell viability was analyzed by MTT assays for both, irradiated and non-irradiated cells. The results are shown in Table 1. The irradiated cells curve was fitted to the second order polynomial and from the resulting equation the IC₅₀ (inhibitory concentration at 50% viability) was calculated (Fig. 5). All PSs showed good photocytotoxic activity after irradiation and no significant toxicity in the dark. The synthesized PSs present three structural variations. One of them is the arene ligand, which is *p*-cymene or phenylpropanol. Interestingly, the four PSs with PhPrOH groups (**P2**, **P4**, **P6** and **P8**) improve the result when compared to their *p*-cymene analogues (**P1**, **P3**, **P5** and **P7**) (Table 1). The higher activity might be attributed to the presence of OH groups, which can help to increase the production of ROS after irradiation, either by direct interaction with another excited PS molecules or

explain why all our zinc-free PSs have a better IC₅₀ under light than their zinc analogs.

The last structural difference in our PSs is the presence of two (DPhDPyP) or four (TPyP) pyridyl substituents on the PS and as a consequence, the presence of two or four coordinated arene ruthenium units. All PSs with DPhDPyP showed a reduced PDT effect than their tetranuclear counterparts. The reason may be due to the fact that PSs with DPhDPyP only have two coordinated ruthenium arenes, instead of the four presented in PSs with TPyP. Arene ruthenium complexes have been reported to improve solubility in biological media [45], thus potentially increasing uptake. Finally, it is worth noting the absence or very low toxicity of the compounds without metal (**P1-P4**) even at the highest concentration tested. While, Zn compounds (**P5-P6**) show some toxicity in the dark (Table 1). Similar results have been reported with zinc porphyrins, pointing to the metal as the cause for the cell growth decay [64, 65].

CONCLUSIONS

We report the synthesis and characterization of eight arene ruthenium porphyrin photosensitizers with great potential to treat synovial sarcoma by PDT. The photosensitizer **P2** showed the best light/dark photocytotoxicity ratio (0.06 μM/5 μM), being around two orders of magnitude. We have demonstrated that the presence of zinc (II) in the core of the photosensitizers have a double negative effect, increasing toxicity and reducing PDT efficacy. On the other hand, we have shown how alkyl alcohols on the arene ligands can improve the PDT effect in SW982 sarcoma cells. These results encourage us to continue studying these compounds and their potential in PDT, such as intracellular localization, PDT effect in another type of cancers, as well as performing an *in vivo* study.

EXPERIMENTAL

General

Compounds **d1**, **d2** and **P1** were prepared as described in the literature [47, 48, 42]. Methanol, ethanol, diethyl ether and deuterated solvents (CDCl₃ and DMSO-d₆) were acquired from Sigma-Aldrich and used as received. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III HD 500 MHz, Avance III HD 400 MHz or a DRX 400 MHz spectrometers. The ¹H and ¹³C resonances of the deuterated solvents were used as the internal reference. Ruthenium(III) chloride hydrate, 1-isopropyl-4-methylcyclohexa-1,4-diene, 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine and zinc 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine were acquired from Sigma-Aldrich, 3-(cyclohexa-1,4-dien-1-yl)propan-1-ol from Fisher Scientific and 5,15-diphenyl-10,20-di(pyridin-4-yl)porphyrin and zinc 5,15-diphenyl-10,20-di(pyridin-

4-yl)porphyrin from Porphychem. We carried out all the *in vitro* tests and manipulations under an aseptic atmosphere and constant sterilization conditions. SW982 sarcoma synovial cells were provided by the American Type Culture Collection (ATCC—LGC Standards). Cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and L-glutamine were acquired from Sigma-Aldrich. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was bought in Acros Organics. The PSs (**P1-P8**) were dissolved at 1 mM concentration in DMSO just before use, then diluted in complete medium to the needed concentration and immediately preceding to use. The concentration of DMSO in the cell medium was in all cases lower than 0.25%. Cell irradiation was carried out using a red-light source, CureLight®, PhotoCure ASA, at 630 nm, and dose 40 mW/cm² for 30 min. Absorbance after MTT assay was measured at 540 nm by a Dynex Triad Multi Mode Microplate Reader, Dynex Technologies. UV-vis spectrums were carried out in SI Analytics model UvLine 9400 (Xenon lamp) spectrophotometer, 1.5 mL polystyrene cuvettes (wavelength range 280–800 nm) and diluting the PS in DMSO (10 nM). Fluorescence spectra were measured (550–800 nm) on a FLS980 spectrometer from Edinburgh Instruments, using 5,10,15,20-tetraphenylporphin as reference in toluene, while the PSs were dissolved 10 nM in DMSO. IR spectra were performed on a Frontier PerkinElmer spectrometer (600 – 4000 cm⁻¹). Spectra are shown in the Supporting Information (Fig. S1-S47).

Photocytotoxicity evaluation by MTT assays

First, trypsinization and counting of SW982 synovial sarcoma cells were carried out. Homogeneous solutions were prepared in 10 mL of culture medium with 700,000 cells. In a 96-well plate, 100 μL of the solution (7000 cells per well) were poured and the cells were incubated for 24 hr (37 °C and 5% CO₂). After that, 100 μL of PS solution in increasing concentration were poured per row in the plate and subsequent incubation 24 hr in the same conditions previously described. The PSs were dissolved in DMSO just before use and then added to culture medium in the desired concentrations. We have decided to use DMSO since it is the only solvent in which all PSs showed acceptable solubility, to keep the same experimental conditions. After incubation the medium was removed carefully and poured 100 μL of complete medium without red phenol per well. Then, the activation of PS by irradiation with red light (λ = 630 nm) is then carried out, applying 40 mW/cm² for 30 min. The lamp is put at 12 cm above of the plate in vertical position. After the irradiation the 96-well plate was put in the incubator during 18 hr. After this time, we added 10 μL of MTT solution (5 g/L) and the plate was put again inside the

incubator during 4 hr. Then, the media was removed and added 200 μ L of DMSO per well, stirring the plate gently (to avoid splashing between wells) for 3 min until homogenized. Finally, the absorbance was measured at 550 nm. This whole process was repeated in triplicate. Cytotoxicity measurements in the absence of light were carried out by repeating this entire protocol except the irradiation dose. The results obtained in the photocytotoxicity tests were expressed graphically as the mean \pm three standard deviations. Statistical significance was calculated using the Student's *t*-test where $P < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 is expressed as *, ** and *** respectively.

Synthesis of P2. In a 100 mL round bottom flask, a solution containing 60.0 mg (0.098 mmol) of **d2** and 30.1 mg (0.049 mmol) of TPYP in 30 mL of MeOH, was prepared. The solution was refluxed for 12 hr, then cooled to room temperature. The solution was filtered off and the resulting brown solid was washed with Et₂O (5 \times 10 mL).

P2. Yield 86% (78 mg). ¹H NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 500 MHz): δ 9.08 (m, 8H, CH_{py}), 8.92 (br s, 8H, CH_{porph}), 8.28 (m, 8H, CH_{py}), 5.98 (m, 8H, *m*-CH_{ar}), 5.76 (overlapping doublets, 8H, *o*-CH_{ar}), 5.75 (overlapping triplets, 4H, *p*-CH_{ar}), 4.59 (s, 4H, OH), 3.45 (m, 8H, CH₂), 2.47 (m, 8H, CH₂), 1.73 (m, 8H, CH₂), -3.06 (s, 2H, NH). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 125 MHz): δ 142.06 (C_{py}), 128.16 (C_{py}), 128.10 (C_{porph}), 125.46 (C_{py}), 107.83 (C_{propanol}), 88.79 (*m*-C_{ar}), 84.80 (*o*-C_{ar}), 82.91 (*p*-C_{ar}), 59.89 (CH₂), 32.04 (CH₂), 29.42 (CH₂). UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹): 445 (262300), 523 (197400), 588 (152500), 638 (125300). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν ; br s (3700-3200), s (3108), s (2916), s (2824), s (1614), s (1418).

The synthesis of **P3** and **P4** utilize the same protocol and molar ratio as in **P2**, but using the corresponding dimer (**d1**, **d2**) and porphyrin. **P5-P8** are synthesized in the same manner but using a molar ratio of 1:1 (dimer:porphyrin) (**DPhDPyP** or **Zn-DPhDPyP**).

P3. Yield 81% (234 mg). ¹H NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 400 MHz): δ 9.03 (d, ³J_{HH} = 5.55 Hz, 8H, CH_{py}), 8.85 (s, 8H, CH_{porph}), 8.23 (d, ³J_{HH} = 5.72 Hz, 8H, CH_{py}), 5.83 (d, ³J_{HH} = 6.14 Hz, 8H, CH_{ar}), 5.78 (d, ³J_{HH} = 6.15 Hz, 8H, CH_{ar}), 2.84 (m, ³J_{HH} = 6.91 Hz, 4H, CH_{ipr}), 4.58 (bs, 4H, OH), 2.09 (s, 12H, CH₃), 1.20 (m, ³J_{HH} = 5.55 Hz, 24H, CH_{3ipr}). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 101 MHz): δ 149.12 (C_{ar}), 148.50 (C_{py}), 132.48 (C_{porph}), 129.72 (C_{py}), 118.57 (C_{py}), 106.83 (C_{porph}), 100.56 (C_{ar}), 86.83 (CH_{ar}), 85.99 (CH_{ar}), 30.44 (CH_{ipr}), 21.97 (CH_{3ipr}), 18.34 (CH₃). Elemental analysis: Calcd. for C₈₀H₈₀Cl₈N₈O₄Ru₄Zn + 4 H₂O: C, 48.56; H, 4.48; N, 5.66. Found: C, 48.46; H, 4.63; N, 5.90. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹): 472 (59400), 518 (138300), 558 (55000), 599 (53300). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν ; br s (3600-3250), s (3091), s (2944), s (2881), s (1609).

P4. Yield 88% (82 mg). ¹H NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 400 MHz): δ 9.02 (br s, 8H, CH_{py}), 8.65 (br s, 8H, CH_{porph}), 8.22 (br s, 8H, CH_{py}), 5.98 (m, 8H, *m*-CH_{ar}), 5.75 (overlapping doublet, 8H, *o*-CH_{ar}), 5.73 (overlapping triplet,

4H, *p*-CH_{ar}), 4.58 (br s, 4H, OH), 3.45 (m, 8H, CH₂), 2.48 (m, 8H, CH₂), 1.73 (m, 8H, CH₂). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 101 MHz): δ 149.11 (C_{ar}), 148.47 (C_{py}), 132.48 (C_{porph}), 129.72 (C_{py}), 108.44 (C_{propanol}), 89.40 (*m*-C_{ar}), 85.33 (*o*-C_{ar}), 83.43 (*p*-C_{ar}), 60.46 (CH₂), 32.64 (CH₂), 30.00 (CH₂). Elemental analysis: Calcd. for C₇₆H₇₂Cl₈N₈O₄Ru₄Zn: C, 47.67; H, 3.79; N, 5.85. Found: C, 47.67; H, 3.79; N, 6.09. ESI-MS, *m/z*, 954.8 [M - [Ru(PhPrOH)Cl₂]₃ - Cl]⁺. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹): 522 (95300), 561 (45200), 598 (49800). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν ; br s (3500-3200), s (3067), s (2910), s (2881), s (1619), s (1408).

P5. Yield 51% (51 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 25 °C, 400 MHz): δ 9.47 (m, 4H, CH_{py}), 8.87 (m, 10H, CH_{ph}), 8.21 (m, 8H, CH_{porph} and CH_{py}), 7.78 (br s, 4H, CH_{porph}), 5.69 (d, ³J_{HH} = 5.72 Hz, 4H, CH_{ar}), 5.47 (d, ³J_{HH} = 5.48 Hz, 4H, CH_{ar}), 3.20 (m, 2H, CH_{ipr}), 2.23 (s, 6H, CH₃), 1.47 (d, ³J_{HH} = 6.86 Hz, 12H, CH_{3ipr}), -2.81 (s, 1H, NH), -2.87 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (CDCl₃, 25 °C, 101 MHz): δ 153.04 (C_{py}), 141.76 (C_{ph}), 134.54 (C_{py}), 130.20 (C_{ph}), 127.97 (C_{py}), 126.77 (C_{porph}), 121.55 (C_{porph}), 120.93 (C_{porph}), 83.23 (CH_{ar}), 82.55 (CH_{ar}), 30.92 (CH_{ipr}), 22.50 (CH_{3ipr}), 18.42 (CH₃). Elemental analysis: Calcd. for C₆₂H₅₆Cl₄N₆Ru₂: C, 60.99; H, 4.59; N, 6.84. Found: C, 62.76; H, 4.81; N, 7.09. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹): 513 (143500), 549 (319100), 590 (134400), 648 (29000). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν ; br s (3550-3400), s (3080), s (2968), s (1638), s (1491).

P6. Yield 61% (60 mg). ¹H NMR (CDCl₃, 25 °C, 400 MHz): δ 9.50 (d, ³J_{HH} = 5.96 Hz, 4H, CH_{py}), 8.89 (m, 10H, CH_{ph}), 8.23 (m, 8H, CH_{porph} and CH_{py}), 7.80 (m, 4H, CH_{porph}), 5.93 (t, ³J_{HH} = 5.64 Hz, 4H, *m*-CH_{ar}), 5.81 (t, ³J_{HH} = 5.58 Hz, 2H, *p*-CH_{ar}), 5.62 (d, ³J_{HH} = 5.72 Hz, 4H, *o*-CH_{ar}), 3.88 (q, ³J_{HH} = 5.83 Hz, 4H, CH₂), 2.84 (t, ³J_{HH} = 7.71 Hz, 4H, CH₂), 2.07 (m, 4H, CH₂), 1.69 (overlapping multiplet, 2H, OH), -2.80 (s, 2H, NH). Elemental analysis: Calcd. for C₆₀H₅₂Cl₄N₆O₂Ru₂: C, 58.45; H, 4.25; N, 6.82. Found: C, 59.85; H, 4.56; N, 6.88. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹): 509 (43400), 550 (154700), 589 (48200), 648 (4000). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν ; br s (3600-3200), s (3102), s (2892), s (1641).

P7. Yield 54% (68 mg). ¹H NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 400 MHz): δ 9.00 (m, 4H, CH_{py}), 8.82 (m, 10H, CH_{ph}), 8.20 (m, 8H, CH_{porph} and CH_{py}), 7.81 (m, 4H, CH_{porph}), 5.83 (d, ³J_{HH} = 5.39 Hz, 4H, CH_{ar}), 5.78 (d, ³J_{HH} = 6.18 Hz, 4H, CH_{ar}), 2.84 (m, 2H, CH_{ipr}), 2.09 (s, 6H, CH₃), 1.20 (d, ³J_{HH} = 6.94 Hz, 12H, CH_{3ipr}). Elemental analysis: Calcd. for C₆₂H₅₂Cl₄N₆Ru₂Zn: C, 57.62; H, 4.21; N, 6.50. Found: C, 58.51; H, 4.32; N, 6.59. ESI-MS, *m/z*, 950.9 [M - [Ru(*p*-cymene)Cl₂] - Cl]⁺, 680.8 [Zn-DPhDPyP + H]⁺. UV/vis (DMSO), λ , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹): 493 (55600), 524 (99900), 562 (349500), 600 (221100), 626 (81300). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν ; br s (3650-3200), s (3080), s (2988), s (1639).

P8. Yield 67% (84 mg). ¹H NMR (DMSO-d₆, 25 °C, 400 MHz): δ 9.01 (m, 4H, CH_{py}), 8.82 (m, 10H, CH_{ph}), 8.20 (m, 8H, CH_{porph} and CH_{py}), 7.82 (m, 4H, CH_{porph}),

5.99 (m, 4H, *m-CH_{ar}*), 5.75 (m, 6H, *p-CH_{ar}* and *o-CH_{ar}*), 4.59 (m, 2H, *OH*), 3.46 (m, 4H, *CH₂*), 2.47 (m, 4H, *CH₂*), 1.73 (m, 4H, *CH₂*). Elemental analysis: Calcd. for C₆₀H₅₀Cl₄N₆O₃Ru₂Zn: C, 55.59; H, 3.89; N 6.48. Found: C, 56.44; H 4.09; N 6.56. ESI-MS, m/z, 952.9 [M – [Ru(PhPrOH)Cl₂] – Cl]⁺. UV/vis (DMSO), λ, nm (ε, M⁻¹.cm⁻¹): 482 (21700), 521 (46900), 559 (253400), 600 (108700), 626 (37900). FT-IR (ATR, solid, cm⁻¹): ν; br s (3580-3150), s (3012), s (2917), s (1591).

Acknowledgments

We thank all the people involved in the project POLYTHEA, funding by European Union's Horizon 2020 under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 764837. M. G.-V. thanks Stéphanie Leroy-Lhez, Johann Bouclé and Nidia Maldonado-Carmona for access to fluorescence equipment and for their great help.

Supporting information

Additional photosensitizer results are given in the supplementary material. This material is available free of charge via the Internet at <https://www.worldscientific.com/doi/suppl/10.1142/S1088424622500018>

REFERENCES

- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek MJ and Peng Q. *J. Natl Cancer Inst.* 1998; **90**: 889–905.
- Dolmans DE., Fukumura D and Jain RK. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; **3**: 380–387.
- De Silva P, Saad MA, Thomsen HC, Bano S, Ashraf S and Hasan T. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2020; **24**: 1320–1360.
- Vargas-Zúñiga GI, Kim HS, Li M, Sessler JL and Kim JS. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2021; **25**: 773–793.
- Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB and Hamblin MR. *Cancers.* 2011; **3**: 2516–2539.
- Buytaert E, Dewaele M and Agostinis P. *BBA-Rev Cancer.* 2007; **1776**: 86–107.
- Simon HU, Haj-Yehia A and Levi-Schaffer F. *Apoptosis.* 2000; **5**: 415–418.
- Dos Santos AF, De Almeida DRQ, Terra LF, Baptista MS and Labriola, L. *J Cancer Metastasis Treat.* 2019; **5**: 25.
- Zhang L, Ji Z, Zhang J and Yang S. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; **28**: 159–165.
- Hilerowicz Y, Friedman O, Zur E, Ziv R, Koren A, Salameh F, Mehrabi JN and Artzi O. *Lasers Surg Med.* 2020; **52**: 966–970.
- Ding HL, Wang XL, Wang HW and Huang Z. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2011; **8**: 343–346.
- Ruiz-Moreno JM, Montero JA and Barile S. *Eur J. Ophthalmol.* 2006; **16**: 426–434.
- Montero JA, Ruiz-Moreno JM and Fernandez-Muñoz M. *Eur J Ophthalmol.* 2011; **21**: 503–505.
- Kusuzaki K, Murata H, Matsubara T, Miyazaki S, Shintani K, Seto M, Matsumine A, Hosol A, Sugimoto T and Uchida A. *Photochem Photobiol.* 2005; **81**: 705–710.
- Takeda K, Kunisada T, Miyazawa S, Nakae Y and Ozaki T. *Clinical orthopaedics and related research.* 2008; **466**: 1726–1733.
- Gallardo-Villagrán M, Leger DY, Liagre B, Therrien B. *Int J Mol Sci.* 2019; **20**: 3339.
- Maisch T, Szeimies RM, Jori G and Abels C. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; **3**: 907–917.
- Maldonado-Carmona N, Ouk TS, Calvete MJ, Pereira MM, Villandier N and Leroy-Lhez S. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2020; **19**: 445–461.
- Siegel, H. J., Sessions, W., Casillas Jr, M. A., Said-Al-Naief, N., Lander, P. H. and Lopez-Ben, R. *Orthopedics.* 2007; **30**: 1020.
- Cadman NL, Soule EH and Kelly PJ. 1965; **18**: 613–627.
- Bergovec M, Smerdelj M, Bacan F, Seiwerth S, Herceg D and Prutki M. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2018; **104**: 227–230.
- Kampe CE, Rosen G, Eilber F, Eckardt J, Lowenbraun S, Foster J, Forscher C and Selch M. *Cancer.* 1993; **72**: 2161–2169.
- Gunaydin G, Gedik ME and Ayan S. *Front Chem.* 2021; **9**: 400.
- Lucky SS, Soo KC and Zhang Y. *Chem Rev.* 2015; **115**: 1990–2042.
- Jiang Z, Shao J, Yang T, Wang J and Jia L. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; **87**: 98–104.
- Huang H, Yu B, Zhang P, Huang J, Chen Y, Gasser G, Ji L and Chao H. *Angew Chem Int Ed.* 2015; **54**: 14049–14052.
- Dubuc C, Langlois R, Bénard F, Cauchon N, Klarskov K, Tone P and van Lier JE. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008; **18**: 2424–2427.
- Liang G, Wang L, Yang Z, Koon H, Mak N, Chang CK and Xu B. *Chem Comm.* 2006; **48**: 5021–5023.
- Patra M, Joshi T, Pierroz V, Ingram K, Kaiser M, Ferrari S, Spingler B, Keiser J and Gasser G. *Chem Eur J.* 2013; **19**: 14768–14772.
- Roy I, Bobbala S, Young RM, Beldjoudi Y, Nguyen MT, Cetin MM, Cooper JA, Allen S, Anamimoghdam O, Scott EA, Wasielewski MR and Stoddart JF. *J Am Chem Soc.* 2019; **141**: 12296–12304.
- Leonidova A, Anstaett P, Pierroz V, Mari C, Spingler B, Ferrari S and Gasser G. *Inorg Chem.* 2015; **54**: 9740–9748.
- Leonidova A, Mari C, Aebersold C and Gasser G. *Organometallics.* 2016; **35**: 851–854.
- Hockel M and Vaupel P. *J Natl Cancer Inst.* 2001; **93**: 266–276.
- Vaupel P, Mayer A and Höckel M. *Methods Enzymol.* 2004; **381**: 335–354.

35. Maier A, Tomaselli F, Anegg U, Rehak P, Fell B, Luznik S, Pinter H and Smolle-Jüttner FM. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000; **18**: 649–655.
36. Bonnett R, Djelal BD and Nguyen A. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2001; **5**: 652–661.
37. Kaspler P, Lazic S, Forward S, Arenas Y, Mandel A and Lilje L. *Photochem Photobiol Sci.* 2016; **15**: 481–495.
38. Lv Z, Wei H, Li Q, Su X, Liu S, Zhang KY, Lv W, Zhao Q, Li X and Huang W. *Chem Sci.* 2018; **9**: 502–512.
39. Yano T, Hishida S, Nakai M and Nakabayashi Y. *Inorganica Chim Acta.* 2017; **454**: 162–170.
40. Lei W, Zhou Q, Jiang G, Zhang B and Wang X. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; **10**: 887–890.
41. Huang H, Zhang P, Yu B, Jin C, Ji L and Chao H. *Dalton Trans.* 2015; **44**: 17335–17345.
42. Schmitt F, Govindaswamy P, Süß-Fink G, Ang WH, Dyson PJ, Juillerat-Jeanneret L and Therrien B. *J Med Chem.* 2008; **51**: 1811–1816.
43. Schmitt F, Freudenreich J, Barry NP, Juillerat-Jeanneret L, Süß-Fink G and Therrien B. *J Am Chem Soc.* 2012; **134**: 754–757.
44. Therrien B and Furrer J. *Adv Chem Eng.* 2014; **2014**: 1–20.
45. Yano T, Hishida S, Nakai M and Nakabayashi Y. *Inorganica Chim Acta.* 2017; **454**: 162–170.
46. Bogoeva V, Siksjø M, Sæterbø KG, Melø TB, Bjørkøy A, Lindgren M and Gederaas OA. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2016; **14**: 9–17.
47. Zelonka RA and Baird M. *Can J Chem.* 1972; **50**: 3063–3072.
48. Čubrilo J, Hartenbach I, Schleid T and Winter RF. *Z Anorg Allg Chem.* 2006; **632**: 400–408.
49. Govindaswamy P, Süß-Fink G and Therrien B. *Organometallics.* 2007; **26**: 915–924.
50. Stringer T, Therrien B, Hendricks DT, Guzgay H and Smith GS. *Inorg Chem Commun.* 2011; **14**: 956–960.
51. Gupta G, Yap GP, Therrien B and Rao KM. *Polyhedron.* 2009; **28**: 844–850.
52. Kota TP and Kollipara MR. *J Chem Sci.* 2014; **126**: 1143–1151.
53. Schmitt F, Govindaswamy P, Süß-Fink G, Ang WH, Dyson PJ, Juillerat-Jeanneret L and Therrien B. *J Med Chem.* 2008; **51**: 1811–1816.
54. Villarroel A, Duff A and Hu T. *FASEB J.* 2020; **34**: 1–1.
55. Nguyen ST, Nguyen HTL and Truong KD. *Biomed Res Ther.* 2020; **7**: 3855–3859.
56. Clement M, Daniel G and Trelles M. *J Cosmet Laser Ther.* 2005; **7**: 177–189.
57. Gomes AC, Mello AL, Ribeiro MG, Garcia DG, Da Fonseca CO, Salazar MDA, Schönthal AH and Quirico-Santos T. *Arch Immunol Ther Exp.* 2017; **65**: 285–297.
58. Mroz P, Bhaumik J, Dogutan DK, Aly Z, Kamal Z, Khalid L, Kee HL, Bocian DF, Holten D, Lindsey JS and Hamblin MR. *Cancer Lett.* 2009; **282**: 63–76.
59. Jones HJ, Vernon DI and Brown SB. *Br J Cancer.* 2003; **89**: 398–404.
60. Meier D, Botter SM, Campanile C, Robl B, Gräfe S, Pellegrini G, Born W and Fuchs B. *Int J Cancer.* 2017; **140**: 1680–1692.
61. Senge MO and Brandt JC. *Photochem Photobiol.* 2011; **87**: 1240–1296.
62. Kamkaew A, Lim SH, Lee HB, Kiew LV, Chung LY and Burgess K. *Chem Soc Rev.* 2013; **42**: 77–88.
63. Afaneh AT and Schreckenbach G. *Am J Phys Chem.* 2015; **119**: 8106–8116.
64. Lutton JD, Abraham NG, Drummond GS, Levere RD and Kappas A. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; **94**: 1432–1436.
65. Yang G, Nguyen X, Ou J, Rekulapelli P, Stevenson DK and Dennery PA. *Am J Hematol.* 2001; **97**: 1306–1313.

VII.2. Article 6

A Combination of Ruthenium Complexes and Photosensitizers to Treat Colorectal Cancer

Jacquie Massoud, Aline Pinon, Manuel Gallardo-Villagrán, **Lucie Paulus**, Catherine Ouk, Claire Carrion, Sayed Antoun, Mona Diab-Assaf, Bruno Therrien, Bertrand Liagre

En révisions majeures, Inorganics

Le cancer colorectal (CCR) étant le 2^{ème} cancer le plus meurtrier au monde chez les hommes ainsi que chez les femmes ; il semble être une cible toute trouvée. En effet, il existe actuellement de nombreuses thérapies intégrant la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie... Néanmoins, ces méthodes restent actuellement insuffisantes afin de traiter le CCR à un stade avancé. De plus, il est établi une résistance des cellules tumorales à de nouveaux traitements ainsi que des effets secondaires au niveau des tissus sains. C'est pourquoi l'utilisation de thérapie locale telle que la PDT a attiré l'attention des chercheurs. Dans cette étude, deux cages cubiques arène-Ru ont été utilisées *in vitro* sur des lignées du CCR (HCT116 et HT-29). L'unique différence entre ces deux cages réside dans l'ajout de métal Zn²⁺ au cœur du noyau tétrapyrrolique de la TPyP. Les tests de viabilité cellulaire ont permis de conclure à une absence de cytotoxicité à l'obscurité. Une fois photoactivés, les deux complexes ont montré une cytotoxicité vis-à-vis des deux lignées, permettant ainsi l'obtention d'une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire . Néanmoins, il apparaît déjà que l'ajout du métal réduit l'efficacité du PS. Il a ainsi été montré une augmentation de la production d'EROs post-PDT sans modification à l'obscurité versus cellules témoins. Des analyses complémentaires ont permis d'affirmer l'internalisation cellulaire des composés et leur colocalisation au niveau du cytoplasme. Afin de déterminer la voie de mort cellulaire impliquée, les analyses ont mis en évidence une apoptose tardive suite au marquage cellulaire par l'annexine V analysé par cytométrie en flux. Pour aller dans le même sens, l'analyse des marqueurs protéiques apoptotiques tels que la caspase 3 et la PARP ont mis en évidence dans les deux cas un clivage (activation de la caspase 3 et inhibition de la PARP) après photoactivation. En conclusion, cette étude montre *in vitro* le potentiel des ces deux cages arène-Ru dans le traitement du CCR. Néanmoins, il est important de noter que l'ajout de Zn entraîne une diminution de la phototoxicité pouvant être lié à une fluorescence plus importante du PS métallique.

Article

A Combination of Ruthenium Complexes and Photosensitizers to Treat Colorectal Cancer

Jacquie Massoud ¹, Aline Pinon ¹, Manuel Gallardo-Villagrán ^{1,2}, Lucie Paulus ¹, Catherine Ouk ³, Claire Carrion ³, Sayed Antoun ⁴, Mona Diab-Assaf ⁵, Bruno Therrien ^{2,*} and Bertrand Liagre ^{1,*}

¹ Université de Limoges, LABC5, UR 22722, Faculté de Pharmacie, F-87000 Limoges, France; jacquie.massoud@etu.unilim.fr (J.M.); aline.pinon@unilim.fr (A.P.); villagran@outlook.com (M.G.-V.); lucie.paulus@etu.unilim.fr (L.P.)
² Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland; bruno.therrien@unine.ch (B.T.)
³ Université de Limoges, CNRS, Inserm, CHU Limoges, BISCem, UAR 2015, U5 42, F-87000 Limoges, France; catherine.ouk@unilim.fr (C.O.); claire.carrion@unilim.fr (C.C.)
⁴ Department of Chemistry and Biochemistry, Lebanese University, Lebanon; sayedantoun@yahoo.fr (S.A.)
⁵ Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Hadath El Jebbeh, Beyrouth 21219, Lebanon; mdiabassaf@ul.edu.lb (M.D.-A.)
 * Correspondence: bertrand.liagre@unilim.fr; bruno.therrien@unine.ch

Abstract: Treatment regimens are regularly evolving, together with novel therapies and drugs. Such evolution is necessary to circumvent resistance mechanisms and to give patients the best possible health care. When dealing with cancer, most regimens involve multiple treatments (surgery, radiation therapy, chemotherapy, immunotherapy, etc.). The purpose of this study was to associate in a single compound metal-based drugs and photosensitizers to combine chemotherapy and photodynamic therapy. Two arene-ruthenium tetrapyrrolyporphyrin compounds (**2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru**) have been synthesized and evaluated on two colorectal cancer cell lines (HCT116 and HT-29). The cytotoxicity and phototoxicity have been evaluated. In addition, the anticancer mechanism and the cell death process mediated by the two compounds were studied. The results showed that the two arene-ruthenium photosensitizer-containing complexes have a strong phototoxic effect after photoactivation. The **2H-TPyP-arene-Ru** induced outstanding cytotoxicity when compared to the **Zn-TPyP-arene-Ru** analogue. Moreover, under light, these two arene-ruthenium photosensitizers induce an apoptotic process in human colorectal cancer cell lines.

Keywords: Colorectal cancer; Photodynamic therapy; Apoptosis; Porphyrin; Metalla-assemblies; Arene ruthenium; Chemotherapy

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is a group of diseases that refer to abnormal cell division leading to uncontrolled cell growth and proliferation, and when occurring in the colon or rectum, the disease is defined as colorectal cancer (CRC) [1]. In 2022, the World Health Organization (WHO) and the International Agency for Research on Cancer (IARC) have estimated that CRC was the third most common cancer worldwide with approximately 1.9 million cases annually and the second leading cause of death for oncological reasons with globally 900 000 deaths [2,3]. CRC mainly originates from a benign tumor or adenomatous polyp that evolves into a dangerous malignant tumor [4]. This transformation is characterized by the capacity of the cells to infiltrate the different histological layers of the organs [5]. The most dangerous stage is the metastatic phase, when the cancer cells have acquired the ability to detach from the initial tumor and invade other organs through the blood or lymph, and create secondary tumors [6]. Today, CRC treatment is at a crossroad, strategies involve many conventional and advanced scientific methods. These therapies incorporate

surgery/polypectomy, radiation therapy, chemotherapy, combination therapy, immunotherapy and targeted therapy [7-9]. Unfortunately, these methods are still insufficient for the complete cure of advanced CRC. Researchers have tried to provide modern alternative approaches to fight CRC resistance mechanisms [10]. Over the past decade, significant progress in CRC treatments has been achieved through the development of novel drugs and elaborate treatment protocols. However, the increasing resistance of tumor cells toward these new drugs and persistent side effects due to their toxicity on healthy tissues make it imperative to add other options to CRC treatment regimens.

Photodynamic therapy (PDT) has attracted widespread attention in recent years as a non-invasive and highly selective approach for cancer treatment [11,12]. The molecular mechanism of PDT involves the photoactivation of a photosensitizer (PS) at an appropriate wavelength in the presence of oxygen molecules [13-15]. In effect, PDT exploits the potency of visible light to generate cytotoxic agents in a spatially and temporally controlled manner to directly damage the targeted tumor cells and tissues [16,17]. PDT is mainly associated to the production of reactive oxygen species (ROS), which are involved in cell death [18,19]. To happen, the PS must absorb at least one photon to be promoted to a sufficiently long-lived excited state, and then to induce photodynamic reactions in an oxygenated environment [20]. Under the effect of light irradiation, the PS is activated and goes from a ground to an excited state [21,22]. At this stage, the PS is very unstable and loses its excess energy either directly or via an excited triplet state intermediate [23]. The excited triplet state will slowly return to the ground state by photochemical reactions of type I or II. Both reactions may take place simultaneously, their kinetics being strongly correlated to the presence of oxygen, the substrate concentration, and the nature of the PS. In type I reactions, the free radicals may further react with oxygen to produce ROS [24,25]. Superoxide anion initially produced via type I pathway by monovalent reduction does not cause oxidative damage but reacts with itself to generate oxygen and hydrogen peroxide. However, in type II reactions, the excited PS transfers its energy directly to molecular oxygen to form singlet oxygen. These highly cytotoxic ROS can oxidize a variety of biomolecules, inducing an acute stress response and triggering a series of redox signaling pathways, generally leading to cell death [26-28]. Currently, the most widely used PS in PDT are tetrapyrrole derivatives such as porphyrins, chlorins, bacteriochlorins, and phthalocyanines. Nevertheless, the main inconveniences of these planar aromatic PS are their low water solubility, which limits intravenous administration, their poor photophysical properties due to PS aggregation, and their low tumor selectivity, thus overall limiting their use in the clinic [29].

Chemotherapy is essential to cancer treatments. Indeed, platinum-based drugs like oxaliplatin and carboplatin, which remain at the forefront of the CRC regimens, are used on an everyday basis [30]. Unfortunately, this type of metal-based drugs has shown significant side effects, which has led to the search for new and less toxic anticancer metal-based agents [31]. Among other metal-based drugs, ruthenium (Ru) derivatives have received much attention due to their interesting properties [32]. And some Ru-based chemotherapeutics have already entered clinical trials [33]. Moreover, about 15 years ago, combining PDT and chemotherapy with Ru-based complexes was introduced [34,35], and today such a Ru complex, TLD1433, is in clinical trial [36]. TLD1433 is a cationic bis(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine) (dmbp) and 2-(2,2':5,2''-terthiophene-5-yl)-1,3,7,8-tetraaza-1H-cyclopenta[1]phenanthrene (ip-3t) Ru(II) complex with the general formula $[Ru(dmbp)_2(ip-3t)]^{2+}$. This complex exploits the rich photophysical properties of polypyridyl Ru-based complexes. Upon photoactivation of the Ru-center, an intra-ligand charge transfer (ILCT) is taking place, which generates 1O_2 . This ruthenium complex combines efficiently photochemotherapy and PDT in a single molecule.

Recently, we have proposed another strategy to associate PS and Ru-based complexes in a single molecule, using a coordination self-assembly process [37]. In these systems, two tetrapyrrolylporphyrin units are linked by four arene-Ru clips (Figure 1). Such octanuclear complexes allow internalization of the PS to cells, and they show moderate dark cytotoxicity on ovarian cancer cell lines ($\approx 8 \mu\text{M}$) [38]. Herein, we are looking at the possibility of using these metalla-assemblies to treat CRC by a combination of PDT and chemotherapy. Therefore, we have verified whether the photoactivity of the PS has been modified or not when it is part of a metalla-assembly by investigating the anticancer effect of the functionalized 2H-TPyP and Zn-TPyP with arene-Ru complexes on human HCT116 and HT-29 colorectal cancer cell lines. Then, for better understanding the cell death process involved, we examined the cell cycle distribution, phosphatidylserines externalization, as well as caspase-3 activation, poly-ADP ribose polymerase (PARP) cleavage and DNA fragmentation. Subsequently, consistent with other PDT studies, our results demonstrated that once photoactivated, **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** assemblies generate cellular ROS production and achieve their anticancer effects through an apoptotic process.

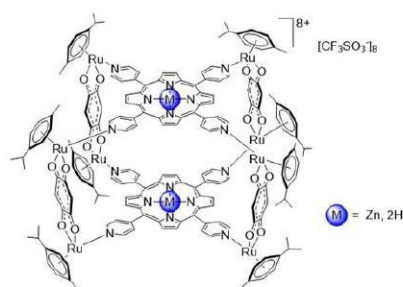


Figure 1: Molecular structures of the metalla-assemblies. **2H-TPyP-arene-Ru** ($M = 2H$) or **Zn-TPyP-arene-Ru** ($M = Zn$).

2. Results

2.1. Cytotoxicity and phototoxicity

To investigate the *in vitro* phototoxicity of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru**, we treated or not two human CRC cell lines: HCT116 and HT-29. Then, the cells were exposed or not to PDT with red irradiation (630–660 nm) and phototoxic effects were determined 24 and 48 h post-irradiation using the MTT assay. Results showed that TPyP-arene-Ru complexes had no toxic effect on HCT116 and HT-29 cell lines in the dark below $1 \mu\text{M}$, and that cell growth was unaffected by light alone (Fluence $75 \text{ J}/\text{cm}^2$). However, upon photoactivation, both **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** complexes lead to a drastic decrease in cell viability in a dose-dependent manner (Figures 2 and 3). It is worth mentioning that **2H-TPyP-arene-Ru** complex was more effective than the **Zn-TPyP-arene-Ru** analogue on both cell lines.

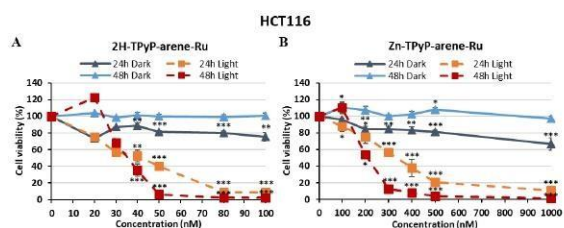


Figure 2. Photocytotoxic effect of 2H-TPyP-arene-Ru (A) and Zn-TPyP-arene-Ru (B) on HCT116 cells. Cells were seeded in 96-well plates and cultured for 36h before being treated or not with 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). MTT assays were performed at 24 and 48 h after irradiation, and cell cytotoxicity was expressed as a percentage of each treatment condition compared with untreated cells. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3). * p < 0.05; ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

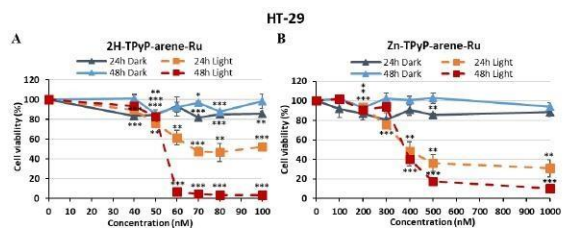


Figure 3. Photocytotoxic effect of 2H-TPyP-arene-Ru (A) and Zn-TPyP-arene-Ru (B) on HT-29 cells. Cells were seeded in 96-well plates and cultured for 36h before being treated or not with 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru. After 24 h incubation, the cells were washed and irradiated or not with a CURElight lamp from 630-660 nm at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). MTT assays were performed at 24 and 48 h after irradiation, and cell cytotoxicity was expressed as a percentage of each treatment condition compared with untreated cells. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3). * p < 0.05; ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

The IC₅₀ values were determined to compare the impact of adding a diamagnetic metal (Zn²⁺) to the center of the tetrapyrrole ring in 2H-TPyP panels after activation with PDT. We observed that 2H-TPyP-arene-Ru was much more effective than Zn-TPyP-arene-Ru in the HCT116 cell line with 8-fold more photo-cytotoxicity 24 h post-irradiation (Figure 2). IC₅₀ values were in the range of 41.9 nM for 2H-TPyP-arene-Ru and 331.2 nM for Zn-TPyP-arene-Ru. Our compounds revealed more cytotoxicity at 48 h where IC₅₀ values decreased to 35.2 nM for 2H-TPyP-arene-Ru and 207.4 nM for Zn-TPyP-arene-Ru.

respectively (Table 1). Similar results were observed for the HT-29 cell line that showed more resistant than HCT116, as their respective IC₅₀ values were 67.8 nM for **2H-TPyP-arene-Ru** and 393.9 nM for **Zn-TPyP-arene-Ru** at 24 h (Figure 3). These values decreased to be respectively 54.1 nM for **2H-TPyP-arene-Ru** and 379.3 nM for **Zn-TPyP-arene-Ru** after 48 h (Table 1). The concentrations used for the following experiments correspond to the IC₃₀ values obtained under light.

Table 1. IC₅₀ values (nM) determined with MTT assays on HCT116 and HT-29 cells. PI = phototoxic index.

	PS	IC ₅₀ (nM)			PI (IC ₅₀ Dark/IC ₅₀ Light)	
		Light 24h	Light 48h	Dark	24h	48h
		HCT116	2H-TPyP-arene-Ru	41.9	35.2	> 100
	Zn-TPyP-arene-Ru	331	207	> 1000	> 3.02	> 4.83
HT-29	2H-TPyP-arene-Ru	67.8	54.1	> 100	> 1.47	> 1.84
	Zn-TPyP-arene-Ru	394	379	> 1000	> 2.53	> 2.63

2.2. ROS generation

As PDT-induced cell death by cellular ROS production, quantification of ROS was determined in the two cell lines 1h post-irradiation. Cells were labeled with dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), and hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as positive control. The results showed that when HCT116 cells were treated with both compounds and then photoactivated (630-660 nm, 75 J/cm²), the ROS production for **2H-TPyP-arene-Ru** was 79.4%, while for **Zn-TPyP-arene-Ru** ROS production was 75.5%. In the dark, both compounds show limited ROS production, being 15.5% and 14.2%, respectively. A similar result was observed in HT-29 cells, where photoactivation of **2H-TPyP-arene-Ru** resulted in 82.8% ROS production vs. 14.9% in the dark, while for **Zn-TPyP-arene-Ru** the ROS production was 79.9% vs. 11.2% in the dark (Figure 4).

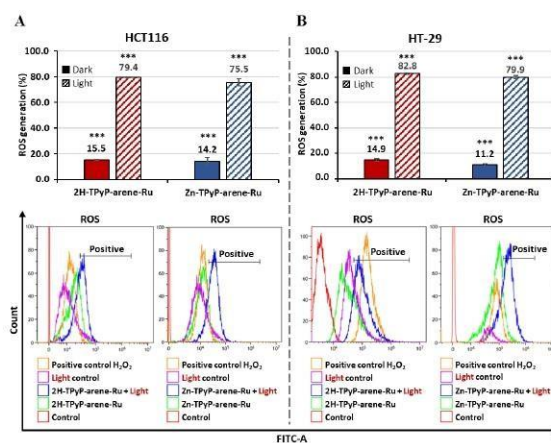


Figure 4. ROS generation by TPyP-arene-Ru on HCT116 (A) and HT-29 (B) cell lines. Cells were treated or not with 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru at IC₅₀ concentrations. The cells were labeled with DCFDA and irradiated or not. ROS production was then quantified by flow cytometry and interpreted using the % positive fluorescence values given in the tables. *** $p < 0.001$.

2.3. Cellular internalization

The significant phototoxic effects of the complexes may be due to an enhanced cellular internalization of the cationic porphyrin arene-Ru assemblies. In order to confirm the cellular uptake of our compounds, a study regarding the internalization of 2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru was performed using flow cytometry coupled with AMNIS[®] image analysis and further confirmed by confocal microscopy.

Flow cytometry image analyses show high cellular internalization of 2H-TPyP-arene-Ru with 89% and 81% in HCT116 and HT-29 cells respectively. Similar results were observed for the Zn-TPyP-arene-Ru analogue, 82% in HCT116 and 85% in HT-29 cells, suggesting that the presence of Zn²⁺ in the porphyrin core does not alter the internalization process. This internalization was reflected by the red fluorescence of both compounds in cells (Figure 5). Cellular internalization was also confirmed by confocal microscopy as the fluorescence of 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru (red) was clearly observed in the cytoplasm of the cells, with however no accumulation in the nucleus (Figure 6).

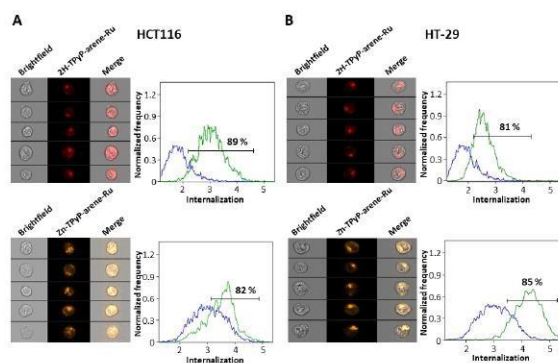


Figure 5. Cellular internalization of TPpP-arene-Ru in HCT116 (A) and HT-29 (B) cells. Cells were treated with 2H-TPpP-arene-Ru and Zn-TPpP-arene-Ru at IC_{50} concentrations. After 24 h incubation, the fluorescence of 2H-TPpP-arene-Ru (excitation: 405 nm; emission: 650 nm) and Zn-TPpP-arene-Ru (excitation: 561 nm; emission: 655 nm) were analyzed by flow cytometry coupled to AMNIS[®] image analysis.

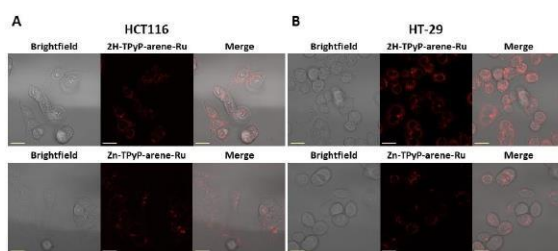


Figure 6. Cellular internalization of TPpP-arene-Ru by confocal microscopy on HCT116 (A) and HT-29 (B) cells. Cells were seeded at the appropriate density and cultured for 36h in an incubation chamber with a coating of type I collagen and acetic acid. Cells were then treated with 2H-TPpP-arene-Ru (excitation: 405 nm; emission: 650 nm) and Zn-TPpP-arene-Ru (excitation: 561 nm; emission: 655 nm) at IC_{50} concentrations. Fluorescence of both compounds was determined by confocal microscopy and cell internalization was determined using the Image J image-processing software. Images show the different treatment conditions. Yellow scale bar = 20 μ m.

2.4. Cell cycle activity

PDT can induce irreversible photodamage leading to cell death, and to define the cell death process triggered by our compounds, the impact on cell cycle activity was determined. Accordingly, HCT116 and HT-29 cells were treated or not at the phototoxic IC₅₀ concentrations and then subjected to flow cytometry analysis using PI staining after PDT. Results showed that on HCT116 cells, **2H-TPyP-arene-Ru** induced a strong increase in the number of apoptotic cells represented by the sub-G1 peak mainly at 48 h with 33.83% vs 0.65% for control. In contrast, **Zn-TPyP-arene-Ru** was shown to have less effect on sub-G1 cells with 5.29% vs 0.65% for control at 48 h (Figure 7). Similar results were observed on HT-29 cells, where **2H-TPyP-arene-Ru** produced an increase in the number of apoptotic cells as signaled by a sub-G1 peak of 9.04% vs 1.22% for the control at 24 h. Likewise, we observed a drastic increase at 48 h with a 26.98% sub-G1 peak vs 2.19% for the control (Figure 8). On both cell lines, the complexes have no influence on the cell cycle without photo-activation, the concentrations being far below the IC₅₀ in the dark (Table 1). Nevertheless, it is important to emphasize that at 48 h post-irradiation, **2H-TPyP-arene-Ru-PDT** induced an accumulation of S-phase cells with a decrease in the number of G1 phase in both cell lines.

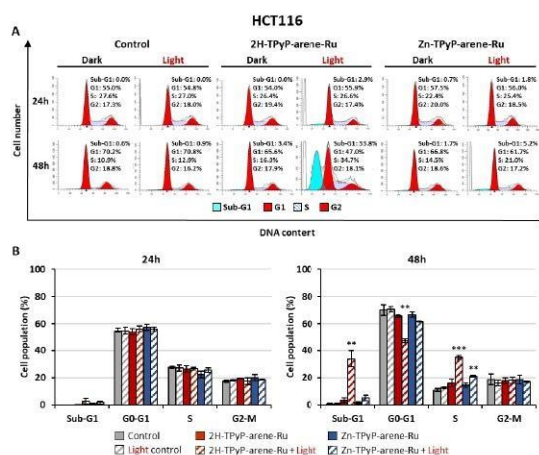


Figure 7. Effects of photoactivation of TPyP-arene-Ru on the cell cycle distribution in HCT116 cells. Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to **2H-TPyP-arene-Ru** or **Zn-TPyP-arene-Ru** complexes at IC₅₀ concentrations. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). Then subjected to flow cytometry analysis using PI staining after PDT. Images of cell cycle analysis (A) were representative of three separate experiments. Results of flow cytometry analysis are represented by histograms (B) that display the percentage of cells in each cell cycle phase. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

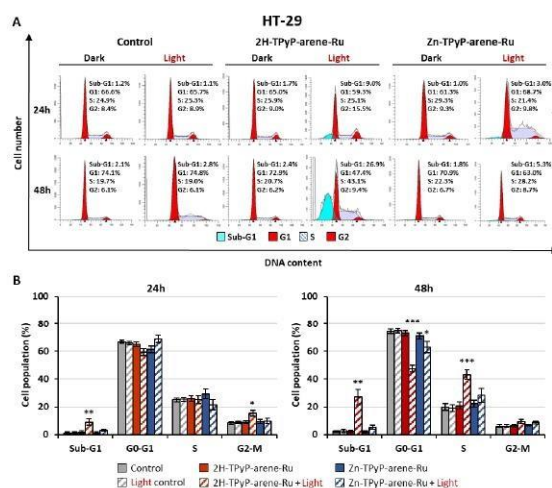


Figure 8. Effects of photoactivation of TPyP-arene-Ru on the cell cycle distribution in HT-29 cells. Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru complexes at IC₅₀ concentrations. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). Then subjected to flow cytometry analysis using PI staining after PDT. Images of cell cycle analysis (A) were representative of three separate experiments. Results of flow cytometry analysis are represented by histograms (B) that display the percentage of cells in each cell cycle phase. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). * p < 0.05; ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

2.5. Mechanisms of apoptosis

2.5.1 Annexin V-FITC/PI dual staining

Cell cycle analysis of HCT116 and HT-29 cells treated with either 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru revealed the appearance of a sub-G1 population referring to cells in apoptosis. Therefore, we have studied the mechanism of apoptosis induced by both complexes on HCT116 and HT-29 cells 24 and 48 h post-PDT. The apoptotic process was first investigated using annexin V-FITC/PI dual staining assay. During the early stages of apoptosis, phosphatidylserines are known for their translocation from the inner to the outer plasma membrane of cells, thus, phosphatidylserines externalization allows binding to annexin V. Therefore, the percentages of apoptotic cells at early and later stages were determined by dual staining with annexin V-FITC and PI by flow cytometry. Results showed that in HCT116 cells, control, light control, 2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru treated cells were mostly viable, whereas the cumulative rate of early and late apoptosis was 11.31%, 11.29%, 9.79%, and 10.23% respectively at 24 h. This rate has

247

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

increased dramatically with the conjugation of irradiation to be 49.25% for **2H-TPyP-arene-Ru-PDT** more effective than **Zn-TPyP-arene-Ru-PDT** with 21.58% (Figure 9A). Same as for 48 h after PDT, **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** caused 61.46% and 42.41% of apoptosis respectively, compared to 12.96% for control, 15.24% for light control, 16.22% for **2H-TPyP-arene-Ru** and 22.14% for **Zn-TPyP-arene-Ru** complexes without photoactivation (Figure 9B). Similar results were obtained on HT-29 cells after photoactivation of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** respectively, with 35.45% and 22.81% vs. controls (control: 6.70%, light control: 8.02%, **2H-TPyP-arene-Ru** dark: 8.38% and **Zn-TPyP-arene-Ru** dark: 7.29%) at 24 h (Figure 9C) and with 58.31% and 36.87% vs. controls (control: 13.44%, light control: 12.92%, **2H-TPyP-arene-Ru** dark: 10.67% and **Zn-TPyP-arene-Ru** dark: 13.07%) at 48 h (Figure 9D).

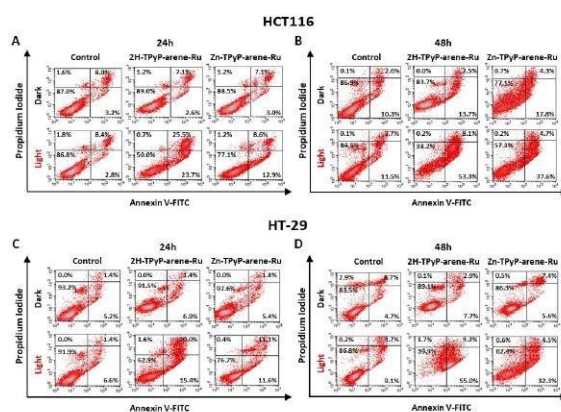


Figure 9. Apoptosis effects of photoactivation of TPyP-arene-Ru on HCT116 (A-B) and HT-29 (C-D) cell lines. Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to **2H-TPyP-arene-Ru** or **Zn-TPyP-arene-Ru** complexes at IC_{50} concentrations. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm^2 (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). HCT116 and HT-29 cells were also stained, 24 h post-PDT (A-C) and 48 h post-PDT (B-D) with Annexin V-FITC and PI, and apoptosis was analyzed by flow cytometry. The upper right quadrant represents the percentage of late apoptosis, and the lower right quadrant represents early apoptosis. Images shown were representative of three separate experiments.

2.5.2. Quantitative analysis of activated caspases-3/-7

The apoptotic process was further analyzed at a later stage of apoptosis. For this purpose, quantitative analysis of activated caspases-3/-7 was carried out using the IncuCyte® 53 live-cell analysis system for 48 h. For the HCT116 cell line (Figure 10), the results showed that photoactivation of TPyP-arene-Ru led to a significant increase in the number of activated caspases-3/-7 as early as 6h after treatment. In fact, both compounds generated a significant increase in this activity over time when compared to the light-control at 48 h post-irradiation (70-95% for **2H-TPyP-arene-Ru** light and **Zn-TPyP-arene-**

Ru light vs. 5-15% for the light control). Similar results were observed on HT-29 cells (Figure 11).

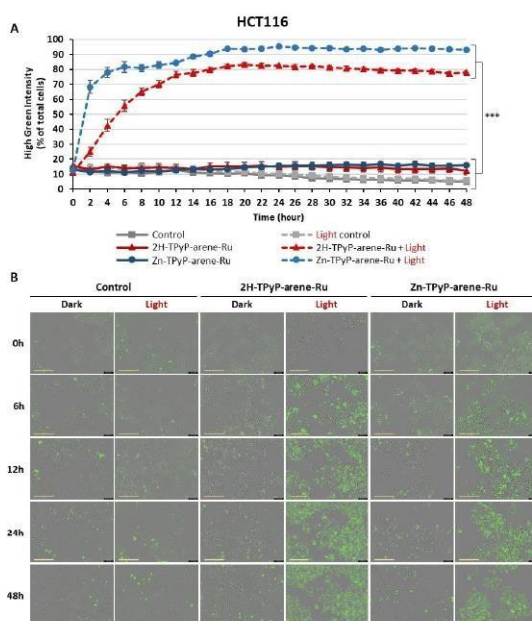


Figure 10. Quantitative analysis of activated caspases-3/-7 in HCT116 cells over 48 h. HCT116 cells were seeded and cultured for 36h and then treated with **2H-TPyP-arene-Ru** or **Zn-TPyP-arene-Ru** at IC_{50} concentrations. Cells were then irradiated, co-treated with caspases-3/-7 green reagent and placed in the IncuCyte® S3 live cell analysis system. Every 2h, cells were imaged at a rate of 4 images per well in phase contrast and green fluorescence using the x20 objective. **A:** The number of cells undergoing apoptosis was quantified using IncuCyte® software using the ratio of the percentage of green fluorescent cells normalized by the percentage of total cells in each well over 48 h. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3). *** p < 0.001. **B:** Representative images are shown for each condition at 0, 6, 12, 24 and 48 h. Yellow scale bar = 200 μ m.

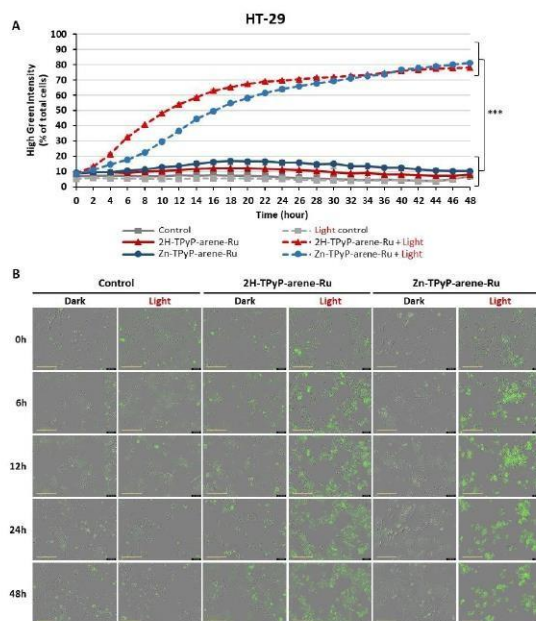


Figure 11. Quantitative analysis of activated caspases-3/-7 in HT-29 cells over 48 h. HT-29 cells were seeded and cultured for 36h and then treated with **2H-TPyP-arene-Ru** or **Zn-TPyP-arene-Ru** at IC₅₀ concentrations. Cells were then irradiated, co-treated with caspases-3/-7 green reagent and placed in the IncuCyte® S3 live cell analysis system. Every 2h, cells were imaged at a rate of 4 images per well in phase contrast and green fluorescence using the x20 objective. **A:** The number of cells undergoing apoptosis was quantified using IncuCyte® software using the ratio of the percentage of green fluorescent cells normalized by the percentage of total cells in each well over 48 h. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). ***p < 0.001. **B:** Representative images are shown for each condition at 0, 6, 12, 24 and 48 h. Yellow scale bar = 200 µm.

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

2.5.3. Protein expression of apoptotic markers

Activation of effector caspases results in the cleavage of several cellular substrates. One of the substrates of caspase-3 is PARP, an enzyme involved in DNA repair. For this reason, protein expression of this apoptotic marker was analyzed by Western blotting (WB). In the HCT116 and HT-29 cell lines, the results showed that in the dark, 2H-TPyP-arene-Ru, Zn-TPyP-arene-Ru and the control have no effect on the expression of native caspase-3 after 24 and 48 h. In contrast, we mainly noticed that photoactivation of 2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru resulted in cleavage of native caspase-3 (35 kDa), and consequently its activation, which was observed by the appearance of the cleaved caspase-3 fragment (19 kDa). To confirm the role of 2H-TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru-PDT on apoptosis, other investigations on later stages of the process had to be evaluated, such as the state of PARP. Cleavage of PARP is considered as a hallmark of cells undergoing apoptosis. We compared the expression of native and cleaved PARP forms in treated and untreated cells using WB. After PDT, results showed that 2H-TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru induced PARP cleavage as shown by the highly apparent 89 kDa cleavage fragment for HCT116 (Figure 12A) and HT-29 (Figure 12B) cell lines, associated with a decreased expression of the native PARP in treated cells compared to control at 24 and 48 h.

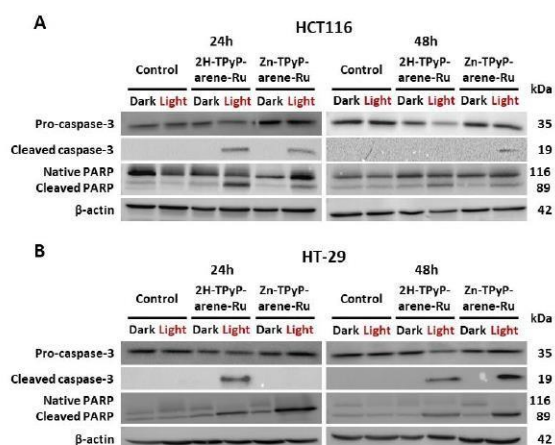


Figure 12. Effects of photoactivation of TPyP-arene-Ru on protein expression of apoptotic markers in HCT116 (A) and HT-29 (B) cells. Cells were seeded at the determined density and cultured for 36h, then treated or not with 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru at IC₅₀ concentrations. After 24 h incubation, the culture medium was replaced and cells were irradiated or not. At 24 and 48 h post-irradiation, the cells were then recovered and protein expression determined by WB. β-actin was used as the reference protein.

2.5.4. DNA fragmentation

In order to study the nuclear changes in apoptosis caused by **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru**, DNA fragmentation was evaluated by ELISA assay in both cell lines after 24 and 48 h. The outcomes indicate that in HCT116 cells (Figure 13A-B), **2H-TPyP-arene-Ru-PDT** leads to a significant increase in DNA fragmentation by 3.7-fold at 24 h and 5.6-fold at 48 h compared to non-irradiated conditions 1.3-fold and 0.8-fold respectively compared to control. Similarly, **Zn-TPyP-arene-Ru** coupled with PDT increased DNA fragmentation by 2.4-fold and 1.2-fold at 24 and 48 h respectively compared to non-irradiated conditions 1.4-fold and 0.7-fold compared to control.

HT-29 cells showed similar results (Figure 13C-D), **2H-TPyP-arene-Ru** coupled with PDT induce a significant increase in DNA fragmentation by 3.3-fold at 24 h and 5.4-fold at 48 h, whereas the non-irradiated condition showed no significant effect with 0.7-fold and 1.0-fold respectively compared to control. Likewise, **Zn-TPyP-arene-Ru** with PDT increased DNA fragmentation mainly at 48 h by 1.9-fold compared to non-irradiated condition 1.0-fold compared to control.

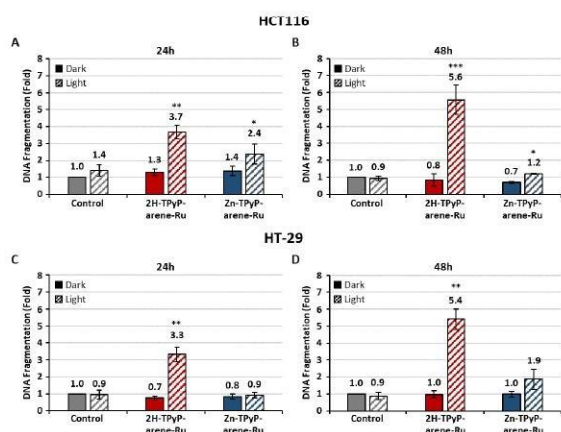


Figure 13. Effects of photoactivation of TPyP-arene-Ru on DNA fragmentation HCT116 (A-B) and HT-29 (C-D) cells. Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to 2H-TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes at IC₅₀ concentrations. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). DNA fragmentation in both cell lines 24 h post-PDT (A-C) and 48 h post-PDT (B-D) was quantified from cytosol extracts by ELISA. Results are reported as n-fold compared to control. Data are shown as mean ± SEM (n=3). * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

354

353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380

3. Discussion

PDT is an innovative cancer therapy that offers advantages over conventional treatments. Despite its potential advantages, only a small number of PS have been approved in the clinic, mainly porphyrin-type compounds [39]. This type of PS is often limited due to low solubility in biological media, but when incorporated into delivery vectors, they can be internalized into cells. Based on this assumption, the conjugation of porphyrin with metals has received much attention [40]. Recent scientific studies showed that ruthenium complexes are one of the most interesting metal-based drugs used in the treatment of several cancers such as colon cancer [32,33]. The interesting properties of Ru complexes have led to their potential use in various fields such as PS and photoactive DNA cleavage agents for therapeutic purposes [41]. Several studies reported that porphyrin-Ru complexes had significant anticancer effects. Bogoeva *et al.* reported Ru porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells [42]. In addition, Schmitt *et al.* demonstrated that 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin (TPP) arene Ru (II) derivatives exhibited excellent phototoxicities toward melanoma cells when exposed to light at 652 nm [34]. Cellular uptake and localization microscopy studies of $[\text{Ru}(\text{TPP})\text{C}_6\text{H}_5]^{2+}$ revealed that they accumulated in the cytoplasm of melanoma cells. Another study provided by Rani-Beeram *et al.* established that fluorinated Ru porphyrin presented a strong DNA interaction that leads to its cleavage in melanoma cells [35]. More recently, we reported that cubic or prismatic cages can serve as an ideal carrier for PS to treat rheumatoid arthritis [37,43].

In the current study, we have determined the biological activity of cationic TPyP-arene-Ru metalla-assemblies (Figure 1) on CRC cells. We wanted to evaluate the potential of such octanuclear assemblies as anticancer agents on CRC. For this purpose, we determined the effect of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** complexes associated with PDT on two human CRC cell lines (HCT116 and HT-29). First of all, we evaluated the cytotoxicity and photocytotoxicity of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru**, and we demonstrated that both structures have a significant photo-cytotoxic effect on the two CRC cell lines studied, IC_{50} values being in the nanomolar range. However, in the dark, the concentrations required to observe a cytotoxic effect on those cell lines are much higher (Table 1), suggesting that PDT is the dominant therapy over chemotherapy. This result was not necessarily surprising considering that the structure of the assemblies contains two units of tetrapyrrolylporphyrin as PS, which has the effect of strengthening the effectiveness of the PDT treatment and consequently providing a better therapeutic effect under light. The IC_{50} values of **2H-TPyP-arene-Ru** coupled with PDT on both cell lines are 5 to 8-times higher when compared to the Zn-tetrapyrrolylporphyrin analog. This can be linked to the stronger fluorescence of PS with a metallic center. Fluorescence is a consequence of the energetic decay from the excited state of the PS to the minimum energy state. Therefore, high fluorescence quantum yield ϕ_{F} suggests that most of the energy in the singlet excited state of the PS returns to the ground state without passing through the triplet excited state. Consequently, generating more fluorescence, but leaving behind less energy in the triplet state to interact with O_2 and to produce ROS. However, in all cases, we systematically obtained under PDT a significant cytotoxic effect for which the IC_{50} values are in the nanomolar range.

Inhibition of cancer cell proliferation by cytotoxic drugs could be the result of induction of apoptosis or cell cycle arrest or a combination of both processes. Therefore, we investigated the cell growth mechanism inhibition by flow cytometry analysis. We demonstrated that **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** coupled with PDT led to a significant increase in the proportion of apoptotic cells, as reflected by the sub-G1 peaks. Whereas, only **2H-TPyP-arene-Ru** at 48 h post-irradiation showed accumulation of S-phase cells, while **Zn-TPyP-arene-Ru**-PDT showed no significant effect on cell cycle distribution. In order to evaluate the induction of apoptosis mechanism leading to cell death,

381

382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424

Mis en forme : Surlignage

425
426
427
428
429
430
431
432

we investigated by flow cytometry the percentage of phosphatidylserines externalization of apoptotic cells by annexin-V-FITC/PI dual staining assay. We established that photoactivation of 2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru increased dramatically the cumulative rate of early and late apoptosis, which can confirm cell death via apoptosis. These results are in agreement with a study held by Silva *et al.* reporting the apoptotic cell death in human colon carcinoma HCT116 cells treated with Ru(II)-thymine complexes [44]. Furthermore, to validate the apoptotic mechanism, we evaluated the last stages in the death mechanism up to DNA fragmentation, we demonstrated that 2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru coupled with PDT induced caspase-3 activation, significant PARP cleavage and DNA fragmentation. This result can be related to the strong potential of Ru complexes' photophysical and photochemical properties that allow them to bind to DNA and induces its cleavage by photoactivation [45]. These results agree with Lu *et al.* study, which reports the anticancer effect of Ru complexes on hepatocellular carcinoma [46].

4. Materials and Methods

4.1. Materials

DMEM medium, DMEM red-phenol-free medium, RPMI 1640 medium, RPMI 1640 red-phenol-free medium, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, and penicillin-streptomycin were purchased from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay PLUS (ELISA) and human anti- β -actin antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) antibody and goat anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) were acquired from Cell Signaling Technology-Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Rabbit anti-mouse IgG-IgM H&L HRP secondary antibody, Annexin V-FITC, and propidium iodide (PI) were obtained from Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Villebon-Sur-Yvette, France). Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate was acquired from Merck (Lyon, France).

2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru complexes were prepared as previously described [37,47]. Stock solutions of TPyP-arene-Ru complexes were dissolved at 1 mM concentration in DMSO, then were diluted in culture medium to obtain the appropriate final concentrations just before use. The concentration of DMSO in culture medium was lower than 0.1% in all cases, which is considered to be non-toxic.

4.2. Cell culture and treatment

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

4.3. Cytotoxicity and phototoxicity

Cytotoxicity and phototoxicity was determined using an MTT assay. Briefly, cells were seeded in 96-well culture plates and grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24 h incubation, cells were washed and irradiated or not with a 630-660 nm CURElight

Mis en forme : Surlignage

lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). The emission spectrum of this light source is shown in Figure S1 (Supporting Information). MTT assays were performed 24 and 48 h post-irradiation and cell cytotoxicity was expressed as a percentage of each treatment condition by normalizing to untreated cells.

4.4. Intracellular ROS production

Cellular ROS production was quantified using the 2,7'-dichlorofluorescein diacetate cellular reactive oxygen species detection assay kit. Cells were seeded in 25 cm² culture flasks at the determined density and cultured for 36h. Cells were then treated or not with 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru at the determined IC₅₀ values. After 24 h incubation, cells were labeled with DCFDA for 30 min at 37°C. The cells were then washed, the medium replaced by the corresponding medium without phenol red, and irradiated or not. Cellular ROS generation was then quantified 1h after irradiation by flow cytometry analysis. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as a positive control at 800 μM.

4.5. Cellular internalization

4.5.1. Flow cytometry with AMNIS imaging

Cells were seeded in 25 cm² culture flasks at the determined density and cultured for 36h. Cells were then treated with 2H-TPyP-arene-Ru or Zn-TPyP-arene-Ru at the determined IC₅₀ values. After 1-4h incubation, the natural fluorescence of 2H-TPyP-arene-Ru (excitation: 405 nm; emission: 650 nm) or Zn-TPyP-arene-Ru (excitation: 561 nm; emission: 655 nm) was analyzed by flow cytometry coupled with AMNIS* image analysis, and the data were analyzed with IDEAS* software (Merck).

4.5.2. Confocal microscopy

Cells were seeded for 36h in an incubation chamber (ibidi) coated with a gel containing acetic acid (20 mM) and type I collagen (3 mg/mL). Cells were then treated at the determined IC₅₀ values. Photographs were taken using a Carl Zeiss LSM 510 confocal laser microscope. Meta - x1000 (Marly-le-Roi, France). Co-localization was analyzed using the ImageJ software.

4.6. Cell cycle analysis

The cell cycle distributions in colorectal HT-29 and HCT116 cell lines were analyzed by flow cytometry using propidium iodide (PI) staining. For each cell line, cells were treated or not with the determined IC₅₀ values of 2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru for 24 and 48 h, then harvested with trypsin. For flow cytometry analysis, 1.5×10⁶ cells of each condition were collected, washed with PBS, and fixed by adding 1 mL of chilled 70% ethanol in PBS and stored at -20°C. Following fixation, cells were pelleted, washed in cold PBS, resuspended in 500 μL of cold PBS containing 30 μL of RNase A (10 mg/mL), and incubated for 30 min at room temperature. After staining with 25 μL of PI, the percentage of cells in each stage of the cell cycle was determined using the FACS system (BD Biosciences, San Jose, CA). All the experiments were performed on three samples.

4.7. Mechanisms of apoptosis

4.7.1. Annexin V-FITC/PI dual staining assay

The annexin V-FITC/PI dual staining assay was used to determine the percentage of apoptotic cells. For each cell line, cells were treated or not with the determined IC₅₀ values of 2H-TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru for 24 and 48 h and then harvested with

trypsin. 2.5×10^5 cells of each condition were collected, washed in PBS, centrifuged, and resuspended in 300 μ L binding buffer (1X) containing 5 μ L of annexin V-FITC and 1 μ L of PI (0.1 mg/mL) at room temperature in the dark. After 15 min incubation, cells were analyzed for the percentage undergoing apoptosis using the FACS system (BD Biosciences).

4.7.2. Quantitative analysis of activated caspases-3/-7

Cells were seeded in 96-well plates at the determined density and cultured for 36h. Cells were then treated or not with **2H-TPyP-arene-Ru** or **Zn-TPyP-arene-Ru** at the determined IC_{50} values. After 24 h incubation, the culture medium was replaced by the corresponding phenol red-free medium, and the cells were then irradiated or not. Cells were then treated with caspases-3/-7 green reagent (5 μ M) and placed in the IncuCyte® S3 live cell analysis system (Sartorius). Every 2h, cells were imaged at a rate of 4 images per well in phase contrast and green fluorescence using $\times 20$ magnification. The number of cells in apoptosis was quantified with IncuCyte® software (Sartorius) using the ratio of the number of fluorescent cells.

4.7.3. Protein extraction and western blot analysis

For each cell line, cells were treated or not with the determined IC_{50} values of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** for 24 and 48 h and then harvested with trypsin. For total protein extraction, collected samples of each condition were washed in PBS. Then, the total cell pool was centrifuged at 200 g for 5 min at 4°C and homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 20 mg/mL of aprotinin) containing protease inhibitors according to the manufacturer's instructions as previously described [16]. The protein level was determined using the Bradford method. Proteins (60 μ g) were separated on 12.5% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France). Membranes were probed with respective human antibodies against caspase-3, cleaved caspase-3, PARP and β -actin used as a loading control, according to the manufacturer's instructions. After incubation with appropriate secondary antibodies, blots were developed using the "Immobilon Western" substrate following the manufacturer's protocol and G: BOX system (Syngene, Ozyme).

4.7.4. DNA fragmentation

For each cell line, cells were treated or not at the determined IC_{50} concentrations of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** for 24 and 48 h and then harvested with trypsin. Histone release from the nucleus during apoptosis was analyzed using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} as previously described [49,58]. 2×10^5 cells of each condition were obtained and DNA fragmentation was measured according to the manufacturer's protocol.

4.8. Statistical Analysis

All quantitative results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of separate experiments. Statistical significance was evaluated by the two-tailed unpaired Student's t-test and expressed as: *p < 0.05; **p < 0.01 and ***p < 0.001.

5. Conclusions

In this study, we have evaluated the anticancer efficacy of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** metalla-assemblies on two human CRC cell lines, HCT116 and HT-29. We have demonstrated a strong *in vitro* anticancer efficacy of **2H-TPyP-arene-Ru** and **Zn-TPyP-arene-Ru** complexes under a PDT regimen. Moreover, our results showed a stronger phototoxicity effect for the metal-free porphyrin derivative, and they confirmed

Mis en forme : Surlignage

that cell death occurred via an apoptotic pathway. On the other hand, the chemotherapeutic window appeared to be at a much higher concentration, suggesting that the role of the Ru atoms in the biological activity of the metalla-assemblies might be superficial. However, without the presence of the arene-Ru units, the internalization of the PS into cells would have been negligible, TPYP being insoluble in biological media. Therefore, the presence of Ru is essential, and the combination of Ru and PS within metal-based assemblies remains an attractive strategy to add to the regimen of CRC treatments.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Emission spectrum of the used light source (a 630-660 nm CURE-light lamp (PhotoCure ASA, Oslo, Norway)).

Author Contributions: Conceptualization, J.M. B.T., and B.L.; Methodology, J.M., A.P., M.G.-V., L.P., C.O. and C.C.; Validation, S.A., M.D.-A. and B.L.; Writing—original draft preparation, J.M., and A.P.; Writing—review and editing, B.T., and B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de France, Région Nouvelle-Aquitaine and Ligue contre le Cancer (Comité départemental 87—Haute-Vienne).

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to BISEM unit (Univ. Limoges, CNRS, Inserm, CHU Limoges, UAR 2015, US 42) for technical support regarding cytometry and microscopy experiments.

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

Abbreviation list: ATCC: American Type Culture Collection / CRC: Colorectal cancer / DMEM: Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium / DMSO: Dimethyl sulfoxide / DNA: deoxyribonucleic acid / FBS: Fetal Bovine Serum / Φ : Fluorescence Quantum Yield / HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid / H₂O₂: Hydrogen peroxide / HRP: Horseradish Peroxidase / IARC: International Agency for Research on Cancer / IC₅₀: median inhibiting concentration / kDa: Kilodalton / MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide / 1 O₂: Singlet oxygen / PARP: Poly-ADP-ribose polymerase / PBS: Phosphate-buffered saline / PDT: Photodynamic therapy / PI: Propidium Iodide / PS: Photosensitizer / PVDF membrane: Polyvinylidene fluoride membrane / RIPA: Radio immuno precipitation Assay / ROS: Reactive oxygen species / RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium / SDS-PAGE: Electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate / SEM: Standard Error of the Mean / TPYP: Tetrapyrindylporphin.

References

1. Labianca, R.; Beretta, G.D.; Kildani, B.; Milesi, L.; Merlin, F.; Mosconi, S.; Pessi, M.A.; Prochilo, T.; Quadri, A.; Gatta, G.; de Braud, F.; Wils, J. Colon cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2010**, *74*, 106–133. doi: 10.1016/j.cntrevonc.2010.01.010
2. Colonna, M. « Chapter 1 - Épidémiologie », in *Cancérologie Colorectale*, Faucheron J.-L., Ed., Paris: Elsevier Masson **2020**, p. 1–10. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00001-5.
3. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
4. Hobeika, C.; Lefevre, J. « Chapter 4 - Bilan du cancer colorectal », in *Cancérologie Colorectale*, Faucheron J.-L., Ed., Paris: Elsevier Masson **2020**, p. 31–50. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00004-0.
5. Nagaraju, G.P.; Shukla, D.; Vishvakarma, N.K. Ed., *Colon Cancer Diagnosis and Therapy: Volume 1*. Springer Cham **2021**. doi: 10.1007/978-3-030-63369-1.
6. Li-Chang, H.H.; Kirsch, R.; Conner, J.; Sari, A.; Pollett, A.; El-Zimaity, H.; Jain, D.; Celli, R.; Reid, S.L.; Riddell, R.H. *Atlas of Intestinal Pathology: Volume 1: Neoplastic Diseases of the Intestines*. Springer Cham **2019**. doi: 10.1007/978-3-030-12379-6.
7. Ishida H.; Koda K. Recent advances in the treatment of colorectal cancer. Springer Singapore **2019**. doi.org/10.1007/978-981-13-3050-6.
8. Baatrup, G. *Multidisciplinary Treatment of Colorectal Cancer: Staging – Treatment – Pathology – Palliation*. Springer Cham **2021**. doi: 10.1007/978-3-030-58846-5.
9. Messersmith, W.A.; Ahnen, D.J. Targeting EGFR in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1834–1836. doi: 10.1056/NEJMe0806778.

10. Kozovska, Z.; Gabrisova, V.; Kucerova, L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomed. Pharmacother.* **2014**, *68*, 911-916. doi: 10.1016/j.biopha.2014.10.019.
11. Kawczyk-Krupka, A.; Bugaj, A.M.; Latos, W.; Zaremba, K.; Wawrzyniec, K.; Sieroń, A. Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: the state of the art in clinical trials. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 545-553. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.04.004.
12. Gu, B.; Wang, B.; Li, X.; Feng, Z.; Ma, C.; Gao, L.; Yu, Y.; Zhang, J.; Zheng, P.; Wang, Y.; Li, H.; Zhang, T.; Chen, H. Photodynamic therapy improves the clinical efficacy of advanced colorectal cancer and recruits immune cells into the tumor immune micro-environment. *Front Immunol.* **2022**, *13*, 1050421. doi: 10.3389/fimmu.2022.1050421.
13. Shanikazemi, H.; Amini, S.M.; Ortağand, R.K.; Narouie, B. A Review of Photodynamic Therapy in Different Types of Tumors. *Trans. Res. Urol.* **2022**, *4*, 61-70. doi: 10.22034/tru.2022.337411.1108.
14. Agostinus, 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.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B.C.; Golab, J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250-281. doi: 10.3322/caac.20114.
15. Chulakamathü, U.; Giribabu, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 775-802. doi: 10.1002/tcr.201600121.
16. Brehin, L.; Piron, A.; Bouramane, S.; Ouk, C.; Richard, L.; Perrin, M.L.; Chaunavel, A.; Carnion, C.; Bregier, F.; Sol, V.; Chaleix, V.; Leger, D.Y.; Liagre, B. Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1474. doi: 10.3390/cancers11101474.
17. Hodgkinson, N.; Kruger, C.A.; Abrahamse, H. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 1010428317734691. doi: 10.1177/1010428317734691.
18. Castano, A.P.; Mroz, P.; Hamblin, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer.* **2006**, *6*, 535-545. doi: 10.1038/nrc1894.
19. 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*, 25. doi: 10.20517/2394-4722.2018.83.
20. Sellera, F.P.; Nascimento, C.L.; Ribeiro, M.S. Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice. *Springer Cham* **2016**, doi: 10.1007/978-3-319-45007-0.
21. Baptista, M.S.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; Ghogare, A.A.; Greer, A.; Hamblin, M.R.; Lorente, C.; Nunez, S.C.; Ribeiro, M.S.; Thomas, A.H.; Vignoni, M.; Yoshimura, T.M. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 912-919. doi: 10.1111/php.12716.
22. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Sacko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *J. Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
23. Delaire, J.; Piard, J.; Méallet-Renault, R.; Clavier, G. Photophysique et photochimie: des fondements aux applications. in *Quintessences. Les Ulis: EDP sciences* **2016**.
24. Nowak-Stepniowska, A.; Pergoń, P.; Padzik-Graczyk, A. Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy-mechanisms and applications. *Postepy Biochem.* **2013**, *59*, 53-63.
25. Luksiene, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina* **2003**, *39*, 1137-1150.
26. Juzeniene, A.; Moan, J. The history of PDT in Norway Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2007**, *4*, 3-11. doi: 10.1016/j.pdpdt.2006.11.002.
27. Fonseca, S.M.; Pina, J.; Amato, L.G.; Seixas de Melo, J.; Burrows, H.D.; Chattopadhyay, N.; Alcaer, L.; Charas, A.; Morgado, J.; Monkman, A.P.; Asawapirom, U.; Scherf, U.; Edge, R.; Navaratnam, S. Triplet-state and singlet oxygen formation in fluorene-based alternating copolymers. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 8278-8283. doi: 10.1021/jp060251f.
28. Kessel, D. Death pathways associated with photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.* **2006**, *21*, 219-224. doi: 10.1016/j.mla.2006.05.006.
29. Zhu, W.; Gao, Y.H.; Liao, P.Y.; Chen, D.Y.; Sun, N.N.; Nguyen Thi, P.A.; Yan, Y.J.; Wu, X.F.; Chen, Z.L. Comparison between porphyrin, chlorin and bacteriochlorin derivatives for photodynamic therapy: Synthesis, photophysical properties, and biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 146-156. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.005.
30. Köberle, B.; Schoch, S. Platinum Complexes in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Cancers* **2021**, *13*, 2073. doi: 10.3390/cancers13092073.
31. Lazarević, T.; Rilak, A.; Bugarić, Ž.D. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 8-31. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.007.
32. Alessio, E.; Mestroni, C.; Bergamo, A.; Sava, G. Ruthenium antimetastatic agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1525-1535. doi: 10.2174/1568026043387421.
33. Lee, S.Y.; Kim, C.Y.; Nam, T.G. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 5375-5392. doi: 10.2147/dddt.s275007.
34. Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Süss-Fink, G.; Ang, W.H.; Dyson, P.J.; Juillerat-Jearneret, L.; Therrien, B. Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1811-1816. doi: 10.1021/jm701382p.

35. Rani-Beeram, S.; Meyer, K.; McCrate, A.; Hong, Y.; Nielsen, M.; Swavey, S. A Fluorinated Ruthenium Porphyrin as a Potential Photodynamic Therapy Agent: Synthesis, Characterization, DNA Binding, and Melanoma Cell Studies. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 11278–11283. doi: 10.1021/ic8015589.
36. Monro, S.; Colón, K.L.; Yin, H.; Roque, J.; Konda, P.; Gujar, S.; Thummel, R.P.; Lilje, L.; Cameron, C.G.; McFarland, S.A. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 797–828. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00211.
37. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Charissoux, J.L.; Leger, D.Y.; Vergne-Salle, P.; Therrien, B.; Liagre, B. Ruthenium-based assemblies incorporating tetrapyrrolylporphyrin panels: a photosensitizer delivery strategy for the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy. *Dalton Trans.* **2022**, *51*, 9673–9680. doi: 10.1039/d2dt00917j.
38. Barry, N.P.E.; Zava, O.; Dyson, P.J.; Therrien, B. Synthesis, Characterization and Anticancer Activity of Porphyrin-Containing Organometallic Cubes. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 1529–1537. doi: 10.1071/CH10221.
39. Baskaran, R.; Lee, J.; Yang, S.G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. *Biomater. Res.* **2018**, *22*, 25. doi: 10.1186/s40824-018-0140-z.
40. Sun, R.W.-Y.; Zhang, M.; Li, D.; Li, M.; Wong, A.S.-T. Enhanced anti-cancer activities of a gold(III) pyrroliidenedithiocarbamate complex incorporated in a biodegradable metal-organic framework. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *163*, 1–7. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.06.020.
41. Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Zava, O.; Süss-Fink, G.; Juillerat-Jeanerret, L.; Therrien, B. Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 101–109. doi: 10.1007/s00775-008-0427-y.
42. Bogoeva, V.; Siksjø, M.; Sæterbo, K.G.; Melo, T.B.; Bjørkøy, A.; Lindgren, M.; Gederas, O.A. Ruthenium porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2016**, *14*, 9–17. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.01.012.
43. Gallardo-Villagrán, M.; Paulus, L.; Chansoux, J.L.; Sutour, S.; Vergne-Salle, P.; Leger, D.Y.; Liagre, B.; Therrien, B. Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 2104. doi: 10.3390/pharmaceutics13122104.
44. Silva, S.L.R.; Balza, I.R.S.; Dias, R.B.; Sales, C.B.S.; Gurgel Rocha, C.A.; Soares, M.B.P.; Correa, R.S.; Batista, A.A.; Bezerra, D.P. Ru(II)-thymine complex causes DNA damage and apoptotic cell death in human colon carcinoma HCT116 cells mediated by JNK/p38/ERK1/2 via a p53-independent signaling. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11094. doi: 10.1038/s41598-019-47539-0.
45. Mishra, A.K.; Mishra, L. Ruthenium chemistry. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., **2018**. doi.org/10.1201/9781315110585.
46. Lu, Y.; Shen, T.; Yang, H.; Gu, W. Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 775. doi: 10.3390/ijms17050775.
47. Barry, N.P.E.; Austen, M.; Lacour, J.; Therrien, B. Highly Efficient NMR Enantiodiscrimination of Chiral Octanuclear Metallaboxes in Polar Solvent. *Organometallics* **2009**, *28*, 4894–4897. doi: 10.1021/om900461s.
48. Lepage, C.; Leger, D.Y.; Bertrand, J.; Martin, F.; Beneytout, J.L.; Liagre, B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2011**, *301*, 193–202. doi: 10.1016/j.canlet.2010.12.003.
49. Rioux, B.; Finon, A.; Gamond, A.; Martin, F.; Laurent, A.; Champavier, Y.; Barette, C.; Liagre, B.; Fagnère, C.; Sol, V.; Pouget, C. Synthesis and biological evaluation of chalcone-polyamine conjugates as novel vectorized agents in colorectal and prostate cancer chemotherapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *222*, 113586. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113586.

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.

Mis en forme : Surlignage

Discussion générale et perspectives

Les différents travaux réalisés au cours de ma thèse permettent de voir l'étendue des champs d'application sur des pathologies diverses pour l'utilisation des complexes arène-Ru. Le facteur limitant des traitements conventionnels tels que la chimiothérapie est le mauvais ciblage des cellules tumorales entraînant de nombreux effets secondaires notamment dans le cas des cancers. L'avantage principal de la PDT est d'avoir une action localisée limitant ainsi les dommages causés aux tissus sains environnants. Les PS étant pour la plupart peu solubles dans les milieux biologiques, l'utilisation de vecteurs et notamment de cage arène-Ru a été étudiée. Le plus souvent lorsque l'on parle de PDT, on pense à une pénétration ciblée au niveau de la tumeur via « l'enhanced permeability and retention effect » ou effet EPR. Le principe de cet effet repose sur le fait qu'au niveau des tumeurs, il y a formation de néo-vaisseaux créant des petites cavités de 0.2 à 2 μm permettant ainsi l'accumulation des PS utilisés. Néanmoins, dans notre cas, il n'existe aucune preuve de l'existence d'un tel effet. L'effet EPR n'étant pas analysable *in vitro*, des analyses supplémentaires *in vivo* seraient nécessaires afin de constater qu'il n'y ait pas de coagulation ou d'interaction avec les composants sanguins. Il faudrait également analyser les vaisseaux et notamment le temps de rétention du PS au sein des tumeurs. En effet, une des conditions pour déterminer la présence de l'effet EPR est la rétention du PS pendant plusieurs jours ou semaines [237].

L'intérêt de ce projet de recherche repose sur l'utilisation de cage d'arène-Ru dans la vectorisation de nos différents PS permettant ainsi de contourner leur problème de stabilité et solubilité. Il serait intéressant dans un premier temps d'étudier les mécanismes d'internalisation et de relargage des PS une fois intégrés aux cellules. En effet, l'association des médicaments à base de métaux avec des protéines sériques humaines dont les transporteurs membranaires sont surexprimés dans les tissus tumoraux est une stratégie bien connue afin d'obtenir une accumulation sélective des complexes au niveau des tissus tumoraux. De ce fait, les PS à base de métaux se lient aux protéines sériques, soit par liaison covalente, soit par interaction non covalente. Ces liaisons ont donc été étudiées en tant que stratégie d'administration d'agents en PDT pour cibler efficacement les cellules tumorales. Les PS à base de Ru sont connus pour s'associer avec l'albumine ou la transferrine dans le sérum permettant ainsi un transport efficace médié par les récepteurs dans les cellules cancéreuses [238]. Une étude récente [239] a ainsi permis de déterminer la nature des interactions des complexes Ru avec la transferrine par différents éléments : la nature du complexe Ru, en particulier la présence de groupes résiduels tels que Cl^- , la disponibilité des sites de liaison au Fe(III) au niveau de la transferrine et enfin la présence de protéines concurrentes pour la liaison du Ru (en particulier l'albumine). De plus, il a été constaté que les complexes de Ru incapables de se lier de manière covalente à la transferrine ou l'albumine peuvent être absorbés dans les cellules en étant piégés au sein des endosomes pendant l'endocytose constitutive. Ceci est le scénario le plus probable d'absorption de complexes de Ru médiée par la transferrine *in vivo*. Afin de voir la liaison de nos complexes de Ru à ces différents transporteurs, il suffirait d'utiliser une colonne de filtration sur gel. Après avoir mis au préalable nos différents complexes en contact de nos cellules et récupéré du milieu de culture, les éluats récupérés contiendront ainsi des fractions de Ru liées à des protéines.

La phototoxicité des différents composés arène-Ru utilisés dans nos études présentées montrent un effet cytotoxique important. En effet, peu importe la pathologie traitée, et donc les lignées cellulaires utilisées, les valeurs d'IC₅₀ sont de l'ordre du nanomolaire, et ce, qu'il y ait présence d'un ou deux PS au niveau des cages. En toute logique, les cages comprenant 2 PS (cubiques) induisent une cytotoxicité remarquable avec des IC₅₀ inférieures à 500 nM. De façon générale, l'ajout d'un métal au centre du PS induit une diminution voire aucun effet. Ceci peut potentiellement être expliqué par une fluorescence plus importante pour les PS ayant un centre métallique. Comme vu lors de l'introduction au niveau du diagramme de Jablonski (Figure 29), lorsque le PS est irradié, il est excité et atteindra un état d'énergie plus élevé en absorbant une partie de l'irradiation. Puis il y aura décroissance énergétique de l'état excité vers l'état minimal dont la conséquence principale est la fluorescence. Il en résulte qu'un état de fluorescence élevé suggère qu'une partie importante de l'état excité singulet du PS retourne directement à l'état fondamental sans passer par l'état triplet excité. Il génère de ce fait plus de fluorescence mais moins d'énergie dans l'état triplet qui interagira avec l'O₂ présent dans l'environnement et *in fine* ne donnera naissance qu'à peu d'EROs entraînant une mort cellulaire moins importante.

Lors de nos analyses concernant la cytotoxicité de nos composés, nous avons également mis en évidence l'absence d'effet à l'obscurité de chacun d'entre eux, et ce, même à des fortes concentrations, faisant potentiellement de ces complexes de très bons PS pour la PDT. Il est important de noter que les effets observés ne sont le résultat que de l'activité des PS et non de la cage arène-Ru en elle-même. En effet, il est peu probable qu'aux concentrations utilisées celles-ci puissent jouer un rôle cytotoxique. En effet, une étude menée en 2023 [240] démontre l'efficacité de différents composés à base de Ru au sein de lignées du cancer du poumon ou du col de l'utérus de l'ordre du micromolaire et non du nanomolaire. Dans le cas du CaP, il aurait été intéressant de tester ces différents complexes sur la lignée LNCaP, celle-ci étant hormono-résistante, ceci afin d'étudier de possibles différences avec les lignées non-hormono dépendantes DU145 et PC-3. Dans le but d'améliorer les différentes études proposées, il serait important de vérifier la cytotoxicité de nos différents complexes sur des lignées saines aux concentrations testées. Ainsi dans le traitement du CaP, il conviendrait de tester nos composés sur la lignée RWPE-1. Cette lignée, correspond à des cellules épithéliales isolées provenant de la zone périphérique d'une prostate normale d'un homme de 51 ans. Dans le cas du CCR, il faudrait tester nos composés sur une lignée épithéliale saine : HIEC-6 ou la lignée CHON-001 dans le cas du traitement contre la PR. La lignée CHON-001 correspond à une lignée cellulaire de fibroblastes isolés à partir du cartilage d'une donneuse saine âgée de 18 semaines. La lignée HIEC-6 quant à elle correspond à des cellules épithéliales isolées de l'intestin grêle d'un patient.

Pour aller encore plus loin dans ces études, il serait intéressant de déterminer les effets des composés arène-Ru sur des cellules souches pluripotentes induites (iPS). En effet, les cellules souches embryonnaires (CSE) étant des cellules pluripotentes ce sont elles qui nous viendraient à l'esprit en premier lieu. Ces cellules précurseurs non-différenciées sont capables de donner naissance à tous les tissus et organes du corps humain, de plus, elles partagent les mêmes antigènes que les cellules tumorales. Néanmoins, de nombreuses contraintes éthiques évidentes ont limité leur utilisation. C'est pourquoi, la recherche et notamment la recherche en cancérologie s'est tournée vers les iPS. En effet, les cellules souches

cancéreuses ont été désignées comme un facteur important dans le développement des métastases. Les iPS correspondent à des cellules dérivées de tissus du patient à traiter qui seront reprogrammées en cellules souches pluripotentes permettant la production *in vitro* de métastases. Malgré cette niche prometteuse, l'utilisation d'IPS dans le domaine de la PDT n'est que peu étudiée à l'heure actuelle. Une première étude, prometteuse, utilisant un laser de faible intensité dans le cas de cellules souches du cancer du poumon, a démontré que cette irradiation de faible intensité pouvait entraîner différents processus de mort cellulaire : l'apoptose, l'autophagie ou encore la nécrose [241]. Une autre étude réalisée en 2020, utilisant des nano-sondes à base de MnO₂ dans les cellules iPS a été réalisée. Celle-ci a permis de démontrer l'efficacité du traitement en ciblant préférentiellement les tumeurs, améliorant la PDT tout en entraînant une forte réponse immunitaire antitumorale [242].

Au sein des différents articles et résultats complémentaires, l'analyse du processus apoptotique confirme bien sa mise en place avec un clivage de la caspase-3 et de la PARP-1 induisant la fragmentation de l'ADN. Ces résultats concordent avec de nombreuses études réalisées pour différentes pathologies [243]–[245]. Il serait également intéressant d'analyser le processus de nécrose. Il a en effet été observé un choix dans la mort cellulaire pour la ZnPc en fonction du nombre d'heures de mise en contact avec les cellules [246]. En effet, après 2 h de mise en contact avec le PS suivi d'une photoactivation, la mort prédominante est la nécrose. En revanche après 24 h d'incubation avec le PS suivi d'une photoactivation comme dans notre cas, les cellules ont montré des changements morphologiques typiques de l'apoptose. Une analyse par microscopie électronique de nos cellules en cas de mise en contact plus ou moins prolongée avant la photoactivation nous permettrait de voir s'il s'agit d'une mort cellulaire exclusivement apoptotique.

En amont de la réalisation *in vivo* de tests d'efficacité, il serait important de réaliser la même étude sur des modèles de sphéroïdes. En effet, les structures 2D utilisées ici, ne permettent pas de mimer le microenvironnement existant *in vivo*. C'est pourquoi l'utilisation de systèmes d'organoïdes ou de sphéroïdes reflétant les aspects spécifiques et complexes des tissus tumoraux serait un atout. Des organoïdes de la prostate [247] ou encore du colo-rectum [248] ont notamment déjà été produits. Plus récemment, des études ont mis en évidence les différentes étapes du développement *in vitro* mimant une PR à l'aide du culture tridimensionnelle en fonction des cellules et stimuli utilisés [249]. Néanmoins, ce modèle se heurte à plusieurs limites telles qu'une rigidité et un taux d'absorption des matrices naturelles ne pouvant être ajustés, une accumulation des métabolites ou encore une faible reproductibilité. Le modèle idéal dans le cas de la PR devrait stimuler le rôle de la matrice *in vivo* permettant l'étude des interactions cellulaires avec des cellules souches tout en évitant les différences liées à l'utilisation de modèles animaux non humains. Un autre intérêt de l'utilisation des sphéroïdes est qu'ils peuvent être fixés au niveau d'un bloc de paraffine permettant ainsi de regarder l'expression de certaines protéines telles que Ki-67 présente dans les noyaux des cellules en prolifération.

Notre projet de recherche a démontré *in vitro* des effets prometteurs qui devraient représenter une porte d'entrée pour la mise en place de modèles pré-cliniques chez le petit animal. Dans le cas de la PR, une étude présente un modèle de rats atteints de PR [250]. Il

s'agit d'un modèle d'arthrite adjuvante (maladie auto-immune de modèle d'arthrite médiée par les lymphocytes T) similaire à celui retrouvé en clinique. Ce modèle a ainsi pu être validé par la présence de caractéristiques physiques telles que le degré de gonflement des pattes ainsi que la présence de nodules sur le nez, les oreilles, la queue et les pattes. Les auteurs ont ainsi pu montrer l'efficacité de la PDT médiée par le 5-ALA inhibant les capacités migratoires des cellules RA-FL (« rheumatoid arthritis-fibroblast-like) et induisant l'apoptose de ces cellules par production excessive d'EROs. Ce modèle semble donc prometteur et pourrait nous être utile afin de tester l'efficacité *in vivo* de nos composés dans le traitement de la PR.

Il serait intéressant d'envisager l'utilisation d'un modèle de xénogreffe sous-cutanée chez la souris dans le cas du CCR et du CaP, comme déjà réalisé au sein du laboratoire [153], [251]. Il faudrait pour cela utiliser des souris immunodéficientes et évaluer les effets des complexes sur la croissance tumorale et le poids corporel des souris tous les 2 j pendant 21 j. Une seule tumeur sur les deux injectées sur chaque flanc de souris sera photoactivée par un laser afin de comparer l'efficacité intra-individu. Néanmoins cette technique a pour limite le manque d'interaction entre l'hôte et la tumeur (par l'utilisation de souris immunodéficientes) ne permettant pas de mimer l'impact du système immunitaire dans le développement des tumeurs. La solution serait donc de réaliser des greffes orthotopiques directement au niveau du côlon ou de la prostate. Cependant, le microenvironnement créé sera murin. De plus, des études histologiques par coloration à l'hématoxyline éosine nous permettrait de voir la densité cellulaire en présence et en absence de photoactivation au sein des tumeurs. En complément, une étude de biodistribution permettrait de voir si nos complexes s'accumulent bien préférentiellement au niveau du site tumoral. Au regard des résultats observés *in vitro*, il semblerait nécessaire de s'intéresser au processus apoptotique *in vivo*. Pour se faire, il serait possible d'utiliser une sonde telle que la DY-734-annexine V (excitation : 736 nm ; émission 759 nm), celle-ci pourrait être injectée au sein des tumeurs et ce, même dans les groupes témoins. Une photoactivation dans l'infrarouge permettra ainsi de visualiser le processus apoptotique via PDT. Lorsque l'apoptose est engagée, la vascularisation de la tumeur est endommagée, entraînant donc une diminution des nutriments nécessaires à son développement. Cela détermine ainsi le succès thérapeutique [252]. Il conviendrait donc d'étudier également le système de vascularisation tumoral. Pour se faire, l'agent de contraste IRDye® 800CW RGD Optical Probe pourrait être utilisé. En effet, celui-ci va cibler spécifiquement les intégrines $\alpha_5\beta_3$, présentes à la surface des cellules endothéliales de la tumeur. Il serait ainsi possible par imagerie de déterminer la vascularisation tumorale tout au long de la croissance mais également lors du traitement via les PS puis l'effet de la photoactivation sur le processus apoptotique.

Références bibliographiques

- [1] J.-N. Cornu et O. Cussenot, « Biologie moléculaire de la prostate normale et pathologique », *EMC - Urol.*, vol. 4, n° 2, p. 1-10, janv. 2011, doi: 10.1016/S1762-0953(11)46413-X.
- [2] R. A. Bok et E. J. Small, « Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, n° 12, Art. n° 12, déc. 2002, doi: 10.1038/nrc951.
- [3] M. Zerbib et P. Beuzeboc, « De la physiopathologie aux nouvelles approches thérapeutiques hormonales dans les cancers de prostate résistants à la castration », e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2012, 11 (1) : 056-059
- [4] F. Reeves, Wouter Everaerts, Declan G. Murphy, Anthony Costello, « Chapter 29 - The Surgical Anatomy of the Prostate », Pages 253-263, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800077-9.00029-3>.
- [5] A. M. De Marzo *et al.*, « Inflammation in prostate carcinogenesis », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, n° 4, p. 256-269, avr. 2007, doi: 10.1038/nrc2090.
- [6] Cancer Today disponible en ligne : <http://gco.iarc.fr/today/home> (consulté le: 7 août 2023). [En ligne].
- [7] J. Cucherousset, « Formes inhabituelles de cancer de la prostate », *Le nouveau cancérologue*, vol. 08, 2015.
- [8] Prostate Cancer Stages | Staging of Prostate Cancer disponible en ligne :: <https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html> (consulté le: 7 août 2023).
- [9] Tnm classification of malignant tumours 8th edition, disponible en ligne : <https://www.uicc.org/resources/tnm-classification-malignant-tumours-8th-edition>
- [10] R. Montironi *et al.*, « Narrative review of prostate cancer grading systems: will the Gleason scores be replaced by the Grade Groups? », *Transl. Androl. Urol.*, vol. 10, n° 3, p. 1530-1540, mars 2021, doi: 10.21037/tau-20-853.
- [11] P. A. Humphrey, « Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate », *Mod. Pathol.*, vol. 17, n° 3, p. 292-306, mars 2004, doi: 10.1038/modpathol.3800054.
- [12] P. H. Gann, « Risk Factors for Prostate Cancer », *Rev. Urol.*, vol. 4, n° Suppl 5, p. S3-S10, 2002.
- [13] L. Barber *et al.*, « Family History of Breast or Prostate Cancer and Prostate Cancer Risk », *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, n° 23, p. 5910-5917, déc. 2018, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0370.

- [14] Y.-C. Chen, J. H. Page, R. Chen, et E. Giovannucci, « Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era », *The Prostate*, vol. 68, n° 14, p. 1582-1591, oct. 2008, doi: 10.1002/pros.20825.
- [15] T. R. Rebbeck, « Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography », *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 27, n° 1, p. 3-10, janv. 2017, doi: 10.1016/j.semradonc.2016.08.002.
- [16] J. Ma *et al.*, « Prediagnostic body-mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality in men with prostate cancer: a long-term survival analysis », *Lancet Oncol.*, vol. 9, n° 11, p. 1039-1047, nov. 2008, doi: 10.1016/S1470-2045(08)70235-3.
- [17] M. Huncharek, K. S. Haddock, R. Reid, et B. Kupelnick, « Smoking as a Risk Factor for Prostate Cancer: A Meta-Analysis of 24 Prospective Cohort Studies », *Am. J. Public Health*, vol. 100, n° 4, p. 693-701, avr. 2010, doi: 10.2105/AJPH.2008.150508.
- [18] J. Zhao, T. Stockwell, A. Roemer, et T. Chikritzhs, « Is alcohol consumption a risk factor for prostate cancer? A systematic review and meta-analysis », *BMC Cancer*, vol. 16, p. 845, nov. 2016, doi: 10.1186/s12885-016-2891-z.
- [19] R. J. Shephard, « Physical Activity and Prostate Cancer: An Updated Review », *Sports Med.*, vol. 47, n° 6, p. 1055-1073, juin 2017, doi: 10.1007/s40279-016-0648-0.
- [20] S. A. Kenfield, M. J. Stampfer, E. Giovannucci, et J. M. Chan, « Physical activity and survival after prostate cancer diagnosis in the health professionals follow-up study », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, n° 6, p. 726-732, févr. 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.31.5226.
- [21] K. Trudeau, M.-C. Rousseau, et M.-É. Parent, « Extent of Food Processing and Risk of Prostate Cancer: The PROtEuS Study in Montreal, Canada », *Nutrients*, vol. 12, n° 3, p. 637, févr. 2020, doi: 10.3390/nu12030637.
- [22] Rowles JL 3rd, Ranard KM, Smith JW, An R, Erdman JW Jr. «Increased dietary and circulating lycopene are associated with reduced prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis ». *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017 Dec;20(4):361-377. doi: 10.1038/pcan.2017.25. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28440323.
- [23] M. Wiseman, « The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective », *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 67, n° 3, p. 253-256, août 2008, doi: 10.1017/S002966510800712X.
- [24] H. K. Ahn, Y. H. Lee, et K. C. Koo, « Current Status and Application of Metformin for Prostate Cancer: A Comprehensive Review », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n° 22, p. 8540, nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21228540.
- [25] L. C. Harshman *et al.*, « Statin Use at the Time of Initiation of Androgen Deprivation Therapy and Time to Progression in Patients With Hormone-Sensitive Prostate Cancer », *JAMA Oncol.*, vol. 1, n° 4, p. 495, juill. 2015, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.0829.

- [26] A. Alicia, « Biopsies ciblées dans le diagnostic du cancer de la prostate », 2021.
- [27] C. Pezaro, H. H. Woo, et I. D. Davis, « Prostate cancer: measuring PSA: Measuring PSA », *Intern. Med. J.*, vol. 44, n° 5, p. 433-440, mai 2014, doi: 10.1111/imj.12407.
- [28] Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P. « Prostate-specific antigen ». *Semin Cancer Biol.* 1999 Apr;9(2):83-93. doi: 10.1006/scbi.1998.0086. PMID: 10202130.
- [29] R. T. McCormack *et al.*, « Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: A new era », *Urology*, vol. 45, n° 5, p. 729-744, mai 1995, doi: 10.1016/S0090-4295(99)80076-4.
- [30] S. D. Mikolajczyk, L. S. Marks, A. W. Partin, et H. G. Rittenhouse, « Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex », *Urology*, vol. 59, n° 6, p. 797-802, juin 2002, doi: 10.1016/S0090-4295(01)01605-3.
- [31] S. Hatakeyama, T. Yoneyama, Y. Tobisawa, et C. Ohyama, « Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers », *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 22, n° 2, p. 214-221, avr. 2017, doi: 10.1007/s10147-016-1049-y.
- [32] S. M. Dehm et D. J. Tindall, « Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer », *Mol. Endocrinol.*, vol. 21, n° 12, p. 2855-2863, déc. 2007, doi: 10.1210/me.2007-0223.
- [33] E. Schreyer *et al.*, « Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate », *médecine/sciences*, vol. 33, n° 8-9, p. 758-764, août 2017, doi: 10.1051/medsci/20173308021.
- [34] B. Gottlieb, L. K. Beitel, A. Nadarajah, M. Paliouras, et M. Trifiro, « The androgen receptor gene mutations database: 2012 update », *Hum. Mutat.*, vol. 33, n° 5, p. 887-894, mai 2012, doi: 10.1002/humu.22046.
- [35] M. Sekhoacha, K. Riet, P. Motloun, L. Gumenku, A. Adegoke, et S. Mashele, « Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches », *Molecules*, vol. 27, n° 17, p. 5730, sept. 2022, doi: 10.3390/molecules27175730.
- [36] C. J. Ryan *et al.*, « Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy », *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, n° 2, p. 138-148, janv. 2013, doi: 10.1056/NEJMoa1209096.
- [37] V. Patel, B. Liaw, et W. Oh, « The role of ketoconazole in current prostate cancer care », *Nat. Rev. Urol.*, vol. 15, n° 10, Art. n° 10, oct. 2018, doi: 10.1038/s41585-018-0077-y.
- [38] Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004 Oct 7;351(15):1502-12. doi: 10.1056/NEJMoa040720. PMID: 15470213.
- [39] S. Guillaumier *et al.*, « A Multicentre Study of 5-year Outcomes Following Focal Therapy in Treating Clinically Significant Nonmetastatic Prostate Cancer », *Eur. Urol.*, vol. 74, n° 4, p. 422-429, oct. 2018, doi: 10.1016/j.eururo.2018.06.006.

- [40] J.-F. Hétet, P. Colls, P. Pocholle, P. Chauveau, C. Barré, et P. Hallouin, « Cryothérapie focale pour cancer localisé de la prostate : principes, indications, résultats », *Prog. En Urol. - FMC*, vol. 23, n° 4, p. F111-F118, déc. 2013, doi: 10.1016/j.fpurol.2013.06.003.
- [41] S. F. Shariat, G. Raptidis, M. Masatoschi, F. Bergamaschi, et K. M. Slawin, « Pilot study of radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) for the treatment of radio-recurrent prostate cancer », *The Prostate*, vol. 65, n° 3, p. 260-267, nov. 2005, doi: 10.1002/pros.20242.
- [42] A. Blazeviski *et al.*, « Oncological and Quality-of-life Outcomes Following Focal Irreversible Electroporation as Primary Treatment for Localised Prostate Cancer: A Biopsy-monitored Prospective Cohort », *Eur. Urol. Oncol.*, vol. 3, n° 3, p. 283-290, juin 2020, doi: 10.1016/j.euo.2019.04.008.
- [43] S. Mordon, « De nouveaux développements pour le traitement du cancer par laser », *Photoniques*, n° 64, p. 31-35, mars 2013, doi: 10.1051/photon/201364031.
- [44] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, et A. R. Currie, « Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics », *Br. J. Cancer*, vol. 26, n° 4, p. 239-257, août 1972.
- [45] E. C. Klatt, *Robbins and Cotran review of pathology*, Fourth edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2015.
- [46] J. Masse, T. Watrin, A. Laurent, S. Deschamps, D. Guerrier, et I. Pellerin, « The developing female genital tract: from genetics to epigenetics », *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 53, n° 2-3, p. 411-424, 2009, doi: 10.1387/ijdb.082680jm.
- [47] R. Dobrowolski *et al.*, « Loss of connexin43-mediated gap junctional coupling in the mesenchyme of limb buds leads to altered expression of morphogens in mice », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, n° 15, p. 2899-2911, août 2009, doi: 10.1093/hmg/ddp227.
- [48] B. A. Carneiro et W. S. El-Deiry, « Targeting apoptosis in cancer therapy », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 17, n° 7, Art. n° 7, juill. 2020, doi: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- [49] G. Denecker *et al.*, « Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss », *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, n° 6, p. 666-674, juin 2007, doi: 10.1038/ncb1597.
- [50] A. Markiewicz, D. Sigorski, M. Markiewicz, A. Owczarczyk-Saczonek, et W. Placek, « Caspase-14—From Biomolecular Basics to Clinical Approach. A Review of Available Data », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 11, p. 5575, mai 2021, doi: 10.3390/ijms22115575.
- [51] S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, et S. Kumar, « Old, new and emerging functions of caspases », *Cell Death Differ.*, vol. 22, n° 4, p. 526-539, avr. 2015, doi: 10.1038/cdd.2014.216.
- [52] C. T. Hellwig, E. Passante, et M. Rehm, « The Molecular Machinery Regulating Apoptosis Signal Transduction and its Implication in Human Physiology and Pathophysiology », *Curr. Mol. Med.*, vol. 11, n° 1, p. 31-47, févr. 2011, doi: 10.2174/156652411794474400.

- [53] D. R. Green, « Caspase Activation and Inhibition », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 14, n° 8, p. a041020, janv. 2022, doi: 10.1101/cshperspect.a041020.
- [54] M. L. G. Ramirez et G. S. Salvesen, « A primer on caspase mechanisms », *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 82, p. 79-85, oct. 2018, doi: 10.1016/j.semcdb.2018.01.002.
- [55] S. J. Riedl et G. S. Salvesen, « The apoptosome: signalling platform of cell death », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, n° 5, Art. n° 5, mai 2007, doi: 10.1038/nrm2153.
- [56] J. Puccini et S. Kumar, « Caspases », in *Encyclopedia of Cell Biology*, R. A. Bradshaw et P. D. Stahl, Éd., Waltham: Academic Press, 2016, p. 364-373. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.30049-9.
- [57] A. U. Lüthi et S. J. Martin, « The CASBAH: a searchable database of caspase substrates », *Cell Death Differ.*, vol. 14, n° 4, p. 641-650, avr. 2007, doi: 10.1038/sj.cdd.4402103.
- [58] D. R. Green, Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022 Mar 1;14(3):a041012. doi: 10.1101/cshperspect.a041012. PMID: 35232877; PMCID: PMC8886984.
- [59] C.-C. Wu et S. B. Bratton, « Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 19, n° 6, p. 546-558, août 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4905.
- [60] C.-C. Wu *et al.*, « The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities », *Nat. Commun.*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, nov. 2016, doi: 10.1038/ncomms13565.
- [61] G. Kroemer, L. Galluzzi, et C. Brenner, « Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death », *Physiol. Rev.*, vol. 87, n° 1, p. 99-163, janv. 2007, doi: 10.1152/physrev.00013.2006.
- [62] L. Y. Li, X. Luo, et X. Wang, « Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria », *Nature*, vol. 412, n° 6842, p. 95-99, juill. 2001, doi: 10.1038/35083620.
- [63] D. Bano et J. H. M. Prehn, « Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer », *eBioMedicine*, vol. 30, p. 29-37, avr. 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.016.
- [64] A. Ashkenazi, « Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, n° 6, p. 420-430, juin 2002, doi: 10.1038/nrc821.
- [65] K. M. Boatright *et al.*, « A Unified Model for Apical Caspase Activation », *Mol. Cell*, vol. 11, n° 2, p. 529-541, févr. 2003, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00051-0.
- [66] G. S. Salvesen et V. M. Dixit, « Caspase activation: The induced-proximity model », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, n° 20, p. 10964-10967, sept. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.20.10964.

- [67] M. D. Daniell et J. S. Hill, « A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY », *ANZ J. Surg.*, vol. 61, n° 5, p. 340-348, mai 1991, doi: 10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x.
- [68] N. R. Finsen, « The Red Light Treatment of Small-Pox », *BMJ*, vol. 2, n° 1823, p. 1412-1414, déc. 1895, doi: 10.1136/bmj.2.1823.1412-a.
- [69] N. R. Finsen, « REMARKS on the RED-LIGHT TREATMENT of SMALL-POX: Is the Treatment of Small-pox Patients in Broad Daylight Warrantable? », *BMJ*, vol. 1, n° 2214, p. 1297-1298, juin 1903, doi: 10.1136/bmj.1.2214.1297.
- [70] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):380-7. doi: 10.1038/nrc1071. PMID: 12724736
- [71] M.Hamblin; P. Mroz, *Advances in photodynamic therapy: basic, translational, and clinical. Artech House*, 2008.
- [72] S. Kwiatkowski *et al.*, « Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 106, p. 1098-1107, oct. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- [73] M. Miyake *et al.*, « Diagnostic approach for cancer cells in urine sediments by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic detection in bladder cancer », *Cancer Sci.*, vol. 105, n° 5, p. 616-622, mai 2014, doi: 10.1111/cas.12393.
- [74] T. Yoshida *et al.*, « Photodynamic Diagnosis–guided Dual Laser Ablation for Upper Urinary Tract Carcinoma: Preoperative Preparation, Surgical Technique, and Clinical Outcomes », *Eur. Urol. Open Sci.*, vol. 28, p. 17-25, juin 2021, doi: 10.1016/j.euros.2021.03.009.
- [75] M. J. Colditz et R. L. Jeffree, « Aminolevulinic acid (ALA)–protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies », *J. Clin. Neurosci.*, vol. 19, n° 11, p. 1471-1474, nov. 2012, doi: 10.1016/j.jocn.2012.03.009.
- [76] D. Zaak *et al.*, « Photodynamic Therapy by Means of 5-ALA Induced PPIX in Human Prostate Cancer – Preliminary Results », *Med. Laser Appl.*, vol. 18, n° 1, p. 91-95, janv. 2003, doi: 10.1078/1615-1615-00092.
- [77] Y. Nakai *et al.*, « Photodynamic diagnosis of shed prostate cancer cells in voided urine treated with 5-aminolevulinic acid », *BMC Urol.*, vol. 14, n° 1, p. 59, déc. 2014, doi: 10.1186/1471-2490-14-59.
- [78] J. Webber, D. Kessel, et D. Fromm, « Side Effects and Photosensitization of Human Tissues after Aminolevulinic Acid », *J. Surg. Res.*, vol. 68, n° 1, p. 31-37, févr. 1997, doi: 10.1006/jsre.1997.5004.
- [79] M. DeRosa, « Photosensitized singlet oxygen and its applications », *Coord. Chem. Rev.*, vol. 233-234, p. 351-371, nov. 2002, doi: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6.

- [80] C. S. Foote, « DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTSENSITIZED OXIDATION », *Photochem. Photobiol.*, vol. 54, n° 5, p. 659-659, 1991, doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x.
- [81] M. S. Baptista *et al.*, « Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways », *Photochem. Photobiol.*, vol. 93, n° 4, p. 912-919, juill. 2017, doi: 10.1111/php.12716.
- [82] Thèse de Hélène Moulet soutenue le 5 février 2019, Sujet : Mort cellulaire initiée par l'oxygène singulet : mise en évidence d'effets à longue portée.
- [83] N. L. Oleinick, R. L. Morris, et I. Belichenko, « The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how », *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.*, vol. 1, n° 1, p. 1-21, janv. 2002, doi: 10.1039/b108586g.
- [84] R. W. Redmond et I. E. Kochevar, « Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Invited Review », *Photochem. Photobiol.*, vol. 82, n° 5, p. 1178-1186, 2006, doi: 10.1562/2006-04-14-IR-874.
- [85] J. Moan, « Porphyrin-sensitized photodynamic inactivation of cells: A review », *Lasers Med. Sci.*, vol. 1, n° 1, p. 5-12, janv. 1986, doi: 10.1007/BF02030731.
- [86] Bagdonas S, Ma LW, Iani V, Rotomskis R, Juzenas P, Moan J. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro: a spectroscopic study. *Photochem Photobiol.* 2000 Aug;72(2):186-92. doi: 10.1562/0031-8655(2000)072<0186:pooaip>2.0.co;2. PMID: 10946571.
- [87] R. Bonnett et G. Martínez, « Photobleaching of Sensitisers Used in Photodynamic Therapy », *Tetrahedron*, vol. 57, p. 9513-9547, nov. 2001, doi: 10.1016/S0040-4020(01)00952-8.
- [88] Tasso TT, Schlothauer JC, Junqueira HC, Matias TA, Araki K, Liandra-Salvador É, Antonio FCT, Homem-de-Mello P, Baptista MS. Photobleaching Efficiency Parallels the Enhancement of Membrane Damage for Porphyrazine Photosensitizers. *J Am Chem Soc.* 2019 Oct 2;141(39):15547-15556. doi: 10.1021/jacs.9b05991. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31490678.
- [89] P. S. P. Thong, M. Olivo, W. W. L. Chin, R. Bhuvanewari, K. Mancor, et K.-C. Soo, « Clinical application of fluorescence endoscopic imaging using hypericin for the diagnosis of human oral cavity lesions », *Br. J. Cancer*, vol. 101, n° 9, p. 1580-1584, nov. 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6605357.
- [90] P. Agostinis, A. Vantieghem, W. Merlevede, et P. A. M. De Witte, « Hypericin in cancer treatment: more light on the way », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 34, n° 3, p. 221-241, mars 2002, doi: 10.1016/S1357-2725(01)00126-1.
- [91] G. Siboni, H. Weitman, D. Freeman, Y. Mazur, Z. Malik, et B. Ehrenberg, « The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells », *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 1, n° 7, p. 483-491, juill. 2002, doi: 10.1039/B202884K.

- [92] Doug. S. English, R. T. Doyle, J. W. Petrich, et P. G. Haydon, « Subcellular Distributions and Excited-State Processes of Hypericin in Neurons », *Photochem. Photobiol.*, vol. 69, n° 3, p. 301-305, 1999, doi: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb03290.x.
- [93] K. M. Lm Davids, « The Anticancer Activity of Hypericin in Photodynamic Therapy », *J. Bioanal. Biomed.*, vol. s6, 2012, doi: 10.4172/1948-593X.S6-004.
- [94] Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*. 2001 Nov 15;20(52):7597-609. doi: 10.1038/sj.onc.1204997. PMID: 11753638.
- [95] Yang J, Ning J, Peng L, He D. Effect of curcumin on Bcl-2 and Bax expression in nude mice prostate cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Aug 1;8(8):9272-8. PMID: 26464676; PMCID: PMC4583908.
- [96] F. Rashid et R. W. Horobin, « Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 2. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic probes, and a discussion of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches », *Histochemistry*, vol. 94, n° 3, p. 303-308, 1990, doi: 10.1007/BF00266632.
- [97] R. Santus *et al.*, « Permeation of Lysosomal Membranes in the Course of Photosensitization with Methylene Blue and Hematoporphyrin: Study by Cellular Microspectrofluorometry », *Photochem. Photobiol.*, vol. 38, n° 1, p. 71-77, 1983, doi: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb08368.x.
- [98] D.-S. Yu, S.-Y. Chang, et C.-P. Ma, « The Effect of Methylene Blue-Sensitized Photodynamic Treatment on Bladder Cancer Cells: A Further Study on Flow Cytometric Basis », *J. Urol.*, vol. 149, n° 5, Part 1, p. 1198-1201, mai 1993, doi: 10.1016/S0022-5347(17)36347-4.
- [99] J. P. Tardivo *et al.*, « Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, n° 3, p. 175-191, sept. 2005, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
- [100] S. D.-M. Islam et O. Ito, « Solvent effects on rates of photochemical reactions of rose bengal triplet state studied by nanosecond laser photolysis », *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, vol. 123, n° 1-3, p. 53-59, mai 1999, doi: 10.1016/S1010-6030(99)00042-8.
- [101] Lambert CR, Kochevar IE. Electron transfer quenching of the rose bengal triplet state. *Photochem Photobiol*. 1997 Jul;66(1):15-25. doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb03133.x. PMID: 9230700.
- [102] Morrill JL, Diehl HS, Maloney WP, Gault N. University of Minnesota Medical Bulletin <https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/16733/Bulletin19551015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [103] R. L. Lipson, E. J. Baldes, et M. J. Gray, « Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer », *Cancer*, vol. 20, n° 12, p. 2255-2257, déc. 1967, doi: 10.1002/1097-0142(196712)20:12<2255::aid-cnrc2820201229>3.0.co;2-u.

- [104] R. L. Lipson, E. J. Baldes, et A. M. Olsen, « The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 26, p. 1-11, janv. 1961.
- [105] T. J. Dougherty, W. R. Potter, et K. R. Weishaupt, « The structure of the active component of hematoporphyrin derivative », *Prog. Clin. Biol. Res.*, vol. 170, p. 301-314, 1984.
- [106] C. P. Clarke, S. R. Knight, F. J. Daniel, et S. Seevanayagam, « Management of Malignant Mesothelioma by Decortication and Adjunct Phototherapy », *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.*, vol. 14, n° 3, p. 206-209, juin 2006, doi: 10.1177/021849230601400307.
- [107] S. S. Stylli, A. H. Kaye, L. MacGregor, M. Howes, et P. Rajendra, « Photodynamic therapy of high grade glioma – long term survival », *J. Clin. Neurosci.*, vol. 12, n° 4, p. 389-398, mai 2005, doi: 10.1016/j.jocn.2005.01.006.
- [108] S. S. Stylli, M. Howes, L. MacGregor, P. Rajendra, et A. H. Kaye, « Photodynamic therapy of brain tumours: evaluation of porphyrin uptake versus clinical outcome », *J. Clin. Neurosci.*, vol. 11, n° 6, p. 584-596, août 2004, doi: 10.1016/j.jocn.2004.02.001.
- [109] Jin ML, Yang BQ, Zhang W, Ren P. Review of photodynamic therapy for gastrointestinal tumours in the past 6 years in China. *J Photochem Photobiol B*. 1990 Sep;7(1):87-92. doi: 10.1016/1011-1344(90)85145-m. PMID: 2148349.
- [110] U. Schmidt-Erfurth *et al.*, « Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization: clinical and angiographic examples », *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 236, n° 5, p. 365-374, avr. 1998, doi: 10.1007/s004170050092.
- [111] H. Qiu *et al.*, « A Comparison of Dose Metrics to Predict Local Tumor Control for Photofrin-mediated Photodynamic Therapy », *Photochem. Photobiol.*, vol. 93, n° 4, p. 1115-1122, juill. 2017, doi: 10.1111/php.12719.
- [112] B. Sun, W. Li, et N. Liu, « Curative effect of the recent photofrin photodynamic adjuvant treatment on young patients with advanced colorectal cancer », *Oncol. Lett.*, vol. 11, n° 3, p. 2071-2074, mars 2016, doi: 10.3892/ol.2016.4179.
- [113] X. Wang *et al.*, « Analysis of the *In Vivo* and *In Vitro* Effects of Photodynamic Therapy on Breast Cancer by Using a Sensitizer, Sinoporphyrin Sodium », *Theranostics*, vol. 5, n° 7, p. 772-786, 2015, doi: 10.7150/thno.10853.
- [114] J. M. Nauta *et al.*, « Photofrin-mediated photodynamic therapy of chemically-induced premalignant lesions and squamous cell carcinoma of the palatal mucosa in rats », *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 26, n° 3, p. 223-231, juin 1997, doi: 10.1016/s0901-5027(97)80825-9.
- [115] C. M. Peterson, R. Reed, C. J. Jolles, K. P. Jones, R. C. Straight, et A. M. Poulson, « Photodynamic therapy of human ovarian epithelial carcinoma, OVCAR-3, heterotransplanted in the nude mouse », *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 167, n° 6, p. 1852-1855, déc. 1992, doi: 10.1016/0002-9378(92)91786-A.
- [116] Light Sciences LLC, « Safety and Efficacy of Treating Refractory Cancers With the Litx™ System: Phase II Safety and Efficacy Study in Patients With Liver Metastases From Colorectal Cancer That Have Failed Chemotherapy », clinicaltrials.gov, Clinical trial

registration NCT00068068, sept. 2006. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00068068>

[117] H. T. Whelan, « A Phase II Study of Photodynamic Therapy (PDT) With Photofrin® (IND 104,613) For Recurrent High Grade Gliomas in Adults », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT01966809, août 2019. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01966809>

[118] Roswell Park Cancer Institute, « A Randomized, Phase 2 Trial With a Phase 1 Safety Run-in: Porfimer Sodium Mediated Interstitial Photodynamic Therapy and Standard of Care (SoC) Therapy Versus SoC Therapy Alone for the Treatment of Patients With Locally Advanced or Recurrent Head and Neck Cancer », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT03727061, juin 2023. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03727061>

[119] li xiong, « Longterm Outcome of Photodynamic Therapy Compared With Chemotherapy Alone in Patients With Advanced Rectal Cancer », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT01872104, juin 2013. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01872104>

[120] Moriwaki SI, Misawa J, Yoshinari Y, Yamada I, Takigawa M, Tokura Y. Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2001 Oct;17(5):241-3. doi: 10.1034/j.1600-0781.2001.170507.x. PMID: 11555335.

[121] Yachimski P, Puricelli WP, Nishioka NS. Patient predictors of esophageal stricture development after photodynamic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Mar;6(3):302-8. doi: 10.1016/j.cgh.2007.12.001. Epub 2008 Feb 6. PMID: 18255349.

[122] E. S. Nyman et P. H. Hynninen, « Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 73, n° 1-2, p. 1-28, janv. 2004, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002.

[123] EMA, « Foscan », European Medicines Agency. Consulté le: 26 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/foscan>

[124] P. Wyss *et al.*, « Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer », *Int. J. Cancer*, vol. 93, n° 5, p. 720-724, sept. 2001, doi: 10.1002/ijc.1400.

[125] S. G. Bown, « Photodynamic therapy for cancer of the pancreas », *Gut*, vol. 50, n° 4, p. 549-557, avr. 2002, doi: 10.1136/gut.50.4.549.

[126] T. R. Nathan *et al.*, « Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study », *J. Urol.*, vol. 168, n° 4 Pt 1, p. 1427-1432, oct. 2002, doi: 10.1016/S0022-5347(05)64466-7.

[127] R. Bryce, « Burns after photodynamic therapy. Drug point gives misleading impression of incidence of burns with temoporfin (Foscan) », *BMJ*, vol. 320, n° 7251, p. 1731-1732, juin 2000, doi: 10.1136/bmj.320.7251.1731.

- [128] L. J. Scott et K. L. Goa, « Verteporfin », *Drugs Aging*, vol. 16, n° 2, p. 139-146, févr. 2000, doi: 10.2165/00002512-200016020-00005.
- [129] J.-M. Houle et H. A. Strong, « DURATION OF SKIN PHOTOSENSITIVITY AND INCIDENCE OF PHOTOSENSITIVITY REACTIONS AFTER ADMINISTRATION OF VERTEPORFIN », *RETINA*, vol. 22, n° 6, p. 691, déc. 2002.
- [130] Y. Gao, T. Yu, Y. Zhang, et G. Dang, « Anti-VEGF Monotherapy Versus Photodynamic Therapy and Anti-VEGF Combination Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Meta-Analysis », *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 59, n° 10, p. 4307, août 2018, doi: 10.1167/iovs.17-23747.
- [131] « Treatment of Primary Breast Cancer Using PDT - Full Text View - ClinicalTrials.gov ». Consulté le: 26 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02872064>
- [132] Mayo Clinic, « Phase II Study of EUS-Guided Verteporfin PDT in Solid Pancreatic Tumors (VERTPAC-02) », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT03033225, sept. 2023. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03033225>
- [133] QLT Inc., « A Phase 1/2 Uncontrolled, Open Label Study Of Photodynamic Vaccination In Patients With Stage III/IV Malignant Melanoma », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT00007969, nov. 2013. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00007969>
- [134] A. S. Salomon Yoram, « The Story of Tookad: From Bench to Bedside », in *Handbook of Photomedicine*, CRC Press, 2013.
- [135] N. Betrouni, S. Boukris, et F. Benzaghrou, « Vascular targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble (WST11) in localized prostate cancer: efficiency of automatic pre-treatment planning », *Lasers Med. Sci.*, vol. 32, n° 6, p. 1301-1307, août 2017, doi: 10.1007/s10103-017-2241-7.
- [136] A.-R. Azzouzi *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.*, vol. 18, n° 2, p. 181-191, févr. 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30661-1.
- [137] Steba Biotech S.A., « Study of Erectile Dysfunction, Urinary Incontinence and Related Quality of Life After TOOKAD® Vascular Targeted Photodynamic Therapy (VTP) for Minimally Invasive Treatment of Unilateral Low Risk Prostate Cancer », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT03849365, mars 2021. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03849365>
- [138] Steba Biotech S.A., « Study of the Efficacy, Safety and Quality of Life After TOOKAD® Soluble Vascular Targeted Photodynamic Therapy (VTP) for Minimally Invasive Treatment of Localized Intermediate Risk Prostate Cancer. », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT03315754, juill. 2023. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03315754>

- [139] University of Oxford, « Vascular Targeted Photodynamic Therapy With WST11 for T1a Renal Tumours. PHASE IIa Histological Follow up Trial », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT01573156, janv. 2018. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01573156>
- [140] S Wang, Elizabeth Bromley, Leon Xu, James C Chen & Llew Keltner (2010) Talaporfin sodium, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11:1, 133-140, DOI: 10.1517/14656560903463893
- [141] Light Sciences Oncology, « A Phase 3 Randomized Study to Evaluate Survival of Patients Treated With Talaporfin Sodium (LS11) and Interstitial Light Emitting Diodes (LED) as Compared to the Standard of Care Therapies in the Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma (HCC) », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT00355355, janv. 2015. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00355355>
- [142] M. Wachowska *et al.*, « Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer », *Molecules*, vol. 16, n° 5, p. 4140-4164, mai 2011, doi: 10.3390/molecules16054140.
- [143] H. A. Kurwa, S. A. Yong-Gee, P. T. Seed, A. C. Markey, et R. J. Barlow, « A randomized paired comparison of photodynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 41, n° 3, p. 414-418, sept. 1999, doi: 10.1016/S0190-9622(99)70114-3.
- [144] J. A. Tournas *et al.*, « Combined benzoporphyrin derivative monoacid ring photodynamic therapy and pulsed dye laser for port wine stain birthmarks », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 6, n° 3-4, p. 195-199, sept. 2009, doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.002.
- [145] S. Duchi *et al.*, « Mesenchymal stem cells as delivery vehicle of porphyrin loaded nanoparticles: Effective photoinduced in vitro killing of osteosarcoma », *J. Controlled Release*, vol. 168, n° 2, p. 225-237, juin 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.03.012.
- [146] M. Rapp, M. Kamp, H.-J. Steiger, et M. Sabel, « Endoscopic-Assisted Visualization of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence in Malignant Glioma Surgery: A Technical Note », *World Neurosurg.*, vol. 82, n° 1-2, p. e277-e279, juill. 2014, doi: 10.1016/j.wneu.2013.07.002.
- [147] R. Díez Valle, J. Slof, J. Galván, C. Arza, C. Romariz, et C. Vidal, « Observational, retrospective study of the effectiveness of 5-aminolevulinic acid in malignant glioma surgery in Spain (The VISIONA study) », *Neurol. Engl. Ed.*, vol. 29, n° 3, p. 131-138, avr. 2014, doi: 10.1016/j.nrleng.2013.05.004.
- [148] S. J. Wong *et al.*, « A phase I trial of aminolevulinic acid-photodynamic therapy for treatment of oral leukoplakia », *Oral Oncol.*, vol. 49, n° 9, p. 970-976, sept. 2013, doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.05.011.
- [149] A. Petri, D. Yova, E. Alexandratou, M. Kyriazi, et M. Rallis, « Comparative characterization of the cellular uptake and photodynamic efficiency of Foscan® and Fospeg in

a human prostate cancer cell line », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 9, n° 4, p. 344-354, déc. 2012, doi: 10.1016/j.pdpdt.2012.03.008.

[150] A.-R. Azzouzi *et al.*, « TOOKAD® Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer », *BJU Int.*, vol. 112, n° 6, p. 766-774, 2013, doi: 10.1111/bju.12265.

[151] N. Swamy, « An estradiol-Porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-Positive breast cancer cells », *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 10, n° 10, p. 3237-3243, oct. 2002, doi: 10.1016/S0968-0896(02)00242-0.

[152] C. Fidanzi-Dugas *et al.*, « Analysis of the in vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on prostate cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamine derivatives », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1861, n° 7, p. 1676-1690, juill. 2017, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.02.003.

[153] C. Fidanzi-Dugas *et al.*, « Analysis of the in vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on prostate cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamine derivatives », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1861, n° 7, p. 1676-1690, juill. 2017, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.02.003.

[154] T. Nagaya, K. Sato, T. Harada, Y. Nakamura, P. L. Choyke, et H. Kobayashi, « Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting EGFR Positive Triple Negative Breast Cancer: Optimizing the Conjugate-Light Regimen », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 8, p. e0136829, août 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0136829.

[155] K. S. Kim, J. Kim, D. H. Kim, H. S. Hwang, et K. Na, « Multifunctional trastuzumab-chlorin e6 conjugate for the treatment of HER2-positive human breast cancer », *Biomater. Sci.*, vol. 6, n° 5, p. 1217-1226, mai 2018, doi: 10.1039/C7BM01084B.

[156] D. Yadav, K. Sandeep, D. Pandey, et R. K. Dutta, « Liposomes for Drug Delivery », *J. Biotechnol. Biomater.*, vol. 07, n° 04, 2017, doi: 10.4172/2155-952X.1000276.

[157] A. R. Menjoge, R. M. Kannan, et D. A. Tomalia, « Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications », *Drug Discov. Today*, vol. 15, n° 5-6, p. 171-185, mars 2010, doi: 10.1016/j.drudis.2010.01.009.

[158] A. Yu. Rybkin, A. V. Kozlov, A. Yu. Belik, et A. I. Kotelnikov, « Fullerenes and fullerene-dye structures in photodynamic therapy », in *Nanomaterials for Photodynamic Therapy*, Elsevier, 2023, p. 349-399. doi: 10.1016/B978-0-323-85595-2.00012-8.

[159] K. Madaan, S. Kumar, N. Poonia, V. Lather, et D. Pandita, « Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues », *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 6, n° 3, p. 139-150, 2014, doi: 10.4103/0975-7406.130965.

[160] F.P. Sellera *et al* « Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice ».

- [161] A. El-Hussein, I. Mfouo-Tynga, M. Abdel-Harith, et H. Abrahamse, « Comparative study between the photodynamic ability of gold and silver nanoparticles in mediating cell death in breast and lung cancer cell lines », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 153, p. 67-75, déc. 2015, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.028.
- [162] C.-K. Chu *et al.*, « Combination of photothermal and photodynamic inactivation of cancer cells through surface plasmon resonance of a gold nanoring », *Nanotechnology*, vol. 27, n° 11, p. 115102, févr. 2016, doi: 10.1088/0957-4484/27/11/115102.
- [163] M. J. Meziani *et al.*, « Visible-Light-Activated Bactericidal Functions of Carbon “Quantum” Dots », ACS Publications. Consulté le: 26 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/acsami.6b01765>
- [164] Li S, Chang K, Sun K, Tang Y, Cui N, Wang Y, Qin W, Xu H, Wu C. Amplified Singlet Oxygen Generation in Semiconductor Polymer Dots for Photodynamic Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Feb 17;8(6):3624-34. doi: 10.1021/acsami.5b07995. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26492203.
- [165] S. Jin *et al.*, « A new near infrared photosensitizing nanoplatfrom containing blue-emitting up-conversion nanoparticles and hypocrellin A for photodynamic therapy of cancer cells », *Nanoscale*, vol. 5, n° 23, p. 11910-11918, nov. 2013, doi: 10.1039/C3NR03515H.
- [166] N. Spyropoulos-Antonakakis *et al.*, « Selective aggregation of PAMAM dendrimer nanocarriers and PAMAM/ZnPc nanodrugs on human atheromatous carotid tissues: a photodynamic therapy for atherosclerosis », *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 10, n° 1, p. 210, déc. 2015, doi: 10.1186/s11671-015-0904-5.
- [167] E. Bastien *et al.*, « PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects », *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 14, n° 12, p. 2203-2212, nov. 2015, doi: 10.1039/C5PP00274E.
- [168] M. O. Senge, « mTHPC – A drug on its way from second to third generation photosensitizer? », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 9, n° 2, p. 170-179, juin 2012, doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.10.001.
- [169] J. Tu *et al.*, « Multifunctional ZnPc-loaded mesoporous silica nanoparticles for enhancement of photodynamic therapy efficacy by endolysosomal escape », *Biomaterials*, vol. 33, n° 31, p. 7903-7914, nov. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.025.
- [170] T. Windahl, S. O. Andersson, et L. Lofgren, « Photodynamic therapy of localised prostatic cancer », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 336, n° 8723, p. 1139, nov. 1990, doi: 10.1016/0140-6736(90)92626-s.
- [171] Moore CM, Nathan TR, Lees WR, Mosse CA, Freeman A, Emberton M, Bown SG. Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):356-63. doi: 10.1002/lsm.20275. PMID: 16392142.
- [172] C. Adam *et al.*, « Photodynamic Diagnosis Using 5-Aminolevulinic Acid for the Detection of Positive Surgical Margins during Radical Prostatectomy in Patients with Carcinoma of the Prostate: A Multicentre, Prospective, Phase 2 Trial of a Diagnostic

Procedure », *Eur. Urol.*, vol. 55, n° 6, p. 1281-1288, juin 2009, doi: 10.1016/j.eururo.2009.02.027.

[173] H. Patel *et al.*, « Motexafin Lutetium-Photodynamic Therapy of Prostate Cancer: Short- and Long-Term Effects on Prostate-Specific Antigen », *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, n° 15, p. 4869-4876, août 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0317.

[174] Du KL, Mick R, Busch TM, Zhu TC, Finlay JC, Yu G, Yodh AG, Malkowicz SB, Smith D, Whittington R, Stripp D, Hahn SM. Preliminary results of interstitial motexafin lutetium-mediated PDT for prostate cancer. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):427-34. doi: 10.1002/lsm.20341. PMID: 16788929.

[175] Trachtenberg J, Bogaards A, Weersink RA, Haider MA, Evans A, McCluskey SA, Scherz A, Gertner MR, Yue C, Appu S, Aprikian A, Savard J, Wilson BC, Elhilali M. Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response. *J Urol.* 2007 Nov;178(5):1974-9; discussion 1979. doi: 10.1016/j.juro.2007.07.036. Epub 2007 Sep 17. PMID: 17869307.

[176] J. Trachtenberg *et al.*, « Vascular-targeted photodynamic therapy (padoporfin, WST09) for recurrent prostate cancer after failure of external beam radiotherapy: a study of escalating light doses », *BJU Int.*, vol. 102, n° 5, p. 556-562, 2008, doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.07753.x.

[177] C. Eymerit-Morin, M. Zidane, S. Lebdaï, S. Triau, A. R. Azzouzi, et M.-C. Rousselet, « Histopathology of prostate tissue after vascular-targeted photodynamic therapy for localized prostate cancer », *Virchows Arch.*, vol. 463, n° 4, p. 547-552, oct. 2013, doi: 10.1007/s00428-013-1454-9.

[178] Moore CM, Azzouzi AR, Barret E, Villers A, Muir GH, Barber NJ, Bott S, Trachtenberg J, Arumainayagam N, Gaillac B, Allen C, Schertz A, Emberton M. Determination of optimal drug dose and light dose index to achieve minimally invasive focal ablation of localised prostate cancer using WST11-vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy. *BJU Int.* 2015 Dec;116(6):888-96. doi: 10.1111/bju.12816. Epub 2015 Apr 21. PMID: 24841929.

[179] S. S. Taneja *et al.*, « Final Results of a Phase I/II Multicenter Trial of WST11 Vascular Targeted Photodynamic Therapy for Hemi-Ablation of the Prostate in Men with Unilateral Low Risk Prostate Cancer Performed in the United States », *J. Urol.*, vol. 196, n° 4, p. 1096-1104, oct. 2016, doi: 10.1016/j.juro.2016.05.113.

[180] I. S. Gill *et al.*, « Randomized Trial of Partial Gland Ablation with Vascular Targeted Phototherapy versus Active Surveillance for Low Risk Prostate Cancer: Extended Followup and Analyses of Effectiveness », *J. Urol.*, vol. 200, n° 4, p. 786-793, oct. 2018, doi: 10.1016/j.juro.2018.05.121.

[181] S. Lebdaï, P. Bigot, P.-A. Leroux, L.-P. Berthelot, P. Maulaz, et A.-R. Azzouzi, « Vascular Targeted Photodynamic Therapy with Padeliporfin for Low Risk Prostate Cancer Treatment: Midterm Oncologic Outcomes », *J. Urol.*, vol. 198, n° 2, p. 335-344, août 2017, doi: 10.1016/j.juro.2017.03.119.

- [182] J. A. Rodríguez-Rivera *et al.*, « Extensión de la indicación de terapia fotodinámica dirigida vascular con padeliporfina (WST11): resultados de un estudio multicéntrico latinoamericano del cáncer de próstata », *Actas Urol. Esp.*, vol. 42, n° 10, p. 632-638, déc. 2018, doi: 10.1016/j.acuro.2018.02.009.
- [183] Noweski A, Roosen A, Lebdai S, Barret E, Emberton M, Benzaghrou F, Apfelbeck M, Gaillac B, Gratzke C, Stief C, Azzouzi AR. Medium-term Follow-up of Vascular-targeted Photodynamic Therapy of Localized Prostate Cancer Using TOOKAD Soluble WST-11 (Phase II Trials). *Eur Urol Focus*. 2019 Nov;5(6):1022-1028. doi: 10.1016/j.euf.2018.04.003. Epub 2018 Apr 13. PMID: 29661587.
- [184] L. Flegar *et al.*, « Vascular-targeted Photodynamic Therapy in Unilateral Low-risk Prostate Cancer in Germany: 2-yr Single-centre Experience in a Real-world Setting Compared with Radical Prostatectomy », *Eur. Urol. Focus*, vol. 8, n° 1, p. 121-127, janv. 2022, doi: 10.1016/j.euf.2021.01.018.
- [185] Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko J. et al. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* 222, 385–386 (1969). <https://doi.org/10.1038/222385a0>
- [186] M. Frezza *et al.*, « Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 16, n° 16, p. 1813-1825, juin 2010, doi: 10.2174/138161210791209009.
- [187] A. Bhargava et U. N. Vaishampayan, « Satraplatin: leading the new generation of oral platinum agents », *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 18, n° 11, p. 1787-1797, nov. 2009, doi: 10.1517/13543780903362437.
- [188] M. Corte-Rodríguez *et al.*, « Quantitative evaluation of cellular uptake, DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines: Comparison of different Pt-containing drugs », *Biochem. Pharmacol.*, vol. 98, n° 1, p. 69-77, nov. 2015, doi: 10.1016/j.bcp.2015.08.112.
- [189] L. E. Calderon *et al.*, « Pt-Mal-LHRH, a Newly Synthesized Compound Attenuating Breast Cancer Tumor Growth and Metastasis by Targeting Overexpression of the LHRH Receptor », *Bioconjug. Chem.*, vol. 28, n° 2, p. 461-470, févr. 2017, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00610.
- [190] X. Wang, L. Ren, L. Ye, et J. Cao, « Photodynamic therapy augments oxaliplatin-induced immunogenic cell death in colorectal cancer », *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2023, doi: 10.5114/ceji.2023.132053.
- [191] L. Qi, Q. Luo, Y. Zhang, F. Jia, Y. Zhao, et F. Wang, « Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 32, n° 8, p. 1469-1486, août 2019, doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00204.
- [192] D. García Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco González, L. M. Sierra Zapico, et A. Sanz-Medel, « Reduction of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Vivo by Selenomethionine: The Effect on Cisplatin–DNA Adducts », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 24, n° 6, p. 896-904, juin 2011, doi: 10.1021/tx200085n.

- [193] L. Bai *et al.*, « Research progress in modern structure of platinum complexes », *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 140, p. 349-382, nov. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.09.034.
- [194] M. T. Wlodarczyk *et al.*, « Platinum (II) complex-nuclear localization sequence peptide hybrid for overcoming platinum resistance in cancer therapy », *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 4, n° 2, p. 463-467, févr. 2018, doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00921.
- [195] K. D. Mjos et C. Orvig, « Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry », *Chem. Rev.*, vol. 114, n° 8, p. 4540-4563, avr. 2014, doi: 10.1021/cr400460s.
- [196] Q. Chen *et al.*, « Platinum(IV) prodrugs with long lipid chains for drug delivery and overcoming cisplatin resistance », *Chem. Commun. Camb. Engl.*, vol. 54, n° 42, p. 5369-5372, mai 2018, doi: 10.1039/c8cc02791a.
- [197] F. Zhou *et al.*, « Cisplatin Prodrug-Conjugated Gold Nanocluster for Fluorescence Imaging and Targeted Therapy of the Breast Cancer », *Theranostics*, vol. 6, n° 5, p. 679-687, mars 2016, doi: 10.7150/thno.14556.
- [198] A. Gandioso *et al.*, « An integrin-targeted photoactivatable Pt(IV) complex as a selective anticancer pro-drug: synthesis and photoactivation studies », *Chem. Commun.*, vol. 51, n° 44, p. 9169-9172, mai 2015, doi: 10.1039/C5CC03180J.
- [199] X. Hu, F. Li, N. Noor, et D. Ling, « Platinum drugs: from Pt(II) compounds, Pt(IV) prodrugs, to Pt nanocrystals/nanoclusters », *Sci. Bull.*, vol. 62, n° 8, p. 589-596, avr. 2017, doi: 10.1016/j.scib.2017.03.008.
- [200] Q. Cheng et Y. Liu, « Multifunctional platinum-based nanoparticles for biomedical applications », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 9, n° 2, mars 2017, doi: 10.1002/wnan.1410.
- [201] Y. Yang *et al.*, « Cisplatin-DNA adduct repair of transcribed genes is controlled by two circadian programs in mouse tissues », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, n° 21, p. E4777-E4785, mai 2018, doi: 10.1073/pnas.1804493115.
- [202] M. Raudenska, J. Balvan, M. Fojtu, J. Gumulec, et M. Masarik, « Unexpected therapeutic effects of cisplatin », *Met. Integr. Biometal Sci.*, vol. 11, n° 7, p. 1182-1199, juill. 2019, doi: 10.1039/c9mt00049f.
- [203] Liang ZD, Long Y, Chen HH, Savaraj N, Kuo MT. Regulation of the high-affinity copper transporter (hCtr1) expression by cisplatin and heavy metals. *J Biol Inorg Chem.* 2014 Jan;19(1):17-27. doi: 10.1007/s00775-013-1051-z. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24132751; PMCID: PMC3889686.
- [204] H.-O. Rashid, R. K. Yadav, H.-R. Kim, et H.-J. Chae, « ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection », *Autophagy*, vol. 11, n° 11, p. 1956-1977, sept. 2015, doi: 10.1080/15548627.2015.1091141.
- [205] G. Ferraro et A. Merlino, « Metallodrugs: Mechanisms of Action, Molecular Targets and Biological Activity », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n° 7, p. 3504, mars 2022, doi: 10.3390/ijms23073504.

- [206] G. Sava, A. Bergamo et P.J. Dyson « Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next? - *Dalton Trans.*, 2011,40, 9069-9075
- [207] J. R. Durig, J. Danneman, W. D. Behnke, et E. E. Mercer, « The induction of filamentous growth in *Escherichia coli* by ruthenium and palladium complexes », *Chem. Biol. Interact.*, vol. 13, n° 3-4, p. 287-294, juin 1976, doi: 10.1016/0009-2797(76)90081-8.
- [208] A. Chylewska, M. Biedulska, P. Sumczynski, et M. Makowski, « Metallopharmaceuticals in Therapy - A New Horizon for Scientific Research », *Curr. Med. Chem.*, vol. 25, n° 15, p. 1729-1791.
- [209] Z. Trávníček, M. Matiková-Mal'arová, R. Novotná, J. Vančo, K. Stěpánková, et P. Suchý, « In vitro and in vivo biological activity screening of Ru(III) complexes involving 6-benzylaminopurine derivatives with higher pro-apoptotic activity than NAMI-A », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, n° 7, p. 937-948, juill. 2011, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.04.002.
- [210] G. Sava *et al.*, « Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 40, n° 9, p. 1383-1396, juin 2004, doi: 10.1016/j.ejca.2004.01.034.
- [211] S. Zorzet *et al.*, « Lack of In vitro cytotoxicity, associated to increased G(2)-M cell fraction and inhibition of matrigel invasion, may predict In vivo-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 295, n° 3, p. 927-933, déc. 2000.
- [212] M. Oszejca, G. Collet, G. Stochel, C. Kieda, et M. Brindell, « Hypoxia-selective inhibition of angiogenesis development by NAMI-A analogues », *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, vol. 29, n° 6, p. 1035-1046, déc. 2016, doi: 10.1007/s10534-016-9974-9.
- [213] Bergamo A, Delfino R, Casarsa C, Sava G. CDK1 hyperphosphorylation maintenance drives the time-course of G2-M cell cycle arrest after short treatment with NAMI-A in Kb cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012 Oct 1;12(8):949-58. doi: 10.2174/187152012802650039. PMID: 22263785.
- [214] A. Bergamo et G. Sava, « Evaluation of NAMI-A Cytotoxic Effects toward Leukemia Cell Lines: A Slippery Ground Giving Misleading Messages », *Crit. Rev. Oncog.*, vol. 26, n° 2, p. 73-78, 2021, doi: 10.1615/CritRevOncog.2020036010.
- [215] S. Leijen *et al.*, « Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy », *Invest. New Drugs*, vol. 33, n° 1, p. 201-214, févr. 2015, doi: 10.1007/s10637-014-0179-1.
- [216] M. S. Galanski, V. B. Arion, M. A. Jakupec, et B. K. Keppler, « Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting Metal Complexes », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 9, n° 25, p. 2078-2089, 2003, doi: 10.2174/1381612033454180.
- [217] P. K. Shah, N. R. Jena, et P. K. Shukla, « Reactions of Ru(III)-drugs KP1019 and KP418 with guanine, 2'-deoxyguanosine and guanosine: a DFT study », *J. Mol. Model.*, vol. 28, n° 10, p. 291, sept. 2022, doi: 10.1007/s00894-022-05304-7.

- [218] S. Kapitza *et al.*, « Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells », *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 131, n° 2, p. 101-110, févr. 2005, doi: 10.1007/s00432-004-0617-0.
- [219] P. Heffeter *et al.*, « Intrinsic and Acquired Forms of Resistance against the Anticancer Ruthenium Compound KP1019 [Indazolium *trans* -[tetrachlorobis(1 *H* -indazole)ruthenate (III)] (FFC14A) », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 312, n° 1, p. 281-289, janv. 2005, doi: 10.1124/jpet.104.073395.
- [220] Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessler M, Egger A, Berger W, Zorbas H, Dyson PJ, Keppler BK. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem Biodivers.* 2008 Oct;5(10):2140-2155. doi: 10.1002/cbdv.200890195. PMID: 18972504.
- [221] R. E. Morris *et al.*, « Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes », *J. Med. Chem.*, vol. 44, n° 22, p. 3616-3621, oct. 2001, doi: 10.1021/jm010051m.
- [222] R. E. Aird *et al.*, « In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 86, n° 10, p. 1652-1657, mai 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600290.
- [223] R. E. Aird *et al.*, « In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer », *Br. J. Cancer*, vol. 86, n° 10, p. 1652-1657, mai 2002, doi: 10.1038/sj.bjc.6600290.
- [224] C. Scolaro *et al.*, « In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes », *J. Med. Chem.*, vol. 48, n° 12, p. 4161-4171, juin 2005, doi: 10.1021/jm050015d.
- [225] C. A. Vock, A. K. Renfrew, R. Scopelliti, L. Juillerat-Jeanneret, et P. J. Dyson, « Influence of the Diketonato Ligand on the Cytotoxicities of [Ru(η^6 -p-cymene)(R2acac)(PTA)]⁺ Complexes (PTA = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) », *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2008, n° 10, p. 1661-1671, 2008, doi: 10.1002/ejic.200701291.
- [226] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis, et S. L. Heath, « [Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo[3.3.1.1]decane): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells », *Chem. Commun.*, n° 15, p. 1396-1397, 2001, doi: 10.1039/b104021a.
- [227] K. Kessenbrock, V. Plaks, et Z. Werb, « Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment », *Cell*, vol. 141, n° 1, p. 52-67, avr. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- [228] A. Bergamo, A. Masi, A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, P. J. Sadler, et G. Sava, « In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 104, n° 1, p. 79-86, janv. 2010, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.10.005.
- [229] L. Ma, R. Ma, Z. Wang, S.-M. Yiu, et G. Zhu, « Heterodinuclear Pt(IV)–Ru(II) anticancer prodrugs to combat both drug resistance and tumor metastasis », *Chem. Commun.*, vol. 52, n° 71, p. 10735-10738, août 2016, doi: 10.1039/C6CC04354B.

[230] Theralase® Technologies Inc., « A Phase II Clinical Study of Intravesical Ruvidar® in Patients With BCG-Unresponsive Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (“NMIBC”) Carcinoma In-Situ (“CIS”) or Patients Who Are Intolerant to BCG Therapy (“Study II”) », clinicaltrials.gov, Clinical trial registration NCT03945162, avr. 2023. Consulté le: 1 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03945162>

[229] Thèse de G.-V. Manuel-Angel, « New anti-inflammatory and pro-apoptotic photosensitizers against arthritis and synovial sarcoma ».

[232] Y. Wang, Y. Lin, H. Zhang, et J. Zhu, « A photodynamic therapy combined with topical 5-aminolevulinic acid and systemic hematoporphyrin derivative is more efficient but less phototoxic for cancer », *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 142, n° 4, p. 813-821, avr. 2016, doi: 10.1007/s00432-015-2066-3.

[233] S. Hosokawa *et al.*, « Porfimer sodium-mediated photodynamic therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 29, p. 101627, mars 2020, doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101627.

[234] M. Gallardo-Villagrán, D. Y. Leger, B. Liagre, et B. Therrien, « Photosensitizers Used in the Photodynamic Therapy of Rheumatoid Arthritis », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n° 13, p. 3339, juill. 2019, doi: 10.3390/ijms20133339.

[235] M. Gallardo-Villagrán *et al.*, « Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy », *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 12, p. 2104, déc. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13122104.

[236] F. Schmitt, N. P. E. Barry, L. Juillerat-Jeanneret, et B. Therrien, « Efficient photodynamic therapy of cancer using chemotherapeutic porphyrin–ruthenium metallacubes », *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, n° 1, p. 178-180, janv. 2012, doi: 10.1016/j.bmcl.2011.11.058.

[237] H. Maeda, H. Nakamura, et J. Fang, « The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, n° 1, p. 71-79, janv. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.10.002.

[238] J. C. Pessoa et I. Tomaz, « Transport of Therapeutic Vanadium and Ruthenium Complexes by Blood Plasma Components », *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, n° 31, p. 3701-3738.

[239] A. Levina, A. R. M. Chetcuti, et P. A. Lay, « Controversial Role of Transferrin in the Transport of Ruthenium Anticancer Drugs », *Biomolecules*, vol. 12, n° 9, p. 1319, sept. 2022, doi: 10.3390/biom12091319.

[240] X. Peng, Q. Tang, H. Zhu, L. Bai, H. Zhao, et Y. Chen, « Study on antitumor activity of three ruthenium arene complexes in vitro », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 247, p. 112310, oct. 2023, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2023.112310.

[241] A. M. Crous et H. Abrahamse, « Lung cancer stem cells and low-intensity laser irradiation: a potential future therapy? », *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, n° 5, p. 129, déc. 2013, doi: 10.1186/scrt340.

[242] Y. Liu *et al.*, « Human iPS Cells Loaded with MnO₂-Based Nanoprobes for Photodynamic and Simultaneous Enhanced Immunotherapy Against Cancer », *Nano-Micro Lett.*, vol. 12, n° 1, p. 127, déc. 2020, doi: 10.1007/s40820-020-00452-y.

[243] L. M. Bomfim *et al.*, « Ruthenium(II) complexes with 6-methyl-2-thiouracil selectively reduce cell proliferation, cause DNA double-strand break and trigger caspase-mediated apoptosis through JNK/p38 pathways in human acute promyelocytic leukemia cells », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, août 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47914-x.

[241] Peña B, Saha S, Barhoumi R, Burghardt RC, Dunbar KR. Ruthenium(II)-Polypyridyl Compounds with π -Extended Nitrogen Donor Ligands Induce Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma (A549) Cells by Triggering Caspase-3/7 Pathway. *Inorg Chem.* 2018 Oct 15;57(20):12777-12786. doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b01988. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30239197.

[245] Y. Lu, T. Shen, H. Yang, et W. Gu, « Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, n° 5, p. 775, mai 2016, doi: 10.3390/ijms17050775.

[243] Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res.* 2001 Oct 15;61(20):7495-500. PMID: 11606385.

[247] D. Gao *et al.*, « Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer », *Cell*, vol. 159, n° 1, p. 176-187, sept. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.08.016.

[248] A. Barbáchano *et al.*, « Organoids and Colorectal Cancer », *Cancers*, vol. 13, n° 11, p. 2657, mai 2021, doi: 10.3390/cancers13112657.

[249] A. Damerou et T. Gaber, « Modeling Rheumatoid Arthritis In Vitro: From Experimental Feasibility to Physiological Proximity », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n° 21, p. 7916, oct. 2020, doi: 10.3390/ijms21217916.

[250] Y. Li *et al.*, « 5-aminolevulinic acid-loaded dissolving microneedle array for photodynamic therapy of rheumatoid arthritis on rats », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 162, p. 114684, juin 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114684.

[251] L. Bretin *et al.*, « Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer », *Cancers*, vol. 11, n° 10, p. 1474, sept. 2019, doi: 10.3390/cancers11101474.

[252] B. Döme, M. J. C. Hendrix, S. Paku, J. Tóvári, et J. Tímár, « Alternative Vascularization Mechanisms in Cancer », *Am. J. Pathol.*, vol. 170, n° 1, p. 1-15, janv. 2007, doi: 10.2353/ajpath.2007.060302.

Nouveaux photosensibilisateurs fonctionnalisés par des complexes arène-ruthénium actifs en thérapie photodynamique : signalisation intracellulaire et évaluation *in vitro* sur des modèles de cancer prostatique

Le cancer de la prostate (CaP) est le 2^{ème} cancer le plus diagnostiqué chez les hommes et le 5^{ème} le plus meurtrier. Malgré de nombreux traitements existants, de nombreux effets indésirables sont observés. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses est donc nécessaire afin d'améliorer la qualité de vie de ces patients. La thérapie photodynamique (PDT) utilise des photosensibilisateurs (PS) et se présente comme une stratégie thérapeutique innovante limitant le risque d'effets secondaires. La PDT est une méthode non invasive utilisant les PS ainsi que la lumière afin d'induire la mort cellulaire par génération d'espèces réactives de l'oxygène. Néanmoins, certains PS utilisés (notamment la porphine) présentent une faible solubilité dans les milieux biologiques. Par conséquent, une fonctionnalisation ou une vectorisation est nécessaire afin d'assurer l'internalisation des PS au sein des cellules cancéreuses. Dans cette étude, nous avons utilisés la tétrapyrroldiporphine (**TPyP**), la porphine (**Por**) ou la phtalocyanine (**Pc**) ayant été fonctionnalisées par des cages métalliques à base d'arène-ruthénium (Ru). Ces assemblages peuvent ainsi héberger le PS à l'intérieur de leur cavité ou être construits avec les PS faisant partie de la cage en elle-même, et se présentent comme un système innovant de vectorisation de PS. L'objectif de cette étude a été d'évaluer *in vitro* l'effet anticancéreux de différents composés photoactivés par la lumière rouge sur deux lignées du CaP non hormono-dépendant ainsi que de déterminer le processus de mort cellulaire impliqué. L'objectif était également de voir si l'ajout de métal (Co, Mg ou Zn) au centre des PS joue un rôle dans l'efficacité de ceux-ci. Nous avons ainsi démontré que la plupart des composé utilisés au sein de cette étude possédaient un effet phototoxique important. Il en résulte que l'ajout de métal à l'intérieur de l'anneau tétrapyrrolique diminue l'effet anticancéreux (Zn^{2+} ou Mg^{2+}), voir l'annihile en présence de Co^{2+} . Nous avons démontré que la mort cellulaire induite suite à la photoactivation dépendait de la voie apoptotique. En conclusion, ces systèmes semblent prometteurs dans la vectorisation de TPyP et Por pour de futures études pré-cliniques contre le CaP.

Mots-clés : Cancer prostate, Thérapie photodynamique, Photosensibilisateurs, Arène-ruthénium

New photosensitizers functionalized by arene-ruthenium complexes active in photodynamic therapy: intracellular signaling and *in vitro* evaluation in prostate cancer models

Prostate cancer (PCa) is the 2nd most frequently diagnosed cancer in men, and the 5th most deadly. Despite numerous existing treatments, many side effects are observed. The development of new anti-cancer therapeutic strategies is therefore necessary to improve patients' quality of life. Photodynamic therapy (PDT) uses photosensitizers (PS) and is an innovative therapeutic strategy that limits the risk of side effects. PDT is a non-invasive method using PS and light to induce cell death by generating reactive oxygen species (ROS). However, some of the PS used (notably porphine) have low solubility in biological media. Consequently, functionalization or vectorization is required to ensure PS internalization within cancer cells. In this study, we used tetrapyrroldiporphine (**TPyP**), porphine (**Por**) or phthalocyanin (**Pc**) functionalized with arene-ruthenium (Ru)-based metal cages. These assemblies can host the PS inside their cavity or be constructed with the PS forming part of the cage itself, and present themselves as an innovative PS delivery system. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the anticancer effect of different compounds photoactivated by red light on two non-hormone-dependent PCa lines, and to determine the cell death process involved. The aim was also to see whether the addition of metal (Co, Mg or Zn) to the center of the PS plays a role in their efficacy. We demonstrated that most of the compounds used in this study had a significant phototoxic effect. As a result, the addition of metal to the interior of the tetrapyrrolic ring diminishes the anticancer effect (Zn^{2+} or Mg^{2+}), or even annihilates it in the presence of Co^{2+} . Induced cell death following photoactivation was shown to depend on the apoptotic pathway. In conclusion, these systems look promising for TPyP delivery and Por for future pre-clinical studies against PCa.

Keywords : Prostate cancer, Photodynamic therapy, Photosensitizers, Arene-ruthenium

