

LA LUMIÈRE POURRAIT-ELLE TRAITER LE CANCER PAR INTERACTIONS LUMIÈRE-VIVANT ?

De la molécule à la tumeur

Guillaume GARCIA
Philippe MAILLARD
Joël MISPELTER
Florent POYER
Carole D. THOMAS

CMIB, UMR 9187 CNRS-U 1196
INSERM-Institut Curie
Institut Curie, Centre universitaire
Paris-Sud, 91405 Orsay, France
philippe.maillard@curie.u-psud.fr

Depuis plusieurs milliers d'années, la lumière qu'elle soit naturelle ou artificielle a été utilisée comme traitement de maladies de la peau, des yeux ou contre le cancer. Ce n'est qu'au début du XX^e siècle que la science s'est intéressée aux interactions « lumière-vivant ». La compréhension de l'action conjuguée, dénommée « photothérapie dynamique », d'un médicament non toxique à l'obscurité, de l'oxygène et de la lumière a permis de mettre au point un protocole d'éradication de tumeurs bénignes ou malignes et d'anomalies vasculaires. Depuis environ 30 ans, on voit apparaître de nombreuses molécules photoactivables de plus en plus efficaces. Peu de molécules photosensibles ont encore atteint le stade clinique, mais les résultats publiés dans la littérature scientifique montrent que la photothérapie dynamique est en plein développement et a un avenir certain [1-3].

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis plusieurs millénaires ; une exposition au soleil en présence ou non d'extraits de plantes pour traiter des affections cutanées a longtemps été pratiquée en Egypte, en Inde ou en Chine.

Il est possible de classer ces activités curatives selon trois axes.

- L'héliothérapie et la photothérapie utilisent uniquement les effets directs de la lumière naturelle ou artificielle (traitement du rachitisme, du vitiligo ou d'infections mycobactériologiques).
- La photochimiothérapie implique l'utilisation d'un médicament activable par la lumière (traitement du psoriasis par PUVA, consistant en l'illumination de la zone malade par les rayons ultraviolets A, après la prise d'un médicament photosensibilisant généralement de la famille des psoralènes).
- La photothérapie dynamique ou photochimiothérapie dynamique conjuguant

l'action d'une molécule appelée photosensibilisateur (PS), non toxique par elle-même qui, excitée par une lumière visible, peut soit retourner à l'état fondamental par fluorescence permettant un diagnostic, soit générer, par transfert d'énergie, des espèces très toxiques, comme l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, issues de l'oxygène moléculaire.

La thérapie photodynamique (ou PDT)

L'histoire de la PDT

Actuellement, une des principales applications de l'interaction « lumière-vivant » concerne la thérapie photodynamique ou PDT comme traitement d'affections localisées en cancérologie et en ophtalmologie [4]. Le terme PDT a été introduit au début du siècle dernier par le docteur Raab

(Munich) lorsqu'il rapporta l'effet toxique de l'association d'un colorant, l'acridine, et de la lumière solaire sur la paramécie. La première utilisation en cancérologie humaine est due à von Tappeiner et Jesionek (Munich) qui, en 1903, traitèrent des tumeurs de la peau par une application d'éosine suivie d'une exposition à la lumière. L'ère moderne de la PDT commence dans les années 1960, avec les travaux de Lipson et Baldes (Rochester, Minnesota, USA) qui mirent en évidence les propriétés photodynamiques, et la capacité à se concentrer dans les tissus tumoraux, d'un mélange de colorants (*hematoporphyrin derivative* ou HpD) obtenu à partir du sang séché par un traitement chimique. Le mécanisme par lequel le HpD s'accumule de manière relativement sélective dans les tissus tumoraux a fait l'objet de nombreuses études, mais demeure encore très mal compris. Les applications cliniques en cancérologie ont été initiées dès 1972

Une technique en pleine évolution

La PDT entraîne moins de traumatisme pour le malade que les traitements chimiothérapeutiques ou chirurgicaux et se présente souvent comme la dernière option possible. Son caractère non invasif et son pouvoir cicatrisant la situent comme une alternative, par exemple, dans le traitement du cancer de la peau et d'autres lésions dermiques. La PDT peut être répétée sans accumulation d'effets secondaires.

Malgré ces aspects attractifs, le très faible nombre de photosensibilisateurs disponibles ayant obtenu, au niveau mondial, une autorisation de mise sur le marché, apparaît comme un verrou. Le développement de nouveaux agents photoactivables, indispensable à l'essor de la PDT, doit prendre en compte plusieurs paramètres dont l'importance relative dépend des mécanismes moléculaires de la photosensibilisation, du mode de transport des photosensibilisateurs, du franchissement des barrières membranaires, de la localisation intracellulaire déterminant les sites d'action primaire de la PDT et de la biodistribution tissulaire.

Les stratégies anticancéreuses par PDT actuelles tendent à s'orienter vers l'élaboration de molécules « hybrides », composées d'un principe actif photoactivable associé à un module de reconnaissance spécifique de la cellule tumorale à détruire. La conjugaison d'un photosensibilisateur avec des modules d'adressage (sucres, ligands, peptides, anticorps...) ayant une affinité particulière pour des récepteurs membranaires surexprimés à la surface des cellules tumorales induit une augmentation significative et sélective de l'incorporation dans les cellules tumorales, et donc de l'activité photodynamique [4].

En outre, la PDT est efficace dans le traitement de lésions à haut risque de carcinomes intramuqueux sur œsophage de Barrett, voire dans des pathologies bénignes comme la DMLA (dégénérescence maculaire

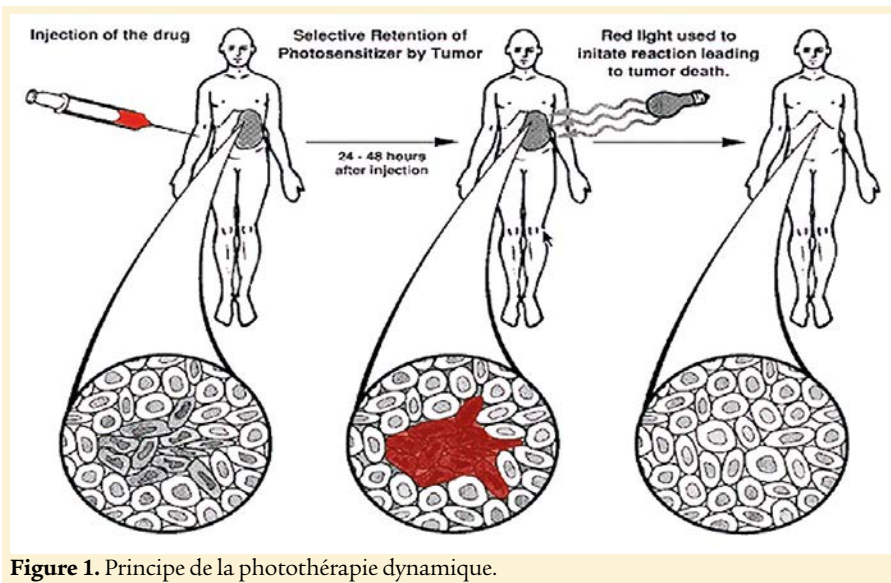


Figure 1. Principe de la photothérapie dynamique.

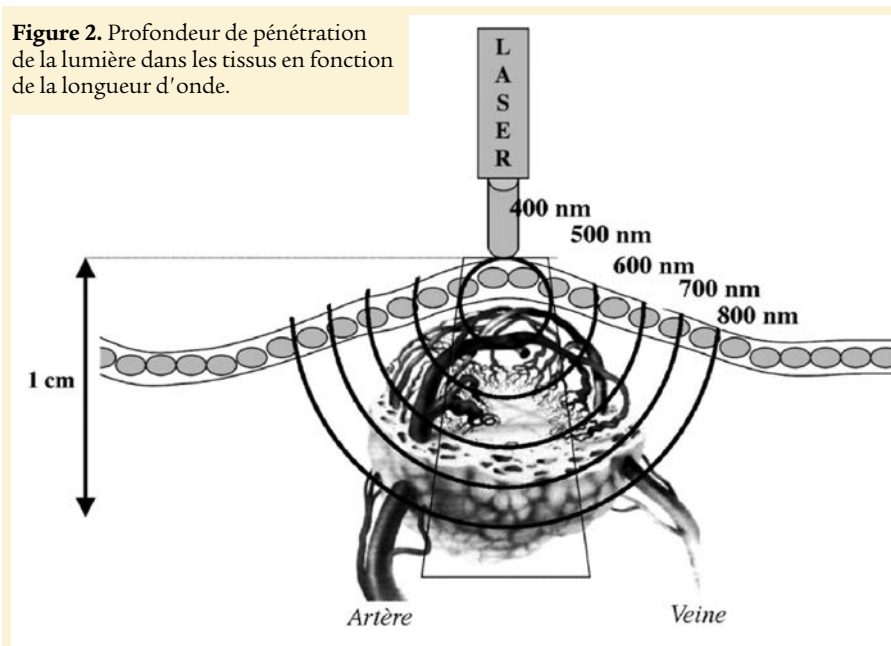
par Diamond, les développements les plus rationnels étant réalisés par Dougherty et son équipe (Buffalo, USA). C'est seulement aujourd'hui que de vraies perspectives semblent s'ouvrir à ce protocole thérapeutique très peu invasif [5].

Une irradiation sélective

Les principaux avantages de la PDT résident dans la relative sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales de la molécule photosensible et ses faibles effets secondaires. La lumière et le colorant sont dénués de toute toxicité

intrinsèque et seules les zones ayant accumulé le photosensibilisateur et recevant de la lumière subissent l'effet toxique. La rétention sélective du colorant par les cellules cancéreuses est réelle et, bien que le différentiel entre tissu sain et tissu cancéreux soit relativement limité, il est suffisant pour que l'effet cytotoxique se manifeste essentiellement sur les cellules malignes. La PDT est basée sur cette différence de concentration du photosensibilisateur entre les cellules saines et tumorales et sur l'irradiation sélective de la zone tumorale par une lumière visible (figure 1).

Figure 2. Profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde.



liée à l'âge). Les progrès considérables réalisés dans les domaines des sources lumineuses (lasers conventionnels, diodes lasers, fibres optiques et systèmes diffuseurs de lumière) ont donné à cette thérapie les moyens d'un fort développement pour le traitement d'affections localisées.

Les colorants naturellement présents dans les tissus humains, la mélanine, l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine et l'eau, absorbent les rayons lumineux en fonction de leur couleur. Il existe une zone où ces colorants n'absorbent que très peu, entre 650 et 1050 nm (zone rouge au proche infrarouge appelée fenêtre physiologique de transparence). Comme il est montré à la *figure 2*, la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus dépend de la couleur du faisceau lumineux d'excitation, ainsi la meilleure pénétration est obtenue entre 650 et 800 nm (rouge profond).

Les photosensibilisateurs

Limitation des composés actuellement en clinique

Le HpD ou le Photofrin® (fraction enrichie en principes actifs, issue du HpD) sont des mélanges complexes contenant plusieurs constituants, dont on ne connaît pas le véritable produit actif. Ces photosensibilisateurs se concentrent en partie dans la tumeur mais aussi dans les tissus riches en composants réticulo-endothéliaux. Les patients ayant reçu le HpD restent sensibles à la lumière ambiante pendant plusieurs semaines après l'injection. Ce phénomène est dû à une lente élimination du colorant des tissus sains, et en particulier de la peau induisant des dommages cellulaires pour ces tissus. La principale limitation de ces composés est leur spectre d'absorption de la lumière caractérisé par une bande très intense dans le bleu et quatre bandes de plus faible intensité (10 à 20 fois moins intenses) vers 500, 540, 570 et 630 nm, correspondant respectivement au vert, jaune puis rouge. Bien que l'absorption à 630 nm soit la plus faible, limitant fortement l'action photodynamique du colorant,

c'est elle qui est utilisée en PDT afin de permettre une excitation du colorant aussi profonde que possible dans les tissus, permettant l'éradication de tumeurs d'environ 5 à 6 mm.

Photosensibilisateurs utilisés en PDT

Un bon photosensibilisateur doit :

- être de structure chimique définie et de synthèse reproductible, transposable à une grande échelle avec un coût minimal,
- être non cytotoxique à l'obscurité, se concentrer préférentiellement dans les cellules tumorales et être éliminé rapidement des tissus sains pour ne pas générer d'effets secondaires préjudiciables au patient,
- posséder une photophysique compatible avec un fort rendement de formation de l'oxygène singulet. Il ne doit pas s'agréger dans le milieu cellulaire. L'agrégation des chromophores entraîne un transfert d'énergie entre les molécules en interaction conduisant à une forte diminution du rendement quantique de formation de l'état triplet et par conséquent du rendement quantique de formation de $^1\text{O}_2$,

- être stable vis-à-vis des enzymes circulantes et de la lumière d'irradiation afin d'atteindre les cellules tumorales cibles intactes et de ne pas être dégradé rapidement pendant l'illumination,
- posséder une forte absorption de la lumière rouge afin que l'effet thérapeutique de la PDT soit le plus profond possible.

Dérivés de seconde génération

Les photosensibilisateurs de seconde génération dont un cycle pyrrolique est réduit (Foscan® et Visudyne®) ont été développés afin de pallier les inconvénients inhérents au HpD. Ces molécules synthétiques, de structure chimique définie, possèdent un spectre d'absorption de la lumière optimisé permettant le traitement de tumeurs de taille plus importante, mais n'ont aucune sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales. Plusieurs composés ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (Foscan® et Visudyne®) ou sont en cours d'évaluation (mono-L-aspartyl-chlorine e_6 , -MACE-, N-aspartyl-chlorine e_6 -Npe $_6$ -, étiopurpurine d'étain -Purlytin- et Tookad®, voir *figure 3*).

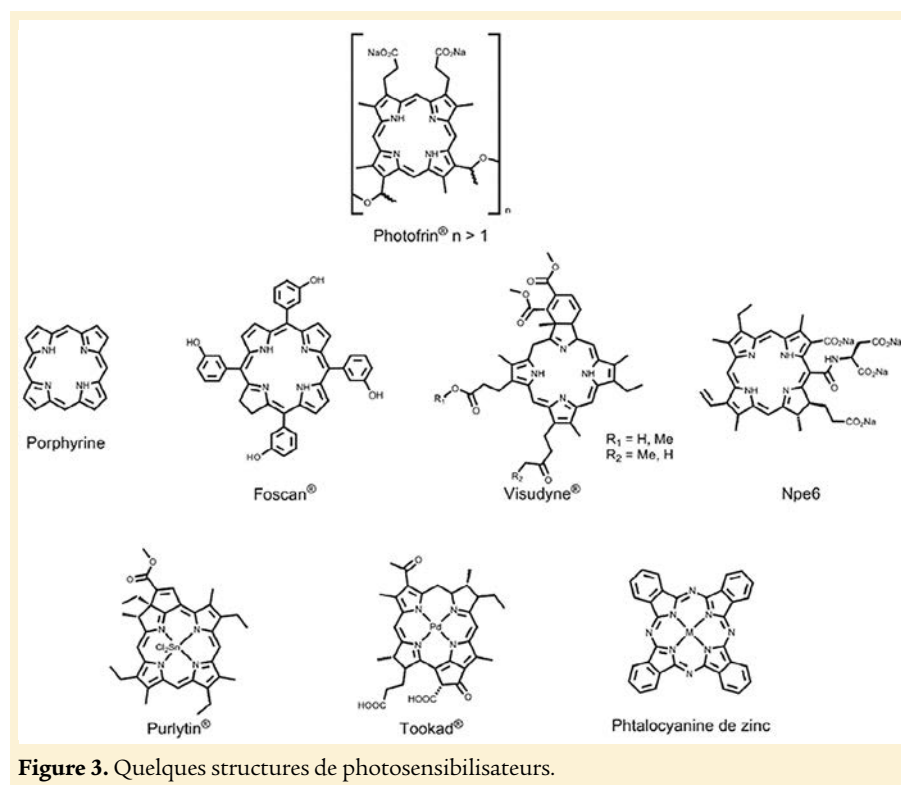


Figure 3. Quelques structures de photosensibilisateurs.

On peut classer, dans cette catégorie, les phtalocyanines, colorants de synthèse obtenus à partir de noyaux pyrroles condensés avec des cycles benzènes et possédant des ponts aza entre les unités pyrroliques (figure 3). Ces molécules absorbent très fortement la lumière entre 650 et 700 nm, peuvent facilement être métallées par le zinc ou le silicium, sont rendues solubles dans l'eau par greffage à leur périphérie de groupes sulfonés et n'ont qu'une faible affinité pour la peau. Les photosensibilisateurs de seconde génération les moins solubles dans l'eau peuvent être injectés sous forme liposomale comme par exemple la visudyne ou la phtalocyanine de zinc.

Photosensibilisateurs ciblés de troisième génération

Bien que relativement sélectifs pour les cellules tumorales, les photosensibilisateurs actuels sont peu spécifiques, ce qui est un facteur limitant pour la mise en œuvre d'une PDT efficace et sélective. En dépit de nombreuses années de recherche, très peu de photosensibilisateurs sélectifs ont été identifiés. Le cancer n'est pas une maladie unique mais une famille de maladies, caractérisées par une prolifération anarchique de cellules, chaque tumeur ayant ses propres caractéristiques. Plusieurs voies de recherche vers un photosensibilisateur dit vectorisé ont été développées faisant appel à un colorant sur lequel est fixé, souvent de façon covalente, une espèce chimique reconnue spécifiquement par un type de cellule tumorale [6].

En dépit de quelques résultats prometteurs, le ciblage par des anticorps ou immunociblage est encore peu utilisé en PDT. Mew *et al.* (Vancouver, British Columbia, Canada) ont été les premiers, en 1983, à mettre au point, avec succès, une molécule combinant le HpD avec un anticorps monoclonal. L'équipe de Vrouenreats (Amsterdam, Hollande) a décrit en 1999, la préparation d'un dérivé du Foscan® conjugué à un anticorps monoclonal. Ce couplage augmente l'activité photodynamique *in vitro*. Plusieurs autres systèmes de ciblage ont été décrits dans la littérature. Des transporteurs protéiques comme l'albumine et des

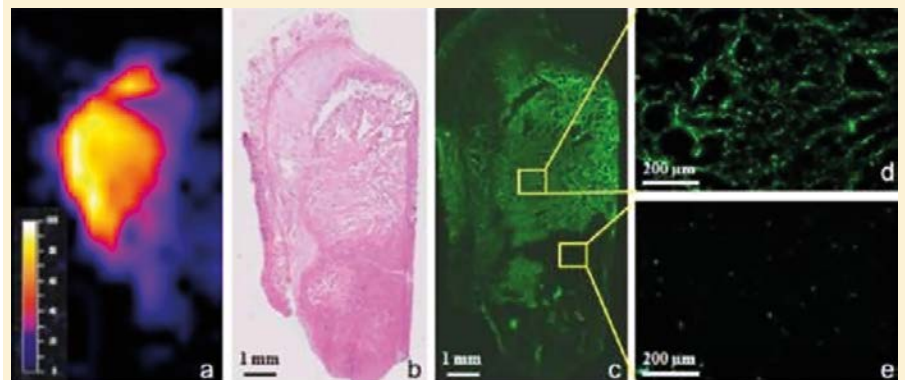
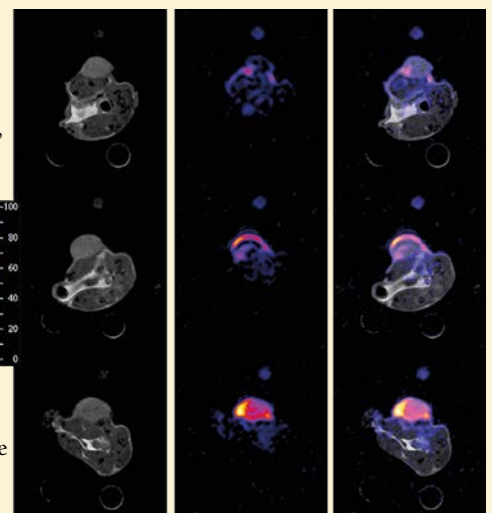
lipoprotéines (LDL) ont été conjugués à un photosensibilisateur. Des groupes chimiques, ligands de récepteurs membranaires de cellules tumorales, ont été utilisés comme « vecteur » de reconnaissance de tumeurs. La conjugaison de l'estradiol, de l'EGF (*epidermal growth factor* ou facteur de croissance épidermique), de l'insuline, ou d'un tripeptide de type RGD, avec un photosensibilisateur comme une porphyrine induit une augmentation nette de l'activité photodynamique.

Photosensibilisateurs glycoconjugués

Une façon de rendre le photosensibilisateur hydrophile ou hydrosoluble est de le « décorer » de motifs hydrophiles comme des sucres. L'hydrophilie du

photosensibilisateur est contrôlée par le nombre et le type de sucres fixés. Par ailleurs ceux-ci induisent une reconnaissance efficace du photosensibilisateur par les cellules tumorales surexprimant des récepteurs à sucre tels que des lectines [7]. Une porphyrine portant à sa périphérie trois groupes chimiques comportant des mannoses, conçue à l'Institut Curie, est reconnue par des cellules cancéreuses de rétinoblastome (maladie rare du jeune enfant) surexprimant, sur leurs membranes, des récepteurs spécifiques du mannose [8,9]. La fixation de ce sucre sur le photosensibilisateur augmente notablement son efficacité photodynamique que ce soit *in vitro* ou *in vivo* [10]. Actuellement cette molécule est en essai préclinique pour un traitement innovant

▷ **Figure 4.** Imagerie IRM du proton et du sodium d'un rétinoblastome avant et après PDT. À gauche : images proton (anatomiques), au centre : images correspondantes sodium (fonctionnelles), à droite : superposition images proton et sodium pour une meilleure visualisation de la tumeur sur les images sodium. En haut : avant PDT, au centre : 2 heures après PDT, en bas : 24 heures après PDT. Deux heures après PDT, on observe une augmentation de contenu en Na dans une zone superficielle en forme de croissant de lune de la tumeur, zone de pénétration de la lumière. 24 heures après cette zone est étendue à toute la tumeur indiquant une propagation de la mort cellulaire (effet bystander).



Δ **Figure 5.** Mise en évidence de l'apoptose induite 48 heures après le traitement de double ciblage par PDT d'une tumeur colorectale. Le contraste dans l'image sodium montre une importante teneur en sodium dans la majorité du volume imagé (a). La coloration H&E confirme les dommages cellulaires (b). Image par microscopie de fluorescence de la méthode TUNEL (c). La méthode TUNEL met en évidence la fragmentation du DNA (fluorescence verte) dans le tissu ayant subi des dommages (d) par comparaison avec les zones non-endommagées (e).

du rétinoblastome par PDT. L'intérêt d'un tel traitement non-mutagène réside dans ses faibles effets secondaires par une élimination très rapide du photosensibilisateur des cellules saines (inférieure à 48 heures), sa non-toxicité intrinsèque et sa forte activité photodynamique [11].

Perspectives

De nombreux photosensibilisateurs de seconde ou troisième génération sont publiés, mais très peu sont approuvés pour une utilisation clinique. Les développements les plus récents sont orientés vers la conception et l'étude

de photosensibilisateurs ciblés vers plusieurs cancers en fonction de leurs particularités biologiques. Un second axe de recherche, en plein essor, consiste à détruire sélectivement les néo-vaisseaux alimentant en nutriments la tumeur afin de l'éradiquer par manque de ressources énergétiques ou oxygénées.

Mise en évidence par IRM de l'effet de la PDT sur des tumeurs humaines hétérogreffées sur des souris

Nous avons évalué l'effet d'un traitement par PDT de tumeurs humaines hétérogreffées en sous-cutané sur des souris SCID ou nude à l'aide de l'imagerie IRM du proton et du sodium. L'IRM du proton permet d'avoir des informations morphologiques, anatomiques, tandis que l'IRM du sodium, mise au point par M. Lupu et J. Mispelter [22] et l'équipe de Ouwerkerk [23], donne des informations fonctionnelles. L'ion sodium (^{23}Na) est une sonde endogène idéale pour cartographier le compartiment extracellulaire et pour caractériser la densité cellulaire due au gradient de concentration du sodium existant entre le compartiment intracellulaire (15 mM) et le compartiment extracellulaire (150 mM). Le sodium est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques: intégrité membrane cellulaire, échanges: pompe Na/K, cotransporteur-ATPase, équilibre hydrique de l'organisme (ex.: équilibre hydroélectrolytique du rein, réabsorption de l'eau au niveau digestif...), mort cellulaire: apoptose, nécrose... Généralement les traitements antitumoraux induisent des changements dans la densité cellulaire et/ou la polarité membranaire. Les dommages comme la nécrose ou l'apoptose modifient le rapport des compartiments extracellulaires/intracellulaires ce qui augmente la concentration moyenne de Na dans la tumeur. Ce changement est décelable sur les images IRM où les régions de forte concentration en Na se caractérisent par une forte brillance. Les dommages induits par la PDT sont strictement liés à la localisation du PS pendant l'illumination, deux protocoles de traitement ont ainsi été testés dans le but d'optimiser l'efficacité PDT. Le premier protocole cible

le système vasculaire tumoral. Pour cela, la souris reçoit une dose de PS en intraveineux suivie par l'illumination. La majorité du PS est présente dans le système vasculaire et l'effet PDT est antiangiogénique. Le second protocole cible à la fois les cellules tumorales et les cellules endothéliales. La première dose de PS injectée en i.v. (0,6 mg/kg) est suivie, après 3 heures, d'une deuxième injection de PS (0,3 mg/kg). Le délai entre les deux injections permet à la première dose de pénétrer dans les cellules tumorales, la seconde restant localisée dans le système vasculaire. L'illumination cible conjointement les cellules tumorales et le système vasculaire.

L'illumination est réalisée avec un laser argon (à une longueur d'onde de 640 nm (lumière rouge)) en doses fractionnées, permettant la réoxygénation de la tumeur pendant la phase de non-illumination. La durée totale d'illumination est déterminée par les dimensions de la tumeur. Le protocole de double ciblage vasculaire et cellulaire a permis de mettre en évidence un effet thérapeutique en deux étapes. Dans un premier temps, la mort cellulaire apparaît très rapidement (à l'échelle de l'heure), dans une couche superficielle du tissu, correspondant à la pénétration de la lumière. Au cours des heures suivantes, on observe une « propagation » de la mort cellulaire au-delà de la zone de pénétration de la lumière dans la tumeur (apoptose ou nécrose) pouvant résulter d'une signalisation de cellule à cellule (effet bystander). Cet effet pourrait être favorisé par une forte densité cellulaire, ce qui a été effectivement observé sur une souche de rétinoblastome particulièrement dense comme le montrent les images en

sodium (figure 4) [24]. L'activation du PS avec la lumière rouge permet une induction de la mort cellulaire dans tout le volume de la tumeur, après le second traitement à 4 jours, et en utilisant le protocole de double ciblage (figure 5). Ces résultats suggèrent que le déclenchement d'un effet de voisinage est dépendant de la densité cellulaire du tissu. Dans un tissu à forte densité cellulaire, la contamination apoptotique est efficace. Au contraire, dans les tissus moins denses, cet effet est moins efficace, mais il semble qu'un seuil doive être atteint pour que l'envahissement de la tumeur puisse être déclenché.

Une étude sur des tumeurs colorectales a permis de montrer que le traitement de « double ciblage », activé en lumière rouge, et répété, induit une nécrose massive responsable de la diminution de la charge tumorale, grâce au déclenchement du processus de voisinage conduisant à une mort cellulaire, même pour des tissus de densité cellulaire faible [25].

Une étude sur trois lignées tumorales de rétinoblastomes humains a montré l'importance de la densité cellulaire dans la réponse au traitement par PDT. Après étude histologique, nous n'observons pas de différence notable de taille des cellules entre les trois lignées tumorales mais leur densité diffère et confirme les résultats obtenus par IRM du sodium, à savoir la lignée Rb111 est plus dense que la lignée RB102 qui elle-même est plus dense que la lignée Rb200. Ce résultat peut être mis en parallèle avec l'effet bystander, en d'autres termes plus la densité cellulaire tumorale est élevée, plus l'effet bystander est important. Ainsi plus la tumeur est dense, plus le premier traitement par PDT est efficace [11].



Un second axe de recherche, en plein essor, consiste à détruire sélectivement les néo-vaisseaux alimentant en nutriments la tumeur afin de l'éradiquer par manque de ressources énergétiques ou oxygénées »

C. Frochot et son équipe développent, à Nancy, des photosensibilisateurs ciblant les vaisseaux angiogéniques tumoraux par l'intermédiaire d'une interaction spécifique entre un peptide fixé sur le photosensibilisateur et la neuropiline surexprimée par les cellules endothéliales des néo-vaisseaux [12]. La PDT induit alors une thrombose des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur et par conséquent sa destruction.

Une nouvelle voie très prometteuse est l'utilisation de l'effet EPR (effet de perméabilité et de rétention tissulaire) [13,14]. Les particules de petites tailles de diamètre intermédiaire entre celui des virus et celui des bactéries, comme les liposomes, les nanoparticules, sont internalisées par les cellules tumorales. Ce phénomène est lié au développement de nouveaux vaisseaux sanguins lors de la croissance tumorale. Ces néo-vaisseaux sont différents des vaisseaux sanguins normaux et permettent le passage de molécules ou d'espèces de taille comprise entre 10 et 200 nm vers la tumeur. Il est aussi possible d'adjoindre, à cet effet passif, un second effet de vectorisation active par « décoration » de la surface de la nanoparticule par une espèce chimique reconnue par un récepteur surexprimé à la surface de la cellule tumorale, créant ainsi un phénomène de synergie [15]. Nous avons développé, avec plusieurs équipes de l'université de Montpellier, des nanoparticules mésoporeuses de silice ou de silicium chargées en photosensibilisateur et portant à leur surface des sites de reconnaissance moléculaire. Ces espèces sont de très bons photosensibilisateurs très sélectifs par exemple des cellules du cancer de la prostate ou du rétinoblastome [16-18].

Grâce aux lasers à impulsions ultra-brèves, des intensités lumineuses considérables brièvement imposées à

la matière déclenchent des effets non linéaires (non proportionnels à l'intensité excitatrice). Ces effets efficaces uniquement au point focal du faisceau permettent l'excitation du photosensibilisateur par absorption à deux photons. Il devient possible de diriger un faisceau proche infrarouge très pénétrant (quelques cm) en un point de quelques centaines de micromètres ouvrant la voie à une photothérapie à deux photons, profonde et très localisée. Mais actuellement peu de photosensibilisateurs de ce type sont développés. Une optimisation de la structure moléculaire est nécessaire pour obtenir un effet d'absorption non linéaire. Plusieurs familles de photosensibilisateurs à absorption biphotonique ont été développées au laboratoire. Ces molécules sont efficacement excitées par un laser femtoseconde déclenchant l'effet non linéaire souhaité ce qui permet d'envisager une PDT à deux photons [19,20].

Les mécanismes réels mis en jeu lors de la photothérapie ne sont actuellement que partiellement compris ce qui freine le développement de molécules plus efficaces et plus sélectives. Le cancer n'étant pas une maladie unique mais plutôt un ensemble de maladies, il semble très difficile de concevoir un photosensibilisateur ciblé unique et universel. Une voie très récente, représentant une approche alternative à la PDT conventionnelle, est basée sur une excitation de l'oxygène présent dans toutes les cellules, par un laser émettant à 1270 nm, permettant de produire l'oxygène singulet dans les cellules illuminées sans photosensibilisant. Il a été montré que cette production d'oxygène singulet est suffisante pour assurer la mort de cellules cancéreuses du sein [21].

RÉFÉRENCES

- [1] G. Obaid *et al.*, *Nanoscale* **8**, 12471-12503 (2016).
- [2] I. Yoon *et al.*, *Clin. Endosc.* **46**, 7-23 (2013).
- [3] A. Master *et al.*, *J. Controlled Release* **168**, 88-102 (2013).
- [4] H. Stepp, *Acta Endoscopica* **33**, 493-509 (2003).
- [5] D. Dolmans *et al.*, *The Lancet Oncol.* **5**, 497-508 (2004).
- [6] M. Lupu *et al.*, in *Handbook of Porphyrin Science with Applications to Chemistry, Physics, Material Science, Engineering, Biology and Medicine*, K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, Eds. World Scientific Publishing, Singapore, vol. 39, 171-356 (2016).
- [7] S. Ballut *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **10**, 4485-4495 (2012).
- [8] A. Makky *et al.*, *BBA Biomembranes* **1818**, 2831-2838 (2012).
- [9] A. Gallud *et al.*, *RSC Advances* **5**, 75167-75172 (2015).
- [10] I. Aerts *et al.*, *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **7**, 275-283 (2010).
- [11] C.D. Thomas *et al.*, *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **12**, 267-275 (2015).
- [12] N. Thomas *et al.*, *Biochem. Pharm.* **80**, 226-235 (2010).
- [13] H. Maeda *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 71-79 (2013).
- [14] <http://books.openedition.org/cdf/237?lang=fr>
- [15] H. Benachour *et al.*, *Theranostics* **2**, 889-904 (2012).
- [16] M. Gary-Bobo *et al.*, *Int. J. Pharm.* **432**, 99-104 (2012).
- [17] A. Gallud *et al.*, *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2013**, 4:4, open-access, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9570.1000288>.
- [18] O. Vaillant *et al.*, *Angew. Chem. Ed. Engl.* **54**, 5952-5956 (2015).
- [19] S. Achelle *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* 1271-1279 (2011).
- [20] G. Garcia *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 153-165 (2013).
- [21] F. Anquez *et al.*, *Photochem. Photobiol.* **88**, 167-174 (2012).
- [22] M. Lupu *et al.*, *Biochimie* **85**, 849-861 (2003).
- [23] R. Ouwerkerk, R.R. Regatte (Ed.), *NMR Biomed.* **29**, 91-215 (2016).
- [24] M. Lupu *et al.*, *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **6**, 21-220, 2009.
- [25] F. Poyer *et al.*, *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **9**, 303-309, 2012.