



**HAL**  
open science

# **Evaluation de la thérapie photodynamique comme stratégie antimicrobienne dans le cadre des infections bronchopulmonaires chez les patients atteints de la mucoviscidose**

Raphaëlle Youf

## **► To cite this version:**

Raphaëlle Youf. Evaluation de la thérapie photodynamique comme stratégie antimicrobienne dans le cadre des infections bronchopulmonaires chez les patients atteints de la mucoviscidose. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. <NNT : 2022BRES0098>. <tel-04933053>

**HAL Id: tel-04933053**

**<https://theses.hal.science/tel-04933053v1>**

Submitted on 6 Feb 2025

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

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



HAL Authorization

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : *Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine, Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et Biomatériaux*

Par

**Raphaëlle YOUF**

**Evaluation de la thérapie photodynamique comme stratégie antimicrobienne dans le cadre des infections bronchopulmonaires retrouvées chez les patients atteints de la mucoviscidose**

Thèse présentée et soutenue à Brest, le Lundi 05 décembre 2022

Unité de recherche : UMR 1078 Génétique, Génomique Fonctionnelle et Biotechnologies

## Rapporteurs avant soutenance :

Vincent SOL	Professeur des universités, Laboratoire PEIRENE, UR 22722 (Limoges)
Victoire DE LASTOURS	Professeur des universités-praticien hospitalier, Laboratoire UMR 1137 INSERM (Paris)

## Composition du Jury :

Président :	Vincent SOL	Professeur des universités, Laboratoire PEIRENE, UR 22722 (Limoges)
Rapporteurs :	Vincent SOL	Professeur des universités, Laboratoire PEIRENE, UR 22722 (Limoges)
	Victoire DE LASTOURS	Professeur des universités-praticien hospitalier, Laboratoire UMR 1137 INSERM (Paris)
Examineurs :	Stéphanie LEROY-LHEZ	Maître de conférences, Laboratoire PEIRENE, UR 22722 (Limoges)
	Yannick FLEURY	Maître de conférences, Laboratoire LBCM (Quimper)
Dir. de thèse :	Tony LE GALL	Chargé de recherche, Laboratoire UMR 1078 INSERM (Brest)

## Invité :

Tristan MONTIER	Professeur des universités-praticien hospitalier, Laboratoire UMR 1078 INSERM (Brest)
-----------------	--



*All we have to decide is what to do with the time that is given us.*

*LOTR*

*A ma sœur*



# REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) pour le financement de ces trois ans de thèse.

Je remercie également les associations Gaétan Saleün et Vaincre la Mucoviscidose, ainsi que la Région Bretagne, qui ont participé au financement de la thèse. Merci à l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) qui a soutenu mes travaux dans le cadre du projet « TARGET-THERAPY ».

Je remercie Docteur Emmanuelle GENIN, directrice de l'UMR INSERM 1078, de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche.

Je remercie sincèrement les Rapporteurs de mon jury, Professeur Victoire DE LASTOURS et Professeur Vincent SOL, d'avoir accepté de juger ce travail ainsi que pour le temps consacré à son évaluation. Je tiens à remercier également les Examineurs de ce jury, Docteur Stéphanie LEROY-LHEZ et Docteur Yannick FLEURY, d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de mon jury de thèse.

Merci également aux membres de mon Comité de Suivi Individuel (CSI), Professeur Lhousseine TOUQUI et Docteur Frédéric TEWES, pour leurs précieux conseils pendant ces trois années. Je vous remercie sincèrement.

Je remercie le Professeur Pierre LEHN pour ces discussions qui ont développé ma curiosité et enrichi mes connaissances.

Je tiens sincèrement à remercier le Professeur Tristan MONTIER pour m'avoir accueilli dans son équipe. Vos conseils, votre écoute et votre confiance m'ont permis d'avancer. Je tiens à vous remercier pour ce que vous avez fait pour moi.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Docteur Tony LE GALL, de m'avoir encadré pendant ces trois années. Merci pour tes conseils et ta confiance. Grâce à toi, j'ai développé une autonomie, une rigueur et une réflexion scientifique qui me seront très précieuses pour la suite.

Je remercie chaleureusement les trois personnes qui suivent pour les bons moments, au travail, comme ailleurs, et pour leur soutien inégalable. Merci à toi Rosy, alias Dr<sup>2</sup>Ghanem, pour tout ce que tu as fait pour moi. Tes conseils, ton soutien, ta bonne humeur, je ne saurais combien te remercier. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, « Vainqueur » ! Merci à Tanguy, qui toi aussi, a donné beaucoup pour moi pendant ces trois ans. Dans les bons comme dans les mauvais moments, on a tous besoin d'une petite perruche avec soi. Envole-toi, tu feras un Prof incroyable ! Merci à Yann, pour ton soutien irréprochable, ton brin de folie et ton sens de l'humour dont on ne se lasse pas. À vous tous, vous m'avez fait aimer la Bretagne... et les Bretons.

Merci à Alexis, pour ton aide en toutes circonstances, ta loyauté et ta générosité font de toi une belle personne. Bon courage pour la suite ! Merci à Manh, pour ces discussions scientifiques et autres, j'ai hâte qu'on se retrouve autour d'un(de) mojito(s) ! Merci à Xavier, pour ces bons moments, les cookies, les discussions scientifiques, et pour le super festivalier que tu fais ! ;).

Merci à Nath et Pascal pour leur bonne humeur. Travailler avec vous est toujours un vrai plaisir. Merci à tous les autres membres de l'équipe GTCA avec qui j'ai eu la chance d'évoluer. Merci à mes stagiaires, Alizé, Adeline et Hoël pour leurs investissements pendant leur stage. J'ai passé de bons moments avec chacun d'entre vous. Bonne chance à tous pour la suite !

Un grand merci « aux meilleurs », Hugo et Raph, pour la science mais surtout pour le reste. Vous m'avez soutenue dans les pires moments et accompagnée dans les meilleurs. Le perudo n'a qu'à bien se tenir ! Merci également à cette fameuse fine équipe de doctorants, avec qui les week-ends et les soirées n'ont pas manquées.

Merci au Professeur Gilles LEMERCIER pour ces qualités professionnelles et humaines. J'ai aimé les moments passés ensemble, toujours avec humour et bonne humeur.

I would like to thank our research associates from the "Universität Siegen", Professor Holger SHÖNHERR, Doctor Mareike MÜLLER and Professor Ulrich JONAS, for our relevant scientific findings but also for the great times we had. Thank you, Kawal, Max and Ali, it was a pleasure to meet you and share good moments between seafoods and science. Hope to see you again during future trips in Germany!

Je remercie les membres des équipes du Professeur Paul-Alain JAFFRES (COSM, UMR CNRS 6521), du Professeur Claire HELLIO (Plateforme BIODIMAR, UMR LEMAR 6539) et du Professeur Pascal MARCORELLES (service Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU Morvan) pour leur collaboration et les discussions scientifiques pertinentes.

Je remercie également les membres du département de microbiologie de l'Hôpital d'Instructions des Armées (HIA) de Percy (Professeurs Céline RAGOT, Marine DESROCHES, Christine BERNARD, et Philippe VEST) pour leur collaboration.

Merci à mes amis Normands (d'un temps et de toujours), je ne serais vous dire à quel point je suis touchée quand vous venez me voir à l'autre bout du pays ! (Oui, c'est loin). Car oui, vous avez bravé des tempêtes pour venir aussi souvent que vous avez pu. Vous m'avez tous beaucoup manqué. Ces précieux moments partagés ont été de réels bols d'air frais pendant ces trois ans. Merci à mes amis Parisiens, avec qui les retrouvailles et les moments passés ensemble sont toujours aussi intenses.

Merci à mes éternels (ou presque) colloqs de rêve, ma Glou, mon Zab. J'ai eu une chance incroyable de vous avoir, jamais je n'aurais tenu le coup sans vous ! Vivre avec vous pendant ces trois années a été un réel plaisir au quotidien.

Merci à ma famille, qui s'avère être la meilleure ! Merci à mes parents et mon papy, qui m'ont toujours donné la liberté de vivre à travers mes passions, et pour qui je suis très fière d'avoir fait cette thèse. Merci pour votre soutien pendant toutes ces années. Merci à ma sœur, mon beau-frère et mes neveux, avec qui je compte bien rattraper les bons moments que je n'ai pas eu l'occasion de pouvoir partager avec eux pendant ces trois années. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Merci à toute ma famille, que j'ai hâte de retrouver. À ma Nalouche, incontournable aventurière de caractère et dormeuse à plein temps.

Merci à toi, danseur de claquettes, pour chaque moment passé à tes côtés et pour ton talent à me supporter quotidiennement. Merci pour ce que tu es.



# TABLE DES MATIERES

---

TABLE DES MATIERES .....	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS .....	11
LISTE DES ABREVIATIONS .....	13
BILAN DES TRAVAUX.....	17
PREAMBULE .....	21
INTRODUCTION.....	23
I. La thérapie photodynamique .....	23
1. Principes et généralités des thérapies basées sur la lumière .....	23
1.1. Historique .....	23
1.2. Modernisation de la photothérapie.....	25
1.3. Photosensibilisateurs (PS) et propriétés photophysiques.....	27
1.4. Sources lumineuses .....	29
2. Applications de la thérapie photodynamique.....	32
2.1. Applications anticancéreuses.....	32
2.2. Applications immunomodulatrices .....	35
2.3. Applications antimicrobiennes.....	36
3. Avantages et limites principales de la PDT .....	94
3.1. Phototoxicité.....	94
3.2. Voies d'administration du PS.....	95
3.3. Voies d'administration de la lumière .....	95
3.4. Etudes pré-cliniques.....	96
3.5. Critères cliniques .....	96
II. Les infections bronchopulmonaires : la mucoviscidose prise comme maladie cible et modèle d'étude .....	100
1. Généralités.....	100
1.1. Fonctions respiratoires chez un individu sain.....	101
1.2. Infections respiratoires basses .....	102
2. La Mucoviscidose .....	103
2.1. Généralités.....	103
2.2. Environnement pulmonaire.....	105
2.3. Infections respiratoires.....	106

2.4. Diagnostics et traitements actuels .....	111
2.5. Emergence de nouveaux traitements.....	116
2.6. Voies d'administrations alternatives .....	117
III. Potentielle application de la PDT comme stratégie antimicrobienne dans le cadre de la Mucoviscidose.....	125
1. PDT et pathogènes pulmonaires .....	125
1.1. Action contre les bactéries d'intérêt.....	125
1.2. Action contre les autres pathogènes .....	126
2. L'application de PS dans les voies pulmonaire .....	127
2.1. Administration du PS .....	127
2.2. Compatibilité physiologique .....	128
3. Délivrance de la source lumineuse .....	130
4. Evaluation <i>in vivo</i> .....	132
RESULTATS .....	134
I. Evaluation de complexes de Ruthénium(II) comme agents antiinfectieux dans le cadre des infections bronchopulmonaires.....	134
1. Pertinence de la PDT dans le contexte physiopathologique.....	134
1.1. Impact des conditions physiologiques et microbiologiques .....	134
1.2. Diffusion à travers le mucus et le biofilm .....	160
2. Du modèle <i>in vitro</i> au modèle <i>in vivo</i> .....	179
II. Stratégies combinatoires à la PDT antimicrobienne.....	191
1. PDT antimicrobienne et antibiothérapie .....	191
2. PDT antimicrobienne et thérapie génique .....	200
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	218
I. Remise en contexte du sujet.....	218
II. Synthèse des travaux réalisés.....	218
III. Complexification du modèle d'étude .....	219
IV. Autres intérêts de la PDT dans la Mucoviscidose .....	222
CONCLUSION .....	225
BIBLIOGRAPHIE .....	227

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

---

## *Figures*

Figure 1. Photothérapie dans l'Égypte ancienne.....	24
Figure 2. Contribution des travaux du Dr Finsen sur la photothérapie.....	25
Figure 3. Représentation simplifiée d'un diagramme de Jablonski décrivant les mécanismes photochimiques et photophysiques menant à la production de ROS.....	26
Figure 4. Exemples de PS de 1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> générations utilisés en PDT.....	28
Figure 5. Schématisation des propriétés optiques des tissus biologiques.....	30
Figure 6. Découverte des antimicrobiens de type antibiotiques et PS au cours du XX <sup>ème</sup> siècle.....	37
Figure 7. Anatomie des voies respiratoires, de la trachée aux alvéoles.....	100
Figure 8. Schématisation des mécanismes de défense de l'hôte au niveau pulmonaire.....	101
Figure 9. Les différentes IRB chez l'Homme.....	102
Figure 10. Répartition géographique des nouveaux nés atteints de mucoviscidose dans le monde.....	104
Figure 11. Catégorisation des différentes classes de mutations (de I à VI) du gène <i>CFTR</i> .....	105
Figure 12. Répartition des principales espèces bactériennes responsables d'infections respiratoires chez les patients CF en fonction de leur âge.....	107
Figure 13. Les différentes étapes et acteurs participant à la formation de biofilm chez <i>S. aureus</i> .....	108
Figure 14. Régulation des facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i> dans l'environnement pulmonaire.....	109
Figure 15. Algorithme de dépistage clinique utilisé chez les patients CF permettant la mise en place du diagnostic clinique. ....	111
Figure 16. Vue d'ensemble sur les différentes catégories de molécules thérapeutiques en cours de développement clinique ou actuellement utilisés chez les patients CF .....	115
Figure 17. Présentation schématique des stratégies émergentes de « médecine génomique » visant la restaurer l'activité de la protéine CFTR .....	118
Figure 18. Mécanismes d'assimilation des particules aérosolisées en fonction de la taille des microgouttelettes formées.....	119
Figure 19. Processus d'aérosolisation selon différents systèmes.....	120
Figure 20. Principales limites physiologiques observées dans le cadre d'une administration pulmonaire d'agents thérapeutiques par aérosolisation chez les patients CF. (Biorender®) .....	121

Figure 21. Nébuliseurs utilisés pour l'aérosolisation de PS .....	128
Figure 22. Exemple de dispositif (Cellule de Franz) permettant d'étudier la diffusion de molécules thérapeutiques à travers une couche de mucus .....	128
Figure 23. Différents systèmes de couplage de fibres optiques utilisés pour des applications de PDT .....	131
Figure 24. Différents systèmes de fibres optiques existants permettant la réalisation d'une PDT dans les poumons.....	131
Figure 25. Principes du de "checkerboard testing" couramment employé pour évaluer les synergies entre deux antibiotiques donnés.....	194
Figure 26. Cinétiques de croissance (sur 20-24h) des souches <i>S. aureus</i> (RN4220 et N315) et <i>P. aeruginosa</i> (Pa19 et PaH) après le « Checkboard Assay».....	195
Figure 27. Exemple de des temps de virage (h) obtenus à la suite d'un « checkboard assay » avec <i>S. aureus</i> RN4220. ....	196
Figure 28. Evaluation des [Ru(II)]1 et 2 à garder leur phototoxicité .....	198
Figure 29. Evaluation de l'index de croissance (IC) après 8 cycles consécutifs de PDT contre les quatre souches d'intérêt .....	199
Figure 30. Mise au point d'une intubation trachéale avec une fibre optique (Evosens (R)) chez la souris. ....	222

## *Tables*

Table 1. Propriétés des différentes sources lumineuses utilisées classiquement en PDT ..	32
Table 2. Exemple de différents essais précliniques de PDT non-antimicrobienne .....	97
Table 3. Les différents paramètres physico-chimiques de l'ASL retrouvés chez les individus sains versus chez les patients CF.....	106
Table 4. Liste des différents antibiotiques les plus couramment utilisés chez les patients CF en fonction du(es) pathogène(s) respiratoire(s) retrouvé(s).....	113
Table 5. Les différents antibiotiques formulés et utilisés sous forme d'aérosol mis sur le marché.....	122
Table 6. Liste des espèces microbiennes d'intérêt* ayant déjà fait l'objet d'étude de PDT .....	126
Table 7. Exemples d'études utilisant la PDT pour traiter des pathologies pulmonaires ...	132
Table 8. Datas bibliographiques reprenant les combinaisons Antibiotiques - PDT antimicrobiennes réalisées sur des espèces d'intérêt .....	193

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

## – A –

**ABA** : « Allergic bronchopulmonary aspergillosis »

**ADN (ou DNA)** : Acide désoxyribonucléique

**ADNp (ou pDNA)** : ADN plasmidique

**AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdien

**ANR** : Agence nationale de la recherche

**ANSES** : Agence nationale de sécurité alimentaire, de l'environnement et de la santé

**ARN (ou RNA)** : Acide ribonucléique

**ASL** : « Airway surface liquid »

**ASM** : « Artificial sputum medium »

**ATP** : Adénosine triphosphate

## – B –

**Bcc** : *Burkholderia Cepacia Complex*

**BET** : Bromure d'éthidium

**BPCO (ou COPD)** : Bronchopneumopathie chronique obstructive

**BSV** : « Brest synthetic vector »

## – C –

**CBC** : Carcinome basocellulaire

**CBNPC** : Cancers bronchiques non à petites cellules

**CD** : Cellules dendritiques

**CETEC** : carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

**CF** : « Cystic fibrosis » (Mucoviscidose)

**CFTR** : « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator »

**CIP** : Ciprofloxacine

**CMB (ou MBC)** : Concentration minimale bactéricide

**CMI (ou MIC)** : Concentration minimale inhibitrice

**CPM** : Concentration photobactéricide minimale

**CRISPR-Cas** : « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated protein »

## – D –

**DCFH-DA** : Diacetyldichlorofluorescein

**DMEM** : Milieu Eagle modifié Dulbecco

**DO** : Densité optique

## – E –

**E. coli (E. c)** : *Escherichia coli*

**eDNA** : ADN extracellulaire

**EMA** : Agence européenne des médicaments

**EMB** : Espèces réactives de l'oxygène

**EMEM** : Milieu Essentiel Minimum Eagle

**ENaC** : « Epithelial Na<sup>+</sup> channel »

## – F –

**FDA** : Food and drug administration

**FQ** : Fluoroquinolones

## – G –

**GEMM** : Modèle murin génétiquement modifié

## – I –

**ICG** : Indocyanine green (ou vert d'indocyanine)

**IR** : Infrarouges

**IRB** : Infections respiratoires basses

## – K –

**kb** : Kilobases

**kDa** : KiloDaltons

## – L –

**LB** : Luria Bertani

**LD50** : Dose létale médiane

**LED** : « Light-emitting diode »

**LPS** : Lipopolysaccharide

– M –

**MAL** : Aminolévulinate de méthyle

**MB** : Methylene Blue (ou bleu de méthylène)

**MDR** : « Multi-drug resistant »

**MEC** : Matrice extracellulaire

**MSSA** : *S. aureus* sensible à la méthicilline

**MRSA** : *S. aureus* résistante à la méthicilline

– N –

**NAC** : N-acétyl cystéine

**NBD** : « Nucleotide binding domain »

– O –

**ORF** : « Open reading frame »

**ON** : Oxyde nitrique

– P –

***P. aeruginosa* (P. a)**: *Pseudomonas aeruginosa*

**PAMP** : « Pathogen associated molecular pattern »

**PBM** : Photobiomodulation

**PDT** : Photodynamic therapy

**PEG** : Polyéthylène glycol

**PEI** : Polyéthylèneimine

**pK (A ou C)** : Protéine kinase

**PLA** : Acide polylactique

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

**PLL** : Poly-L-lysine

**PNN** : Polynucléaire neutrophile

**PS** : Photosensibilisateur

**PSL** : « Pericilliary surface layer »

– Q –

**QS** : Quorum sensing

– R –

**RC (ou CR)** : Rapport de charges

**rhDNase** : « Recombinant human deoxyribonuclease »

**RLU** : « Relative light unit »

**RMN (ou NMR)** : Résonance magnétique nucléaire

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

**RPM** : Rotation par minute

– S –

***S. aureus* (S. a)** : *Staphylococcus aureus*

**SARM (ou MRSA)** : *S.aureus* résistant à la méthicilline

***S. maltophilia*** : *Stenotrophomonas maltophilia*

**SOSG** : Singlet oxygen Green Sensor

**SVF** : Sérum de Veau Foetal

– T –

**TALEN** : « Transcription activator-like effector nuclease »

**TBE** : Tris, Borate, EDTA

**THPC** : 5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxy-phenyl)chlorin

**THPP** : 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxy-phenyl)porphyrin

**TIP, TIS et TOBI** : Solutions inhalables de tobramycine

**TMP** : Tetra(N-méthyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate

– U –

**UMR** : Unité Mixte de Recherche

**UTR** : « Untranslated Transcribed Region

**UV** : Ultraviolets

– V –

**VEMS (ou FEV<sub>1</sub>)** : Volume expiratoire maximal par seconde

**VRS** : Virus respiratoire syncytiale

– Z –

**ZFN** : « Zinc-finger nuclease » .

– 1 à 9 –

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet

**5-ALA** : Acide 5-aminolévulinique

## *Nota Bene*

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été menés au laboratoire UMR INSERM 1078 Génétique, Génomique et Biotechnologies (GGB), dans l'équipe « Gene Transfer and Combined therapeutic Approachs » (GTCA) dirigée par le Pr. Tristan Montier sous la direction du Dr Tony Le Gall. Dans cette équipe, les thérapies à visée curative et antimicrobienne associées à la Mucoviscidose font partie des principaux sujets d'étude.

Le manuscrit est rédigé en différentes sections selon le plan suivant : Introduction, Résultats, Discussion & perspectives et Conclusion. À noter toutefois qu'il n'y a pas de section « Matériels et Méthodes » car, dans la section « Résultats », chaque partie contient un matériels et méthodes et est associée à des références qui leur sont propres.

La plupart des figures/tableaux ont été repris d'après les données de la littérature. La mention « D'après » fait référence aux figures qui ont été traduites et retravaillées. Les figures ne présentant pas cette mention sont des figures originales, réalisées au moyen des logiciels Microsoft Powerpoint©, BioRender, Microsoft Excel©, Chemdraw© et Prism 7©.

Dans ce travail, il est important de distinguer le modèle d'étude, les infections bronchopulmonaires, et la pathologie dans laquelle elles sont étudiées, la Mucoviscidose. La thérapie photodynamique (PDT) et la Mucoviscidose sont deux thématiques dont les ressources bibliographiques sont très denses. Ce travail est réalisé sans la prétention de vouloir lister de manière exhaustive les travaux associés à ces deux sujets.

Le terme « complexe du Ruthénium » est abrégé sous l'appellation suivante « [Ru(II)] ». Dans la littérature, l'utilisation d'un « photosensibilisateur » (PS) appliqué dans le cadre d'une PDT est souvent mentionnée sous l'appellation suivante : « PS-PDT ». Cette même dénomination sera employée dans le présent document.

Note de confidentialité et diffusion : ce mémoire présente plusieurs parties rédigées sous forme de manuscrits en préparation et destinées à être publiés dans des journaux à comité de lecture. À ce titre, afin d'éviter tous problèmes de publication, ce mémoire ne devra pas être diffusé par l'université ou un tiers avant que les dits manuscrits n'aient été publiés.



# BILAN DES TRAVAUX

---

## PUBLICATIONS

### *Publications parues :*

- Youf, R., Müller, M., Balasini, A., Thétiot, F., Müller, M., Hascoët, A., Jonas, U., Schönherr, H., Lemerrier, G., Montier, T., & Le Gall, T. (2021). Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics*, 13(12), 1995. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13121995>

*Cf Section Introduction, Partie I, 2.3.*

- Youf, R., Nasir, A., Müller, M., Thétiot, F., Haute, T., Ghanem, R., Jonas, U., Schönherr, H., Lemerrier, G., Montier, T., & Le Gall, T. (2022). Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. *Pharmaceutics*, 14(8), 1664. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081664>

*Cf Section Résultats, Partie I, 1.1.*

- Delannoy, S., Hoffer, C., Youf, R., Dauvergne, E., Webb, H. E., Brauge, T., Tran, M. L., Midelet, G., Granier, S. A., Haenni, M., Fach, P., & Brisabois, A. (2022). High Throughput Screening of Antimicrobial Resistance Genes in Gram-Negative Seafood Bacteria. *Microorganisms*, 10(6), 1225. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061225>

### *Publications en cours de soumissions :*

- Youf, R., et al. Impact of extracellular matrix occurring in cystic fibrosis lung airways on antimicrobial photodynamic therapy: proof of concept using Ruthenium(II) polypyridyl complexes.

*Cf Section Résultats, Partie I, 1.2.*

- Youf, R., et al. Click Chemistry Functionalized Cationic Amphiphiles: Interest for Multimodal Applications Including Eukaryotic Cell Transfection and Antimicrobial Photodynamic Inactivation.

*Cf Section Résultats, Partie II, 1.2.*

- Ghanem, R., Berchel M.; Haute T.; Buin X.; Laurent V.; Youf R.; Bouraoui A.; Le Gall T.; Jaffrès P-A., Montier T. Gene transfection using branched cationic amphiphilic compounds for an aerosol administration in cystic fibrosis context.

## COMMUNICATIONS

### Communications orales

- Youf R., Chevreux S., Thétiot F., Jonas U., Schönherr H., Montier T., Lemerrier G. et Le Gall T. Ruthenium(II) polypyridyl complexes for antibacterial photodynamic therapy using clinical strains: a follow-up study. *AEBIN Photochemistry School international congress*, Spain, San Sebastian, AEBIN Photochemistry School, September 7-9/09/2020
- Youf R., Chevreux S., Thétiot F., Jonas U., Schönherr H., Montier T., Lemerrier G. et Le Gall T. Detailed Evaluation of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in Antibacterial Photodynamic Therapy Using Clinical Strains. *PDD-PDT international congress*, France, Nancy, 5-6/11/2020
- Youf R., Chevreux S., Thétiot F., Jonas U., Schönherr H., Montier T., Lemerrier G. et Le Gall T. La thérapie photodynamique (PDT) comme stratégie antimicrobienne contre les infections pulmonaires : preuve de concept pour la Mucoviscidose. *Colloque des jeunes chercheurs Vaincre la Mucoviscidose*, France, Paris, 5-6/03/21
- Youf R. Présentation des travaux de thèse réalisées sur La thérapie photodynamique. *Workshop dans le cadre de l'ANR Franco-allemande "TARGET-THERAPY"*, France, Brest, 4-5/10/22.

### Posters

- Youf R., Chevreux S., Thétiot F., Jonas U., Schönherr H., Montier T., Lemerrier G. et Le Gall T. Detailed Evaluation of Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in Antibacterial Photodynamic Therapy Using Clinical Strains. *Journées scientifiques de l'école doctorale biologie santé*, France, Brest, 2021
- Youf R., Thétiot F., Müller M., Jonas U., Schönherr H., Montier T., Lemerrier G. et Le Gall T. Investigation of antibacterial photodynamic therapy using Ruthenium(II) polypyridyl complexes under experimental conditions mimicking Cystic Fibrosis (CF) lung infections. *Congrès annuel de la Société Française de Nanotechnologie (SFNano)*, Angers, France, 2021
- Youf R., Nasir A., Müller M., Thétiot F., Müller M., Jonas U., Schönherr H., Lemerrier G., Montier T., et Le Gall T. Ruthenium(II) polypyridyl complexes for antibiofilm photodynamic therapy: Assessment using *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Eurobiofilms2022*, Palma de Majorque, Spain, 2022

## AUTRES

### Enseignements

- Enseignements de travaux pratiques (L1) en biologie cellulaire (3,5h), 14/03/2020.
- Enseignements de travaux pratiques (L2-L3) en microbiologie (32h), 17/01/2022 – 07/02/2022

### **Activités de vulgarisation scientifique**

- Nuit des chercheurs : Organisation et participation au stand de l'UMR INSERM 1078, éditions 2020, 2021 et 2022
- Fête de la Science : Organisation et participation au stand de l'UMR INSERM 1078, éditions 2020, 2021 et 2022
- Science en Theizh : Participation aux activités grand public, éditions 2022

### **Financeurs**

Bourse complète financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI). Soutien financier par l'Association de Transfusion Sanguine et de Biogénétique Gaétan Saleün et le Conseil Régional de Bretagne.

### **Formations suivies**

Expertise et méthode scientifique et technique (35:00), Éthique et intégrité scientifique (01:30), Projection professionnelle (12:00), Développer ses compétences en langue étrangère (09:00), Management et communication (31:00)

### **Evaluation par les Comités de Suivi Individuel (CSI)**

En 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> année : avancées de la thèse évaluée par Pr. Lhousseine Touqui (Equipe Mucoviscidose et bronchopathies chroniques, Institut Pasteur, Paris) et Dr Frédéric Tewes (INSERM U1070 Pharmacology of anti-infective agents, Poitiers, France)



# PREAMBULE

---

La propagation de bactéries (multi-)résistantes est causée par l'utilisation répétée et inadaptée des antibiotiques. Elle est considérée comme l'une des préoccupations majeures en santé publique. Le développement de nouveaux anti-infectieux, basés sur des mécanismes d'action alternatifs, permettrait de diminuer considérablement les impasses thérapeutiques actuellement rencontrées.

La thérapie photodynamique (PDT) est une stratégie émergente, faisant intervenir une molécule photosensible, une source lumineuse et de l'oxygène, dans le but de produire des espèces réactives de l'oxygène. Principalement utilisée dans les applications anticancéreuses, elle s'avère également intéressante dans le domaine de l'antimicrobien. De plus la photoinactivation de divers microorganismes, notamment des pathogènes pulmonaires (procaryotes comme eucaryotes), a déjà fait l'objet de plusieurs études.

Certaines pathologies, telle que la Mucoviscidose (Cystic Fibrosis ; CF), sont des modèles particulièrement intéressants pour étudier les infections bronchopulmonaires. L'amélioration de la prise en charge des patients CF a considérablement amélioré leur qualité et espérance de vie. Cependant, le déclin progressif des fonctions respiratoires s'intensifie en raison de la persistance des infections bronchopulmonaires. L'antibiothérapie appliquée peut être compromise en raison de nombreux dérèglements physiologiques spécifiques des patients CF.

Peu d'études ont mis en évidence la pertinence d'une application PDT avec les contraintes physiologiques et anatomiques rencontrées chez les patients CF. Envisager cette application chez l'Homme nécessite le développement de modes d'administration thérapeutiques innovants, à la fois de la molécule d'intérêt (PS) et de la lumière.

Au cours de cette thèse, l'utilisation de la PDT a été évaluée dans le contexte pathologique de la Mucoviscidose en prenant en compte les dérèglements physiologiques (pH, salinité, oxygénation) et les barrières biologiques (mucus, biofilms) spécifiques de la maladie. Par la suite, des mises au point de modes d'administrations (PS et lumière) ont été réalisées en vue d'une application chez l'animal. Enfin, la compatibilité de la PDT avec d'autres thérapies (antibiothérapie, thérapie génique) a été étudiée.



# INTRODUCTION

---

Ce travail de thèse consiste en l'évaluation de l'efficacité de la thérapie photodynamique (abrégée PDT pour « Photodynamic Therapy » dans ce manuscrit) comme stratégie antimicrobienne dans le cadre des infections bronchopulmonaires chroniques. Dans la première partie de cette introduction, les différentes avancées, les principes d'utilisation et les applications associées à la PDT seront évoqués. La deuxième partie décrira la maladie ciblée, la Mucoviscidose, avec une présentation générale de la pathologie, de ses manifestations cliniques et des pistes thérapeutiques associées. Enfin, dans une troisième partie, des éléments clés de la littérature permettront d'évaluer le potentiel de la PDT comme stratégie antimicrobienne dans le cadre de la Mucoviscidose.

## I. La thérapie photodynamique

---

L'innovation dans la synthèse de nouvelles molécules thérapeutiques est un processus long et coûteux pour le domaine pharmaceutique. Le champ thérapeutique, les mécanismes d'action, les voies d'administration et l'efficacité sur le long terme sont des critères essentiels pour évaluer l'originalité, la robustesse et la pertinence clinique de nouvelles stratégies. Parmi ces dernières, la PDT est en plein essor pour de multiples applications.

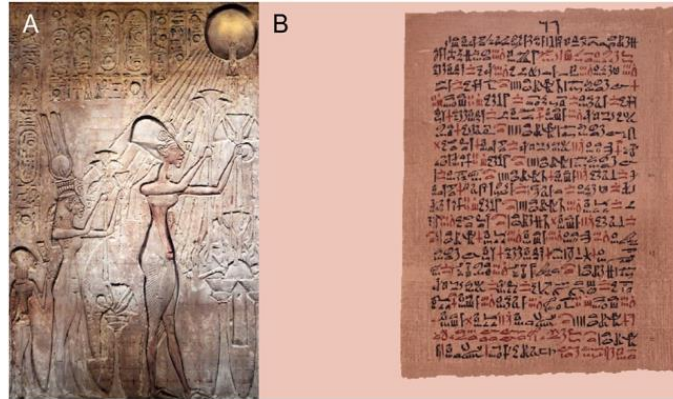
### 1. Principes et généralités des thérapies basées sur la lumière

Les thérapies basées sur l'utilisation de sources lumineuses sont reconnues pour leurs nombreux bénéfices sur la santé. De l'héliothérapie à la photothérapie moderne, la complexification de ces thérapies a mené *in fine* à l'utilisation de molécules photosensibles dans de nombreux domaines.

#### 1.1. Historique

Aux temps des Pharaons, de nombreuses civilisations pratiquaient des cultes dédiés au soleil et à ses bienfaits sur la santé (**Figure 1**). De la même façon, les Grecs et Romains avaient

coutume d'appliquer des « bains de soleil » dans le but limiter l'aggravation de certains maux comme les affections cutanées. Jusqu'au XIXème siècle, l'exposition prolongée au soleil, nommée héliothérapie, était la seule forme de photothérapie pratiquée [1].

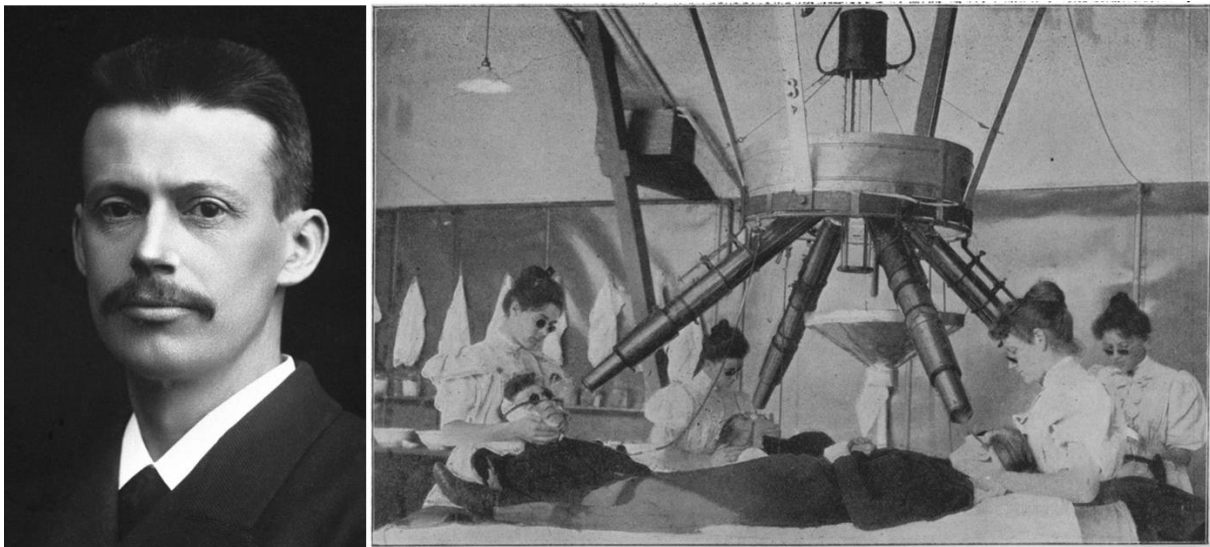


**Figure 1. Photothérapie dans l'Égypte ancienne** | (A) Fresque représentant un culte dédié au soleil. (B) Le papyrus Ebers mentionnant l'utilisation de la photothérapie [2].

Les avancées scientifiques dans le domaine de l'optique ont permis de mieux comprendre l'intérêt thérapeutique de la lumière. Newton l'a défini comme étant composée de particules ou de corpuscules ; Christian Huygens, en 1678, compléta cette définition en précisant que la lumière est une onde se propageant à la perpendiculaire de la direction de son mouvement [3]. Son caractère polychrome fut démontré par Isaac Newton avec l'utilisation d'un prisme. Par effet de diffraction, celui-ci décompose la lumière blanche en un mélange de plusieurs couleurs, définissant le spectre visible que l'Homme est capable de percevoir. À cette époque, l'héliothérapie était utilisée comme traitement dans le cadre de l'œdème, le rachitisme, les rhumatismes, la paralysie et les faiblesses musculaires. Par la suite, d'autres domaines du spectre ont été utilisés, comme les ondes infrarouges (IR) et les ultraviolets (UV), identifiées par Frederick Herschel (1800) et Johann Ritter (1801). A la fin du XIXème siècle, ces avancées ont permis à Arthur Downes et Thomas Blunt de démontrer que l'effet antimicrobien observé par héliothérapie était dû aux rayonnements UV présents dans la lumière blanche. Cette découverte a marqué le début de la photothérapie à spectre réduit dans le domaine médical, qui, par la suite, a mené au développement de photothérapies plus complexes et plus ciblées [4].

## 1.2. Modernisation de la photothérapie

Les premières utilisations en médecine moderne de la photothérapie ont débuté fin du XIX<sup>ème</sup>, lorsque le prix Nobel de médecine fut décerné à Nils Finsen (1903) pour sa contribution dans le traitement de maladies à base d'irradiations lumineuses, telles que la lumière rouge comme traitement contre la variole ou encore les UV contre le lupus vulgaire (*Lupus vulgaris*) (Figure 2) [5,6].

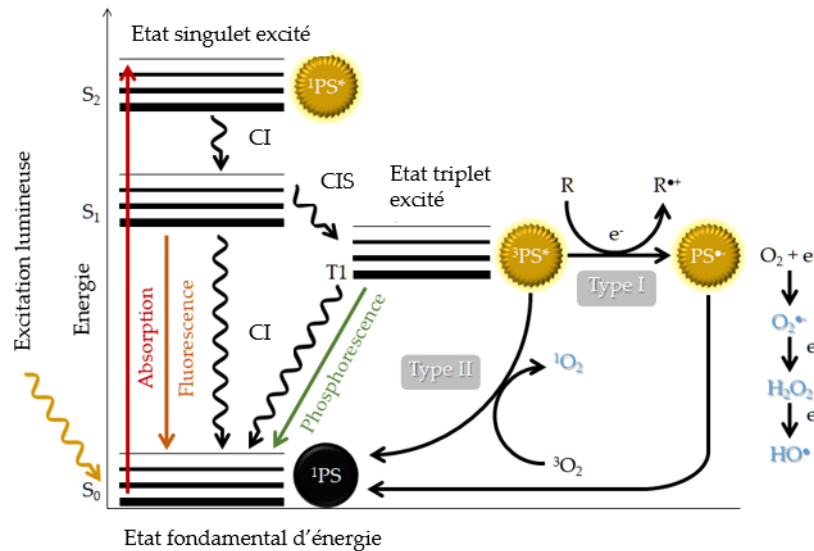


**Figure 2. Contribution des travaux du Dr Finsen sur la photothérapie** | À gauche : Dane Nils Ryberg Finsen (1860-1904), prix Nobel de Médecine et Physiologie pour sa contribution au développement de traitements par lumière condensée [1]. À droite : Traitement du lupus par photothérapie à l'aide d'un condensateur d'onde lumineuse (Lampe Finsen) [7].

Par la suite, des études ont démontré que la photothérapie pouvait agir sur certains pigments du corps humain qualifiés de « molécules photosensibles ». Ainsi, dans le cadre de la jaunisse néonatale, la photothérapie a démontré des effets détoxifiants en réduisant considérablement l'accumulation de bilirubine, un produit de dégradation de l'hème sécrété par les érythrocytes. L'action photochimique résulte d'une photoisomérisation de ce pigment nocif en formant un isomère non toxique et facilement éliminé par le corps [4,8]. Ces observations ont contribué à l'essor de la photothérapie moderne, nommée la thérapie photodynamique (PDT), mettant en avant l'intérêt thérapeutique d'une onde lumineuse sur une molécule qualifiée de « photosensibilisateur » (PS).

Hermann von Tappeiner et Albert Jesionek ont été les premiers scientifiques à démontrer l'effet thérapeutique d'une « réaction photodynamique ». Cette dernière fut obtenue en

combinant une molécule photosensible (l'éosine) et une source lumineuse (la lumière du jour) pour traiter six patients atteints de carcinome basocellulaire (CBC). Ils ont défini cette réaction comme un processus photochimique lié à l'absorption lumineuse du PS en présence d'oxygène [9]. Le diagramme de Jablonski permet d'illustrer cette réaction (**Figure 3**).



**Figure 3. Représentation simplifiée d'un diagramme de Jablonski décrivant les mécanismes photochimiques et photophysiques menant à la production de ROS** | <sup>1</sup>PS : PS à l'état fondamental en énergie ; <sup>1</sup>PS\* : PS à l'état singulet excité ; <sup>3</sup>PS\* : PS à l'état triplet excité ; R : molécule réduite ; R<sup>•+</sup> : molécule oxydée ; <sup>1</sup>O<sub>2</sub> : oxygène singulet ; <sup>3</sup>O<sub>2</sub> : oxygène moléculaire à l'état fondamental ; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : anion superoxyde ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; HO• : radical hydroxyle ; CI : conversion interne ; CIS : croisement intersystèmes. (Figure issue de la revue présentée dans la partie suivante (Cf Introduction, partie I, 2.3.) [10].

De façon générale, le PS se situe à un niveau d'énergie stable, nommé « état singulet fondamental ». À la suite d'une illumination, l'absorption d'un photon va permettre au PS d'acquérir de l'énergie en passant de l'état fondamental (<sup>1</sup>PS) à un premier état singulet très réactif (<sup>1</sup>PS\*). L'excès d'énergie va ensuite être transformé (i) par conversion interne (CI) sous forme de chaleur et/ou par émission de fluorescence, afin que le PS puisse retourner à un état fondamental ; ou (ii) par croisement intersystème (CIS) en passant par un état intermédiaire dit état « triplet » (<sup>3</sup>PS\*). Ce dernier a comme particularité d'avoir une longue demi-vie et est le principal médiateur des phénomènes de photosensibilisation en déclenchant deux types de réactions photochimiques : les mécanismes de type I et II [11]. La première réaction a lieu lorsque le triplet capture un électron libre d'une molécule réduite (R) pour réaliser un transfert d'électron vers de l'oxygène à l'état fondamental (O<sub>2</sub>). Cette réaction est à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces dernières sont le résultat de trois réductions successives menant à la formation d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), puis de peroxyde

d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et enfin, de radical hydroxyle ( $HO\bullet$ ). La seconde réaction génère un transfert d'énergie direct à l'oxygène dissout ( $^3O_2$ ), ce qui induit la formation d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Une fois ces réactions photochimiques réalisées, le PS revient ensuite à son état initial et peut ainsi produire une réaction *de novo* [12]. Par définition, la réaction PDT engendre ces deux mécanismes photochimiques en présence de fortes concentrations en oxygène. Cependant, Hamblin M. et al., ont récemment défini un mécanisme PDT de type III comme étant une réaction photochimique indépendante de celui-ci [13].

La formation de ROS et de  $^1O_2$  peut procurer des effets thérapeutiques intéressants, au vu de leurs multiples sites d'action [14,15]. Néanmoins, le type d'application, la source lumineuse, la nature du PS et les conditions environnantes sont des éléments déterminants pour obtenir les effets thérapeutiques souhaités [16].

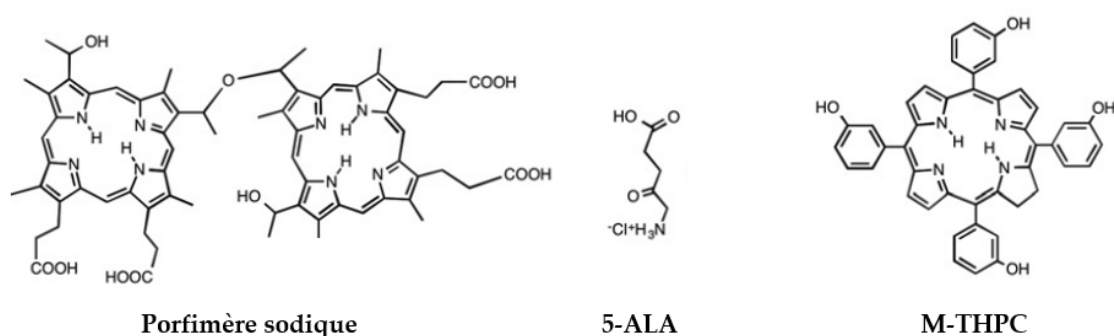
### 1.3. Photosensibilisateurs (PS) et propriétés photophysiques

Les PS sont des molécules capables, sous l'effet d'une excitation lumineuse, d'initier les réactions photochimiques décrites précédemment. De façon générale, la durée de vie de l'état triplet excité a longtemps été considéré comme l'un des paramètres majeurs qualifiant un PS comme étant efficace. En effet, plus la durée de vie de cet état excité est importante, meilleur est le rendement des réactions photochimiques. Cependant, la découverte et le développement de nouvelles molécules ont permis d'identifier davantage de paramètres critiques.

#### 1.3.1. PS de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération

Au cours des dernières décennies, la synthèse de PS s'est intensifiée. Initialement, les PS de 1<sup>ère</sup> génération regroupent les dérivés d'hématoporphyrine (HpD) dont le principal représentant est le Porfimère sodique I (Photofrin®) (**Figure 4**) [17]. La FDA (« Food and Drug Administration ») a approuvé son utilisation pour le traitement par PDT des patients atteints de cancer de la vessie, du poumon (type Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules CBNPC) et plus récemment, de l'œsophage de Barrett [18]. Le Photofrin® présente l'avantage d'être bien toléré aux doses cliniques actuelles et d'être soluble dans l'eau ; cependant, son absorption limitée à la longueur d'onde 630 nm (lumière rouge), son degré de bioaccumulation, et sa longue demi-vie donnent lieu à une toxicité non négligeable. Il entraîne notamment une

photosensibilisation<sup>1</sup> cutanée pendant plusieurs semaines [19]. Par la suite, les PS de deuxième génération ont été développés. Ils sont caractérisés par (i) de meilleures propriétés photophysiques (rendement plus élevé de  $^1O_2$ ) et pureté chimique, (ii) une meilleure pénétration dans les tissus profonds et (iii) moins d'effets secondaires [19,20]. Ils sont divisés en plusieurs groupes, dont les principaux sont l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), les dérivés de porphyrine (Lutetium texaphyrines et benzoporphyrines), phthalocyanines (Naphthalocyanines et Zinc phthalocyanines), les chlorines (Tetra(m-hydroxyphényl)chlorine) et les dérivés de produits de dégradation de la chlorophylle a (Figure 4) [20].



**Figure 4. Exemples de PS de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> générations utilisés en PDT** | Porfimère sodique (Photofrin®), Acide 5-aminolévulinique (5-ALA, précurseur de porphyrine), et méta-Tétra(hydroxyphényl)chlorine (m-THPC, Témoporfine, Foscan®).

### 1.3.2. PS de nouvelle génération

Les PS de troisième génération sont caractérisés par la conjugaison des PS de deuxième génération avec d'autres molécules comme des anticorps, des hydrates de carbone, des acides aminés et des peptides, ou par encapsulation, avec par exemple des liposomes, des micelles, des polymères et autres nanoparticules, pour améliorer la délivrance des PS [19,21–23]. De plus, les fonctionnalisations, avec par exemple, des groupements acide carboxylique, amine, ester et autres ont été utilisés dans le but d'entraîner une ionisation et/ou une dissociation des PS dans un milieu spécifique (température, pH, concentration en sels) [24]. Actuellement, la majorité des PS testés sont sous forme de nanoparticules. Par exemple, la « métallisation des PS » a participé à leur optimisation, notamment par couplage d'un ion métallique central

<sup>1</sup> Photosensibilisation (dans ce contexte) : sont des réactions (immunitaires, allergiques) liées à la phototoxicité.

chélaté. Parmi ces derniers, les métaux de transition (cuivre (II), cobalt (II), fer (II) et zinc (II)), les métaux de post-transition (Al, Sn) et les métalloïdes (Si), sont capables d'améliorer fortement les propriétés photophysiques de certains PS macrocycliques [25]. De plus, le couplage de métaux nobles aux PS conditionne leur spécificité d'action sur la zone traitée [26]. Dernièrement, les matériaux photosensibles à base de carbone (oxyde de graphène et nanotubes de carbone) mais aussi les matériaux inorganiques (les « quantum dots » et les nanoparticules d'oxyde métallique) sont de plus en plus utilisés pour leur biocompatibilité, leur dispersibilité et leur photostabilité [10]. Les originalités chimiques des PS développés dans le but d'une application antimicrobienne seront détaillées plus tard (Cf Section Introduction, Partie I, 2.3.).

#### 1.4. Sources lumineuses

L'innovation de la PDT passe par l'amélioration des propriétés des PS mais également par le développement de modèles d'illumination.

##### 1.4.1. Biophotonique

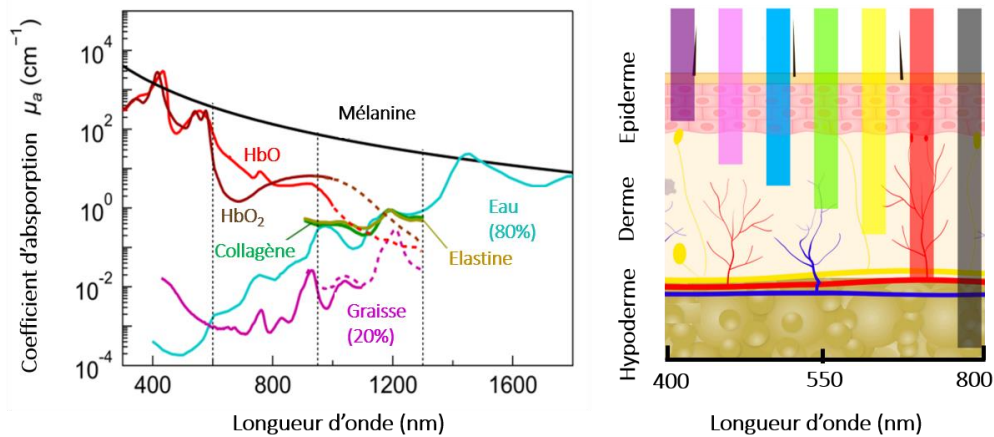
Toutes les sources lumineuses peuvent naturellement convertir l'énergie induite en lumière. Celles-ci sont répertoriées en deux groupes distincts : les sources lumineuses dites « incohérentes » et celles dites « cohérentes ». L'expérience des fentes de Young repose notamment sur la cohérence spatiale d'un faisceau lumineux et permet ainsi de discriminer ces deux groupes. Si le faisceau, après avoir passé les deux fentes, ne permet pas l'apparition de frange d'interférence, alors la lumière est dite « incohérente spatialement ». C'est le cas notamment des lumières polychromiques, telles que la lumière solaire ou celle émise par une ampoule halogène. Dans ce cas, la génération de lumière se produit par émission spontanée et les photons sont émis de façon aléatoire par les atomes excités. Les rayonnements ainsi produits se propagent dans toutes les directions. Dans le cas d'une thérapie lumineuse, les sources dites cohérentes, qualifiées de monochromes et directionnelles, sont davantage compatibles. En effet, d'une part, l'apport d'énergie lumineuse, nécessaire pour le déroulement des différentes réactions photochimiques, est plus importante ; d'autre part, les interactions fondamentales de la lumière avec les tissus, à savoir la réfraction, la réflexion, la

dispersion et l'absorption, sont mieux maîtrisées. Ces dernières définissent les principes fondamentaux de la biophotonique.

Les principales molécules hautement absorbantes dans les tissus comprennent l'eau, l'oxyhémoglobine, la désoxyhémoglobine, la mélanine et les cytochromes (**Figure 5**). Lorsque l'absorption de la lumière se produit, le rayonnement absorbé est principalement converti en chaleur par le chromophore. Cette capacité d'absorption est définie par la profondeur de pénétration optique ( $\delta$ ) (*Equation (1)*). La diffusion et l'absorption de la lumière dans les tissus sont quantifiées par les coefficients de diffusion réduit ( $\mu'_s$ ) et d'absorption ( $\mu_a$ ) [27].

$$\text{Equation (1)} : \delta = 1/\sqrt{3\mu_a (\mu'_s + \mu_a)}$$

Selon le tissu ciblé et son degré de pigmentation,  $\mu'_s$  et  $\mu_a$  varient, ce qui témoigne d'une différence de pénétration et distribution de la lumière dans l'aire ciblée. Par ailleurs, dans les tissus, la profondeur de pénétration optique ( $\delta$ ), i. e. la distance à laquelle l'intensité lumineuse se réduit à 0,37 de l'intensité initiale, est fortement dépendante de la longueur d'onde ( $\delta < 0,5$  mm à 400–430 nm,  $\delta \leq 1$  mm à 500 nm,  $\delta \leq 2-3$  mm à 630 nm et  $\delta \leq 5-6$  mm à 700–800 nm). Ainsi, plus la longueur d'onde utilisée tend vers l'infrarouge, plus la pénétration lumineuse à travers les tissus est importante. (**Figure 5**).



**Figure 5. Schématisation des propriétés optiques des tissus biologiques** | (A) Coefficients d'absorption de plusieurs constituants tissulaires en fonction de la longueur d'onde d'intérêt [28]. (B) Capacité des ondes lumineuses (des UV aux IR) à pénétrer les différentes couches cellulaires d'un épithélium : épiderme, derme et hypoderme [29].

#### 1.4.2. Les différents dispositifs d'illumination

Actuellement, les lasers sont couramment utilisés pour les applications PDT sur les zones superficielles et interstitielles. Leur capacité à produire une source lumineuse monochromatique, à faible bande passante et à puissance modulable permet d'obtenir une excitation lumineuse d'avantage contrôlée pour un PS donné. Les lasers à colorants (appelés « dye lasers ») consistent à utiliser une molécule organique photosensible (par exemple la rhodamine) comme source d'émission lumineuse (600-650nm). Les sources d'énergies associées sont souvent l'argon, de la vapeur de cuivre ou du phosphate de potassium-titanyle (KTP) [30]. Cependant, ces dispositifs sont onéreux et manquent de portabilité. La plupart des applications cliniques de PDT utilise des lasers à haute énergie. Ces dispositifs sont plus puissants, stables, faciles d'utilisation et moins onéreux que les lasers à colorant [31]. Par ailleurs, les LED (« Light Emitting Diode », diodes électroluminescentes) ont également été employées dans le cas d'applications cliniques. Ces sources lumineuses ont les désavantages d'être moins puissantes et d'émettre une longueur d'onde avec une bande passante plus large que les lasers. Cependant, elles disposent de nombreux avantages dans le domaine médicale et peuvent délivrer la lumière dans des zones difficiles à illuminer [15]. Les lampes, quant à elles, émettent un rayon lumineux à large spectre, ce qui permet, avec un dispositif sans filtre, d'exciter tout type de photosensibilisateur. En revanche, leur incapacité à être couplées à des lentilles ou des fibres optiques limite leur champ d'application (**Table 1**). Par ailleurs, les effets d'échauffements restreignent leur application pour la PDT.

Plus récemment, l'utilisation de lasers femtosecondes a été proposée comme source d'illumination. Cette technique, basée sur l'excitation à deux photons, repose sur l'utilisation d'une lumière incidente caractérisée par une forte densité de photons. Ainsi, deux photons d'énergie égale peuvent être absorbés simultanément par un chromophore [32]. Cette technologie permet de réaliser des illuminations de courtes durées dans le domaine du proche

infrarouge, ce qui offre un avantage considérable pour l'application d'une PDT dans les tissus profonds [30].

**Table 1. Propriétés des différentes sources lumineuses utilisées classiquement en PDT** | Les critères optiques et techniques sont considérés pour évaluer les 3 sources lumineuses d'intérêt (lasers, LED et lampes). (D'après [31]).

Propriétés	Laser	LED	Lampe
Spectre	Monochrome	Monochrome	Polychrome
Bande passante	Réduite	Large	Large
Puissance	Haute	Faible	Faible
Prix	Onéreux	Peu onéreux	Peu onéreux
Ouverture	Faible divergence	Grande divergence	Grande divergence
Effet thermique	Fort	Faible	Moyen
Couplage	Fibres, diffuseurs	Pas nécessaire	Pas adaptable

L'innovation de ces différents systèmes d'illumination permet (i) de maximiser l'apport en énergie lumineuse pour un PS d'intérêt et (ii) de couvrir un champ d'applications plus large.

## 2. Applications de la thérapie photodynamique

Initialement utilisées pour les affections cutanées, la PDT est actuellement appréciée pour différentes applications. Les principales propriétés référencées dans la littérature sont antitumorales, immunomodulatrices ou antimicrobiennes.

### 2.1. Applications anticancéreuses

L'intérêt la PDT pour les applications anticancéreuses est sa capacité à diminuer la progression de tumeur. Cependant, selon la pathologie, son mécanisme d'action peut varier. Les PS s'accumulent davantage dans la zone tumorale car la surproduction de récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses facilite leur absorption ; de plus, la néovascularisation<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Néovascularisation : formation de nouveaux vaisseaux sanguins fonctionnels au sein d'une tumeur

diminue leurs éliminations [17]. Ces propriétés favorisent la spécificité du traitement pour une zone d'intérêt tout en épargnant les tissus sains adjacents [17].

### 2.1.1. Mécanismes antitumoraux

La PDT peut présenter un effet anticancéreux en induisant différents mécanismes de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. L'activation de ces voies à la suite du traitement PDT dépend de multiples facteurs interdépendants : le type de cellules ciblées, la localisation, la concentration du PS, les paramètres d'illumination et la concentration en oxygène [33,34].

Les PS ayant une action phototoxique spécifique envers les mitochondries entraînent l'initiation de la voie apoptotique via une série de réactions : perte du potentiel de la membrane mitochondriale, dégradation spécifique de Bcl-2 (régulateur anti-apoptotique), libération de facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome C, et activation subséquente de la cascade métabolique des caspases. Par ailleurs, les effets phototoxiques agissant sur les lysosomes déclenchent la sécrétion de protéases lysosomiques induisant des dommages mitochondriaux puis l'initiation de l'apoptose. Les PS responsables de dommages membranaires peuvent être à l'origine d'une réponse nécrotique [35]. Lorsque la PDT agit au niveau du réticulum endoplasmique, la phototoxicité induit un stress activant l'autophagie et l'apoptose. L'autophagie peut servir de mode alternatif de mort cellulaire sous PDT à forte dose en raison d'une perte considérable de la protéine Bcl-2, mais peut aussi protéger les cellules contre la phototoxicité d'une PDT à faible dose [36].

### 2.1.2. Etudes cliniques en cancérologie

La PDT a été cliniquement approuvée dans le cadre de certains cancers proliférant au niveau du système respiratoire. Plusieurs modèles se sont avérés pertinents, en passant des voies aérodigestives supérieures (bouche) aux voies respiratoires basses profondes (poumons).

La PDT a démontré des propriétés intéressantes pour lutter contre les cancers de la bouche et du larynx [37,38]. Par exemple, chez plus de 85% des patients atteints de cancers oropharyngés

à un stade précoce, le Foscan® a déclenché une réponse complète<sup>3</sup>. Le traitement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (CETEC) par PDT a été étudié dans deux contextes différents ; elle peut être utilisée comme traitement curatif de la maladie à un stade précoce, ou comme soins palliatifs symptomatiques pour les patients à un stade avancé [39]. Ces derniers peuvent bénéficier de la témoporfine (approuvée par l'EMA « European Medicines Agency ») si les traitements conventionnels n'ont pas pu être appliqués. Néanmoins, la proportion de patients CETEC éligibles est très faible, ce qui freine le développement de la PDT pour ce type de cancer [18].

Dans le cadre du cancer de l'œsophage, la PDT basée sur le Photofrin® et la Laserphyrin® (ou talaporfin sodique, « NPe6 ») s'est avérée être efficace. Dès 1995, plusieurs études cliniques ont démontré la capacité de la PDT à induire une réponse complète chez des patients porteurs de petites tumeurs œsophagiennes [40]. Chez les patients atteints d'œsophage de Barrett et de dysplasie de haut grade ou d'adénocarcinome muqueux, une éradication complète de la dysplasie a été obtenue par combinaison du Photofrin® avec de l'oméprazole [42,43]. Malgré ces avancées au cours des 35 dernières années, la PDT comme traitement des cancers œsophagiens engendre des sténoses et témoigne d'une moindre efficacité en comparaison avec les approches classiquement employées (dissection sous-muqueuse endoscopique, ablation par radiofréquence et cryothérapie) [44].

La PDT a été appliquée également dans le traitement de diverses formes de cancers bronchopulmonaires. La Photofrin®-PDT est approuvée par la FDA pour le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Dans ce contexte, elle peut également être associée à la radiothérapie par faisceau externe en vue d'obtenir un meilleur effet sur les obstructions endobronchiques [45]. Chez ces patients, la bronchoscopie peut être associée à la PDT pour délivrer efficacement la source lumineuse dans les bronches. A un stade précoce, la PDT peut induire des réponses complètes, mais la récurrence de la maladie se produit souvent [18]. La talaporfine (Laserphyrin®) est approuvée au Japon depuis 2004 pour le traitement du cancer endobronchique ; notamment à la suite d'une étude de phase II chez des patients

---

<sup>3</sup> Réponse complète : disparition totale des signes de la maladie après traitement

présentant un carcinome pulmonaire à cellules squameuses. L'effet de ce PS a favorisé une rémission partielle chez sept patients parmi les neuf traités [46].

Ces études soulignent l'application concrète de cette thérapie dans le contexte clinique et de sa polyvalence. En effet, en plus de pouvoir être administrée en surface, elle peut également l'être dans des zones difficiles d'accès comme les poumons.

## 2.2. Applications immunomodulatrices

L'effet de la PDT sur la réponse immunitaire est une question complexe et dépendante de nombreux facteurs concernant le PS (sa nature, ses critères pharmacocinétiques et son site d'action cellulaire) et l'illumination [47]. Dans certaines circonstances, la PDT a la capacité d'augmenter la réponse immunitaire de l'hôte contre le cancer [38,39].

Le premier intérêt de cette thérapie est qu'elle peut mener à un phénomène de photobiomodulation (PBM). Cette dernière, appelée également thérapie par laser de faible énergie, repose sur l'utilisation d'une photothérapie à faible dose pour stimuler l'activité de chromophores endogènes, tels que les cytochromes oxydase C et les canaux calciques. Cette modulation entraîne une augmentation de la production d'ATP et régule les facteurs de transcription liés à la croissance et à la réparation cellulaire. Plusieurs études utilisant la PBM ont démontré l'effet bénéfique de la PDT sur la cicatrisation des plaies, la diminution de l'inflammation et réduction des douleurs [48,49]. Elle a également été employée comme traitement dans les pathologies auto-immunes telles que la thyroïdite auto-immune chronique et le psoriasis. [50–52]. Récemment, l'émergence de la PBM transcrânienne chez les personnes souffrant de lésions cérébrales traumatiques, la dépression grave et la maladie de Parkinson s'est avérée intéressante quant à l'amélioration du flux sanguin cérébral [53]. Les applications dans le domaine de l'antimicrobien relatives à la PBM ont été davantage détaillées dans la section suivante (Cf Section Introduction, partie I, 2.3.).

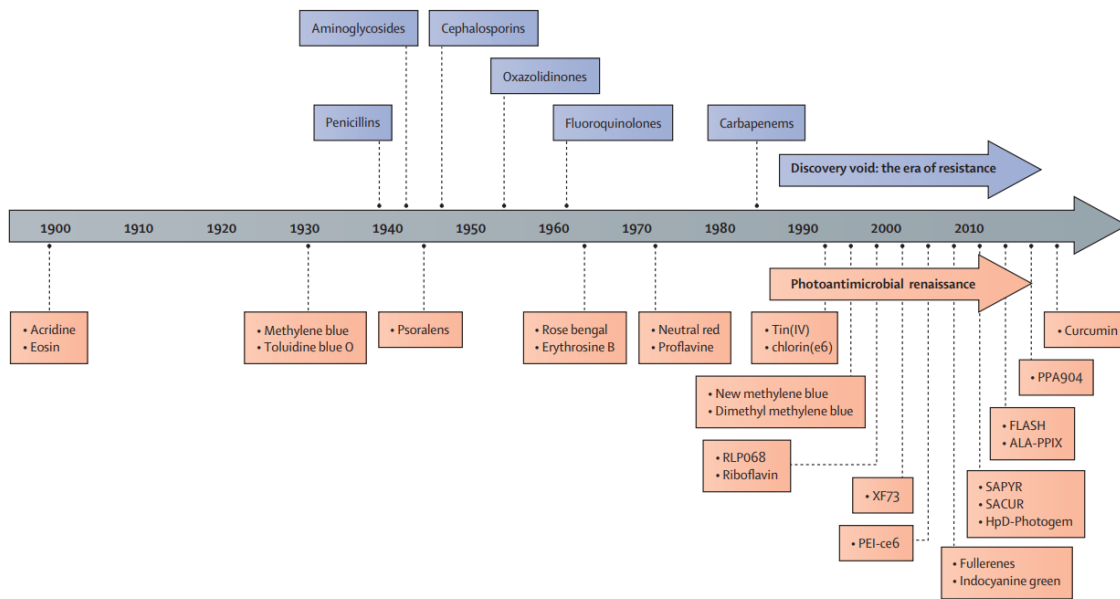
L'application locale d'une solution de 5-ALA comme traitement immunomodulateur chez les patients atteints de carcinome basocellulaire (CBC) et de kératose actinique induit une forte diminution du taux de lésions dans plusieurs études cliniques [54,55]. Depuis, deux traitements, l'un à base de 5-ALA (20 % en solution et 10% en gel) et l'autre de MAL (aminolévulinate de méthyle, en crème) ont été développés et approuvés par la FDA pour le

traitement de la kératose du visage ou du cuir chevelu ainsi que le CBC [18,56]. Ces dernières années, la PDT a été particulièrement utilisée comme traitement pour le lichen plan (*lichen planus*), une maladie inflammatoire touchant principalement la peau et les muqueuses de la bouche. Par ailleurs, elle se positionne comme traitement de seconde intention, après les corticostéroïdes, au vu de son efficacité similaire pour améliorer les signes et les symptômes (réduction de la taille des lésions, soulagement de la douleur et augmentation des périodes sans symptôme) [57,58]. D'autres maladies auto-immunes rares, comme les « maladies bulleuses » de type pemphigoïde, ont été traitées efficacement avec la PDT-5-ALA, réduisant considérablement les érythèmes et les papules kératosiques chez les patients [59,60]. Ce PS, prometteur pour de multiples pathologies auto-immunes, a également fait ces preuves dans des applications de PDT antimicrobiennes [61].

Globalement, un certain nombre de PS utilisés initialement dans les deux domaines présentés précédemment ont été testés pour d'autres applications, comme l'antimicrobien. Cette idée de « repositionner les PS » d'une application vers une autre a permis d'élargir le spectre d'action de nombreuses molécules photosensibles [10,62].

### 2.3. Applications antimicrobiennes

La PDT a été étudiée comme stratégie thérapeutique dans de multiples domaines médicaux. Cependant, son utilisation en clinique a évolué très distinctement entre les applications décrites précédemment et les applications antimicrobiennes. Par exemple, depuis 25 ans, la PDT anticancéreuse est reconnue comme étant une solution thérapeutique pour le traitement de la kératose actinique et du CBC. En comparaison, le premier essai clinique dans le contexte de la PDT antimicrobienne s'est déroulé en 2009 dans le traitement des ulcères cutanés. Les essais suivants se sont centrés en grande majorité dans le domaine de l'odontologie [10]. L'une des raisons pour laquelle la PDT antimicrobienne a connu une progression plus tardive est notamment liée à la quasi-exclusivité de l'antibiothérapie comme traitement antibactérien. Cependant, depuis les années 1990, l'aggravation des résistances aux antibiotiques a favorisé les recherches sur d'autres agents antimicrobiens, dont les nouveaux PS (**Figure 6**) [63].



**Figure 6. Découverte des antimicrobiens de type antibiotique et PS au cours du XXème siècle | Chronologie des découvertes (i) des résistances aux antibiotiques (bleu) et (ii) des agents antimicrobiens photosensibles (orange) [63]**

La revue suivante présente en premier lieu un état de l'art de l'utilisation de cette stratégie thérapeutique, puis, aborde ses avantages et inconvénients dans le domaine de l'antimicrobien. Ensuite, un focus sur deux axes d'optimisation de la PDT antimicrobienne est discuté ; le premier vise à complexifier chimiquement les PS, qui tendent vers l'élaboration de systèmes à multi-composantes, et le second, à combiner cette stratégie à d'autres thérapies anti-infectieuses existantes (comme l'antibiothérapie par exemple).

Review

# Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies

Raphaëlle Youf <sup>1</sup>, Max Müller <sup>2</sup>, Ali Balasini <sup>3</sup>, Franck Thétiot <sup>4,\*</sup>, Mareike Müller <sup>2</sup>, Alizé Hascoët <sup>1</sup>, Ulrich Jonas <sup>3</sup>, Holger Schönherr <sup>2,\*</sup>, Gilles Lemerrier <sup>5,\*</sup>, Tristan Montier <sup>1,6</sup> and Tony Le Gall <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGB-GTCA, F-29200 Brest, France; raphaelle.youf@univ-brest.fr (R.Y.); alz.hascoet@gmail.com (A.H.); tristan.montier@univ-brest.fr (T.M.)
- <sup>2</sup> Physical Chemistry I & Research Center of Micro- and Nanochemistry and (Bio)Technology of Micro and Nanochemistry and Engineering (Cμ), Department of Chemistry and Biology, University of Siegen, Adolf-Reichwein-Straße 2, 57076 Siegen, Germany; max.mueller@uni-siegen.de (M.M.); m.mueller@chemie-bio.uni-siegen.de (M.M.)
- <sup>3</sup> Macromolecular Chemistry, Department of Chemistry and Biology, University of Siegen, Adolf-Reichwein-Straße 2, 57076 Siegen, Germany; alibalasini94@gmail.com (A.B.); jonas@chemie.uni-siegen.de (U.J.)
- <sup>4</sup> Unité Mixte de Recherche (UMR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 6521, Université de Brest (UBO), CS 93837, 29238 Brest, France
- <sup>5</sup> Coordination Chemistry Team, Unité Mixte de Recherche (UMR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 7312, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, CEDEX 2, 51687 Reims, France
- <sup>6</sup> CHRU de Brest, Service de Génétique Médicale et de Biologie de la Reproduction, Centre de Référence des Maladies Rares Maladies Neuromusculaires, 29200 Brest, France
- \* Correspondence: franck.thetiot@univ-brest.fr (F.T.); schoenherr@chemie.uni-siegen.de (H.S.); gilles.lemerrier@univ-reims.fr (G.L.); tony.legall@univ-brest.fr (T.L.G.)



**Citation:** Youf, R.; Müller, M.; Balasini, A.; Thétiot, F.; Müller, M.; Hascoët, A.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1995. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13121995>

Academic Editors: Udo Bakowsky, Matthias Wojcik, Eduard Preis and Gerhard Litscher

Received: 7 October 2021  
Accepted: 17 November 2021  
Published: 24 November 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:** Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has become a fundamental tool in modern therapeutics, notably due to the expanding versatility of photosensitizers (PSs) and the numerous possibilities to combine aPDT with other antimicrobial treatments to combat localized infections. After revisiting the basic principles of aPDT, this review first highlights the current state of the art of curative or preventive aPDT applications with relevant clinical trials. In addition, the most recent developments in photochemistry and photophysics as well as advanced carrier systems in the context of aPDT are provided, with a focus on the latest generations of efficient and versatile PSs and the progress towards hybrid-multicomponent systems. In particular, deeper insight into combinatory aPDT approaches is afforded, involving non-radiative or other light-based modalities. Selected aPDT perspectives are outlined, pointing out new strategies to target and treat microorganisms. Finally, the review works out the evolution of the conceptually simple PDT methodology towards a much more sophisticated, integrated, and innovative technology as an important element of potent antimicrobial strategies.

**Keywords:** antimicrobials; ROS; combinatory strategies; photodynamic therapy; multidrug resistance; nanoparticles; photosensitizers

## 1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) occurring in bacteria, viruses, fungi, and parasites is a global health and development threat, declared by the WHO as one of the top 10 global public health threats facing humanity. The misuse and overuse of antimicrobials make almost all disease-causing microbes resistant to drugs commonly used to treat them [1]. Multidrug resistance (MDR) to critical classes of antibiotics has gradually increased in nosocomial pathogens, including *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. (which are gathered in the so-called ESKAPE group) [2]. Currently, in Europe, AMR is estimated to be responsible for 33,000 deaths every year and the annual economic toll, covering extra

healthcare costs and productivity losses, amounts to at least EUR 1.5 billion [3,4]. Unless adequately tackled, 10 million people a year will die from drug-resistant infections by 2050, according to the predictions of the government-commissioned O'Neill report [5].

With the decline in the discovery of new antimicrobials since 1970s, the mainstream approach for the development of new drugs to combat emerging and re-emerging resistant pathogens has focused on the modification of existing compounds. However, one key recommendation encourages stimulation of early stage drug discovery [6]. Among emerging antimicrobial therapeutic alternatives, light-based approaches show particular promise [7]. Traditionally, phototherapy was already a common practice in ancient Greece, Egypt, and India to treat skin diseases [8]. At the beginning of the 20th century, Oscar Raab first described the phototoxicity of the dye acridine red against *Paramecium caudatum*, and Tappenier and Jesionek reported the photodynamic effects of eosin suitable for treating diverse cutaneous diseases. Since then, PDT was established as the administration of a non-toxic photosensitizer (PS) followed by exposure to light irradiation at an appropriate wavelength focused on an area to treat [7]. While anti-cancer PDT is a clinical reality for 25 years [9], PDT as an antimicrobial treatment was demonstrated for the first time against drug-resistant infections in the healthcare sector in the early 1990s, leading to a “photo-antimicrobial renaissance era” [7]. Major MDR bacteria have been found susceptible to antimicrobial PDT (aPDT), independently of their drug-resistance profiles [10,11]. To date, resistance to aPDT is rarely reported, indicating that the possibility for microbes to adapt and escape this treatment can occur but is still contained. More effective aPDT systems are continuously developed, notably via combinatory approaches using multiple chemical systems and/or modalities. At the current stage of development, aPDT cannot address systemic infections but it holds great promise for treating localized infections and to fight AMR.

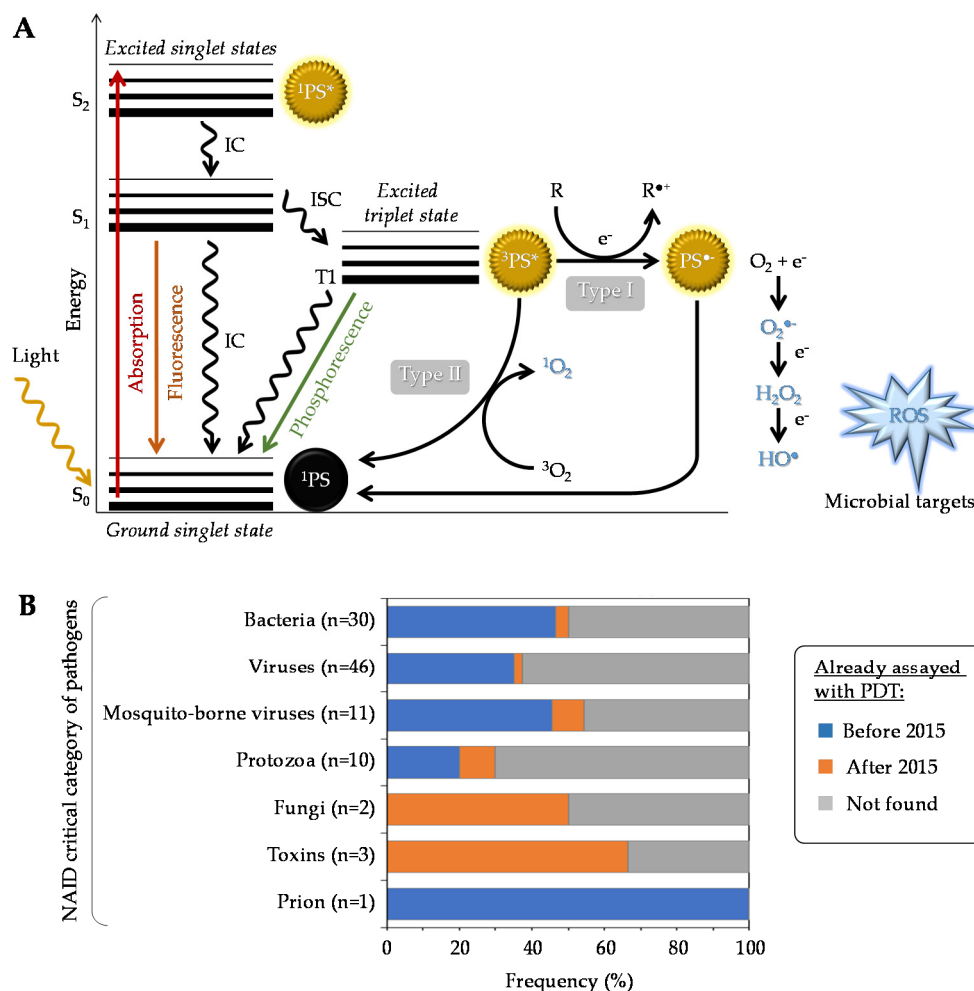
While excellent earlier authoritative reviews provide a detailed description of aPDT [12–15], the present review focuses on most recent developments in the field for the last 5 years, with a focus on aPDT combinatory strategies. It should be noticed that aPDT is sometimes referred to as photodynamic antimicrobial chemotherapy, light-based antimicrobial therapy, photo-controlled antimicrobial therapy, or antimicrobial photo-inactivation. In this review, all these synonyms were considered to present (i) the current state of aPDT applications in preclinical and clinical settings, (ii) a state of the art with recent developments in photosystems, (iii) the implementation of multicomponent nanotechnologies and recent molecular engineering, and (iv) the exploration of combinatory aPDT approaches towards possible future therapeutic innovations.

## 2. PDT: General Presentation and Features

### 2.1. Photochemical Pathways and Reactive Oxygen Species Production

Generally speaking, a given PS has the potential to produce reactive oxygen species (ROS) under specific conditions (Figure 1A). Typically, it possesses a stable electronic configuration called ground state level. Following irradiation and absorption of a photon, the PS is converted from a low (fundamental) energy level ( $^1\text{PS}$ ) to a “Frank Condon” short-lived, very reactive, excited singlet state  $^1\text{PS}^*$  [16–18]. Subsequently, the PS can lose energy by emitting fluorescence or heat via internal conversion (IC), thereby returning to its initial ground state level; alternatively, it can be converted by a so-called inter-system crossing (ISC) to a longer-living excited triplet state  $^3\text{PS}^*$ . From this state, two types of chemical reaction pathways can occur, known as Type I electron transfer and Type II energy transfer, which can take place simultaneously [19]. In the Type I reaction, the  $^3\text{PS}^*$  captures an electron ( $e^-$ ) from a reducing molecule (R) in its vicinity, which induces an electron transfer producing the superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) and, after the subsequent reduction, leads to the generation of more cytotoxic ROS including hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and hydroxyl radical ( $\text{HO}^\bullet$ ). In the Type II reaction, a direct energy transfer occurs from the  $^3\text{PS}^*$  to the ground state molecular oxygen ( $^3\text{O}_2$ ) that is then converted to singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ). The ROS thus produced encompass  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}^\bullet$ , and  $^1\text{O}_2$ , the last two being

the most reactive and most cytotoxic species but also those with the shortest diffusion distance. One PS molecule can generate thousands of molecules of  $^1\text{O}_2$ , depending notably on its  $^1\text{O}_2$  quantum yield, the surrounding environment, and the respective occurrence of Type I and Type II mechanisms [12,17,20].



**Figure 1.** (A) Modified Jablonski diagram describing the photochemical and photophysical mechanisms leading to ROS production during PDT. (B) Overview of aPDT already applied to the critical category of pathogens, as defined by the NIAID (<https://www.niaid.nih.gov/research/emerging-infectious-diseases-pathogens>, accessed date: 1 September 2021). For each category, the chart specifies the number and the proportion (percent of pathogens already assayed in at least one aPDT study either before or after 2015).

In addition to the above-mentioned Type I and Type II mechanisms, Hamblin et al. recently proposed introduction of a Type III photochemical pathway, following which the radical anion  $\text{PS}^{\bullet-}$  and/or inorganic radicals formed in absence of oxygen could also lead to photoinactivation [21]. These authors indeed identified several circumstances in which oxygen-independent photoinactivation of bacteria using specific PSs can be obtained.

## 2.2. Biological Effects of aPDT: Potential Targets and Related Mechanisms

The main first targets of aPDT are external microbial structures, i.e., the cell wall, cell membrane, or virus capsid and envelope [22,23]. Photodynamic inactivation (PDI) can be obtained against microorganisms growing as planktonic cells and/or in biofilms [13]. In biofilm matrices, the diffusion of PSs can be delayed or PSs can be sequestered, in spite of photodamage induced on various components such as polysaccharides and extracellular

DNA [24,25]. The diffusion potential of ROS depends on (i) the maximal time-limited diffusion length, especially for  $^1\text{O}_2$  that possesses a shorter half-life compared with other ROS, (ii) the photostability in a given environmental medium, and (iii) the chemical properties of PSs (e.g., molecular size, charge, lipophilicity, stability), which influence the interactions of the latter with target microorganisms [26]. Photoinactivation of Gram(+) bacteria can be obtained with a given PS, irrespective of its charge, whereas that of Gram(−) bacteria generally requires a cationic PS, or a combination of a neutral PS with membrane-disrupting agents [27].

Internalization of PSs in prokaryotic or eukaryotic cells can also occur, thus causing various intracellular oxidative damage (such as in organelles in eukaryotic cells, e.g., nucleus and mitochondria in fungal cells) [28]. To protect their intracellular components, microbial cells can induce the production of antioxidant defenses such as protective enzymes (such as superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathion (GSH)-peroxidase) or pigments (such as carotenoids acting as nonphotochemical  $^1\text{O}_2$  quenchers). Nevertheless, these mechanisms can be insufficient to thwart aPDT-induced oxidative stress because intracellular components (including antioxidant defenses) can be also irreversibly photodamaged by ROS [29]. The latter can act on the DNA level through two mechanisms, i.e., alteration or modulation. Breaks in single-strand and double-strand DNA, and the disappearance of the super-coiled form of plasmid DNA have been reported in both Gram(+) and Gram(−) species. Indeed, PSs can interact with nucleic acids via electrostatic interactions and induce reduction of guanine residues causing DNA cleavage [30]. Again, microorganisms can induce the overproduction of proteins involved in the repair of photodamaged DNA; however, some bacteria, such as *Helicobacter pylori*, possess only a few of such protective repair mechanisms [31]. Upon PDT treatment, ROS and  $^1\text{O}_2$  can modify bacterial gene expression profiles by modulating (i) the quorum sensing pathway, therefore inhibiting biofilm formation as shown in in vitro models, and/or (ii) the anti-virulence activities by reducing the gene expression of virulence factors in diverse clinical pathogens [32–35].

Given the multi-targeted nature of aPDT, the possibility for microorganisms to develop resistance is supposed to be very limited [36]. However, they may be able to respond to aPDT in different ways. For instance, light response adaptation can occur in some microorganisms, such as *E. coli* upon exposure to blue light inducing the production of a biofilm polysaccharide colonic acid [37]. Moreover, some PSs are substrates of efflux systems that may be overproduced; specific inhibitors of the latter can be used to restore phototoxicity [38–40]. After sublethal aPDT, the biofilm-forming ability of bacteria can increase, making them less susceptible to the same treatment [41]. Each strategy should thus be carefully examined with regard to the ability of target microorganisms to adapt and escape treatments. The latter may be noticeably reduced when using at the same time multiple antimicrobial molecular partners and modalities (read below).

### 2.3. Important Parameters and Requirements for an “Ideal” aPDT

According to Cieplik et al. [12], an “ideal” aPDT system should meet the following set of general requirements: (i) PS physicochemical properties: efficient PSs for aPDT possess most frequently a high hydrophilicity index and at least one cationic charge promoting interactions with pathogens, especially Gram(−) bacteria; (ii) PS photosensitivity: following irradiation, a good PS produces a high rate of cytotoxic oxygen species (Figure 1A), depending notably on its  $^1\text{O}_2$  quantum yield, its stability, and the environmental media; (iii) light source parameters: efficient irradiation of PSs must take into account a coherent light exposure ensuring a good transmittance efficiency with no side effects; (iv) safety: the PS has to be specific to target microorganism(s), inducing insignificant or only a few side effects for the host, including no or few immunity responses; and (v) ease for implementation in clinical practice: aPDT has to be relatively easy to use (due to the rapid, non-aggressive, and non-invasive light application), cost-effective, and accessible. It is obvious that the detailed specification of requirements can vary depending on the target applications. The

improvement of PSs is an ongoing challenge that implies moving towards more rational chemical engineering and biological investigations [11,42], as discussed in this review.

### 3. Positioning of aPDT in Current Human Healthcare Treatments

Over the past years, the number of studies dealing with aPDT has dramatically increased, emphasizing the potential of this therapeutic approach to treat a broad spectrum of microorganisms including bacteria, fungi, viruses, and parasites (Figure 1B). In this part, recent in vitro screening studies, preclinical (using animal models) and clinical investigations are briefly reviewed. Details about the PSs involved and their structures are provided in Section 4 “State of the art with recent photo(nano)system developments”.

#### 3.1. Curative Preclinical aPDT

##### 3.1.1. Treatment of Bacterial Infections

PDT is a promising alternative approach to antibiotherapy for photoinactivating a broad spectrum of bacterial pathogens, either Gram(+) or Gram(−), responsible for diverse infections in humans. The antibacterial versatility of PDT can be highlighted in different ways, notably by considering lists of critically important human pathogens. First, in recent years, more attention has been paid to the potential of aPDT to fight against bacteria involved in hard-to-treat infections, especially those forming the ESKAPE group [2,43]. Second, other critical pathogen lists can be considered, such as the NIAID emerging infectious diseases/pathogens category that includes biodefense research and additional emerging infectious diseases/pathogens. To our knowledge, the susceptibility of more than 50% of the bacteria in the NIAID critical pathogen list has been considered in at least one aPDT study. In other words, bacteria causing the worst endemic infections including anthrax, botulism, melioidosis, cholerae, plague, and tuberculosis have already been considered. On the opposite, vector-borne diseases transmitted by human parasites, such as *Borrelia mayonii* and *Bartonella henselae* have not been addressed in that regard yet. Multiple experimental settings have been considered to demonstrate the potential of aPDT to photoinactivate pathogenic bacteria, growing as planktonic forms, but also in biofilm matrices, and using diverse animal models [44,45]. Among human pathogens, bacteria implicated in oral infections, especially cariogenic, periodontic, and endodontic injuries, have probably been the most intensely investigated [46]. Although less considered, other indications have also been evaluated with aPDT, including osteomyelitis, meningitis, pneumonia, lung abscess, and emphysema [47,48].

##### 3.1.2. Treatment of Fungal Infections

Fungal infections caused by invasive candidiasis are widely recognized as a major cause of morbidity and mortality in the health care environment [49]. In addition to the opportunistic features of some fungi, resistance to first-line antifungals (such as echinocandins and fluconazole) is spreading, compromising the efficiency of conventional antifungal therapies. Despite the fact that yeasts are naturally more resistant to PDT than bacteria, noticeable in vitro and in vivo effects against fungal infections have been reported, including germ load reduction, biofilm inhibition and clearance, and eradication of persistent colonization [50–53]. Furthermore, antifungal PDT has demonstrated its potential as an adjunctive (potentially synergistic) treatment procedure to the conventional fungicide Nystatin [54]. Chen et al. identified and summarized other fungal infections that may be treated with aPDT, including *onychomycosis*, *tinea cruris*, *pityriasis versicolor*, *chromoblastomycosis*, and the cutaneous *sporothricosis* [55]. Recently, other fungal infections, such as fungi associated to *mucormycosis* (recognized as emerging critical pathogens in the NIAID) were successfully treated with PDT [56].

##### 3.1.3. Treatment of Viral Infections

Although vaccines have drastically reduced the spreading of some of the most virulent viruses around the world, antiviral research and development remain a healthcare priority

notably due to emerging viral infectious diseases [57]. PDT holds promises to help treat the latter, as well as other viruses implicated in complications of some cancers. The oldest, but also the most current, application of antiviral PDT concerns the decontamination of blood products potentially containing hepatitis B/C or West Nile virus [23,58]. The PDI of viral infections was explored in many studies considering other various viruses including arbovirus, SV40, poliovirus, encephalitis virus, phages, and HSV [59,60]. In addition, emerging viruses such as Zika, Ebola, or Tickborne hemorrhagic fever viruses have been considered [23], as well as viruses responsible for epidemic/pandemic crises such as influenza virus, SARS-CoV-2 virus, and its mutants/variants [61,62].

#### 3.1.4. Treatment of Parasite Infections

Drug resistance is also rapidly spreading in parasites. For example, resistance to artemisinin (which is used to treat plasmodium infections causing malaria) increases drastically, even when combined with other drugs (WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, accessed date: 1 September 2021). Antiparasitic effect of PDT was demonstrated toward critical parasites in public health such as tropical pathogens including Leishmania, African trypanosoma, and Plasmodium [63,64]. Another way to limit the propagation of the vectors is to rely on photoinducible biolarvicides. Such an approach was investigated in order to control Aedes, Anopheles, and Culex, which are tropical disease-carrying species [65,66]. This was also investigated in Lyme disease using safranin-PDT for reducing the reproduction of ticks [67].

#### 3.1.5. Treatment of Polymicrobial Infections

Quite recently, interest has grown to explore the potential of aPDT against polymicrobial infections involving multispecies pathogens. A study demonstrated that the susceptibility to PDI of *S. aureus* and *C. albicans* growing in mixed biofilms is lower compared with single-species biofilms, which may be due to the difference in the chemical composition and viscosity of the composed matrix [24]. Nevertheless, aPDT applications are of interest regarding hard-to-treat infections due to polymicrobial biofilms colonization, such as chronic rhinosinusitis. They could effectively be eradicated by aPDT in a maxillary sinus cavity model [68]. Moreover, Biel et al. showed that aPDT can eradicate polymicrobial biofilms in the endotracheal tubes, which are factors leading to ventilator-associated pneumonia [69]. More recently, aPDT was shown capable of significantly improving wound healing in mice with polymicrobial infections [70]. However, such an approach remains a challenge due to the respective affinity of PSs to each species being usually reduced in polymicrobial systems.

### 3.2. Current Clinical aPDT Practices

Many clinical trials have been done for evaluating aPDT approaches in the treatment of bacterial/fungal oral infections. This is facilitated by the development of easy to use light sources in dentistry. On the opposite, it can be compromised by the development of persistent (multispecies) biofilms. Skin infections such as *Acnes vulgaris*, caused by *Propionibacterium acnes*, was one of the first microbial infections to reach the stage of aPDT clinical trial. A few clinical trials demonstrated that onychomycosis, such as *tinea cruris*, *tinea pedis*, and interdigital mycoses, could be treated with aPDT. Results demonstrated that aPDT is effective and well-tolerated, but infections can recur frequently [71,72]. Among cutaneous infections, non-healing chronic wounds in patients with chronic leg and/or foot ulcers were efficiently treated with aPDT, inducing a significant reduction in microbial load (even immediately after the treatment), a better wound healing, and no safety issues [73,74]. Osteomyelitis in patients with chronic ulcers can be treated with aPDT to prevent gangrene and amputations in the extremities of diabetic patients [75]. Clinical studies for treating *H. pylori* in gastric ulcers can be conducted using phototherapy without any PS administration; *H. pylori* naturally accumulates intracellular PSs (porphyrins) and therefore could be inactivated by phototherapy thanks to an ingenious blue/violet light delivery system [76]. A list of recently closed aPDT clinical trials is provided in Table 1; many other trials (not shown here) are still ongoing.

**Table 1.** List of some recently completed or terminated clinical trials that evaluated aPDT to treat diverse infectious diseases.

Medical Conditions	Target Micro-Organism(s)	Photosensitizer	Trial Phase	Number and Year
Acne	<i>Propionibacterium acnes</i>	Butenyl ALA	N.A.	NCT02313467, 2014
		Lemuteporfin	Phase 1/2	NCT01490736, 2011
		5-ALA	Phase 2	NCT01689935, 2012
		Methyl aminolevulinate	Phase 2	NCT00673933, 2013
		TBO	Phase 1	NCT02479958, 2015
Dental caries	<i>Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Lactobacillus casei, Fusobacterium nucleatum, and Atopobium rima</i>	MB	Phase 1	NCT02479958, 2015
		N.C.	N.A.	NCT03309748, 2017
		<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Tannerella forsythia and Porphyromonas gingivalis</i>		
Denture-related stomatitis	<i>Candida albicans</i>	MB	Phase 4	NCT02642900, 2015
		N.D.	Phase 1	NCT02337192, 2015
Orthodontic	N.D.	Curcumin	Phase 1	NCT02337192, 2015
		N.D.	Phase 3	NCT02848482, 2016
Peri-implantitis	N.D.	MB	N.A.	NCT03750162, 2018
		ICG	Phase 2	NCT02043340, 2014
		Methyl aminolevulinate	Phase 2	NCT00933543, 2013
		MB	N.A.	NCT03262077, 2017
		MB	Phase 2	NCT03074136, 2017
Periodontic	<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Tannerella forsythia and Treponema denticola</i>	Phenothiazine hydrochloride	Phase 4	NCT03498404, 2018
		TB	Phase 4	NCT03412331, 2018
		5-ALA	Phase 2	NCT02355899, 2015
		MB	Phase 2	NCT02824601, 2016
		Human Papillomavirus (HPV)	Phase 2	NCT02631863, 2015
Distal subungual onychomycosis	Fungi infecting nails	5-ALA	Phase 2	NCT02355899, 2015
		MB	Phase 2	NCT02824601, 2016
Endodontic	<i>E. faecalis and C. albicans</i>	5-ALA	Phase 2	NCT02631863, 2015
		PPA904	Phase 2	NCT00825760, 2009
HPV infection	<i>Human Papillomavirus (HPV)</i>	5-ALA	Phase 2	NCT02631863, 2015
		PPA904	Phase 2	NCT00825760, 2009
Leg ulcers	Streptococci, anaerobes, coliform, <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , yeast, and diphtheroids	PPA904	Phase 2	NCT00825760, 2009

Studies collected from [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=photodynamic+therapy>, Accessed Date: 1 March 2021). ALA, alanine; MB, methylene blue; N.A., not applicable; N.C., not communicated; N.D., not determined; PPA904, 3,7-bis(di-*n*-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide; and TB (or TBO), toluidine blue.

### 3.3. Toward Preventive/Prophylactic Treatments

Beside curative antimicrobial treatments, PDT may be also used to decontaminate medical equipment and tools in hospitals, for preventive/prophylactic aims [27]. For example, photoantimicrobial textiles were reported to efficiently photoinactivate bacteria and viruses, suggesting that self-sterilizing medical gowns could be developed [77]. PDT can also decontaminate medical tools similarly to conventional chemical agents, as demonstrated in a recent comparative study [78]. Its application for the decontamination of routine informatics tools, office equipment, or packing materials demonstrates sterilization potential that could be useful to avoid hospital-acquired infections and to protect healthcare workers. Furthermore, photodisinfection of water and photoinactivation of food-borne pathogens can bring substantial benefits to people's daily lives [65].

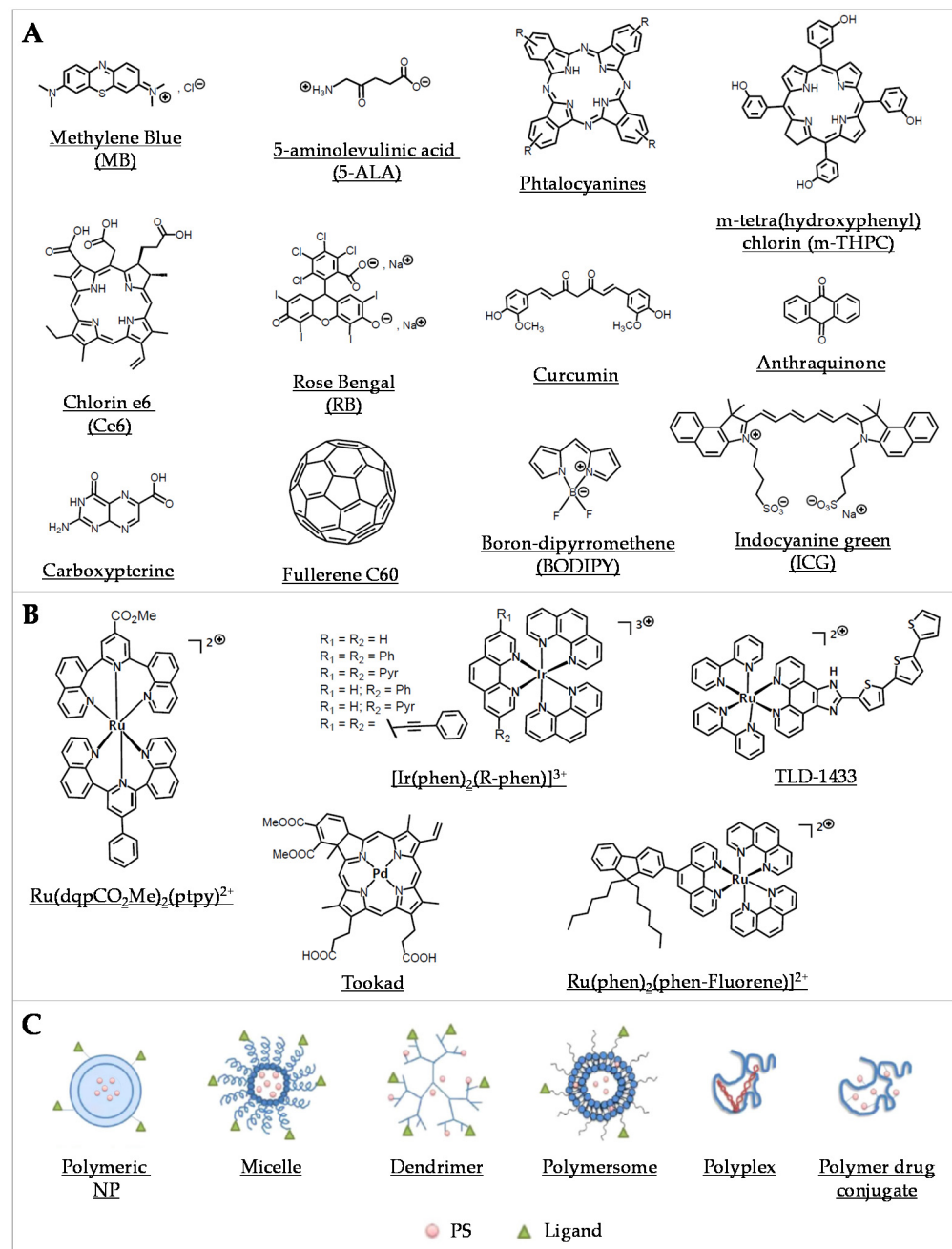
## 4. State of the Art with Recent Photo(nano)System Developments

### 4.1. Single PSs

#### 4.1.1. Organic PSs and Their Derivatives

Organic PSs used in aPDT have been well described in some recent reviews [79–81] (Figure 2A). Briefly, since the first use of eosin in 1904, various PSs were investigated, especially in the phenothiazinium group, which includes methylene blue (MB) and toluidine blue O (TBO). Thanks to an absorption spectrum in the red region of light, these PSs can be effective in tissues while being less toxic than other PSs. Their aPDT properties are mostly due to a high ROS production following Type I mechanism (Figure 1A). Structural derivatives have been also reported, including new MB and dimethyl-MB [42]. Another group gathers compounds featuring a macrocyclic structure composed of pyrroles, such as porphyrins and its precursor 5-aminolevulinic acid (5-ALA), phthalocyanines, and chlorins. Macrocyclic compounds are generally hydrophilic, positively charged, and they exhibit a good singlet oxygen quantum yield. Modifications of their chemical structure were intensively studied, especially for porphyrins and phthalocyanines [82–87]. The halogenated xanthenes gather PSs with a structure similar to that of fluorescein. Among them, eosin Y, erythrosine, and rose bengal (RB) were the most studied [88–90]. These compounds are anionic, which can limit their interaction with bacterial cells and their aPDT effect in spite of good singlet oxygen quantum yields. Natural compounds, including coumarins, furanocoumarins, benzofurans, anthraquinones, and flavin derivatives are often found in plants and other organisms. They are characterized by an absorption spectrum in white light or UVA. The most used are curcumin, riboflavin, and hypericin [7,80]. Nanostructures such as fullerenes are interesting PSs because of their ability to modulate Type I and Type II reactions (Figure 1A), depending on the near environment and the light source applied [91,92]. In this family, some quantum dots (QDs) can act as photoantimicrobials [80]. Other synthetic fluorescent dyes such as organoboron compounds (e.g., boron–dipyrromethene (BODIPY)), and cyanine dyes (e.g., indocyanine green (ICG)) are known for their high photostability, high extinction coefficients, and high fluorescence quantum yields [93].

Over the past five years, some new organic PSs were reported. Among them, optimized natural PSs such as anthraquinones and diacetylcurcumin can be listed. Others include derivatives of synthetic dyes such as monobrominated neutral red or azure B [79–81] (Figure 2A).



**Figure 2.** Representative compounds in various classes of PSs used in aPDT. (A) Examples of some organic PSs and their derivatives. (B) Examples of metallic-based PSs. (C) Different types of polymer-based PS carriers, which can be functionalized with ligands for specific target delivery (Adapted from [94], published by MDPI, 2020).

#### 4.1.2. Coordination and Organometallic Complexes-Based PSs

Distinctly from metal nanoparticles (NPs; see Section 4.2.1 “Metal-based systems”), metal complexes, either coordination or organometallic complexes, are of increasing interest as PSs in PDT [95] (Figure 2B). They generally consist of a central metal core combined with ligands, involving coordinate covalent bonds (in coordination compounds) or at least one metal–carbon bond (in organometallic compounds). Compared with organic compounds, metal complexes have been notably much less considered and still remain largely underexploited regarding their potential use as new antibiotics [96]. Frei et al. recently reported on the antimicrobial activity of 906 metal-containing compounds. They showed that, consid-

ering antimicrobial activity against critical antibiotic-resistant pathogens, metal-bearing compounds displayed hit rates about 10 times higher than purely organic molecules [97].

Metal complexes display a panel of specific properties that make them promising PSs candidates. The variety of metal ions and ligands can be assembled in scaffolds featuring very diverse geometries [97,98]. Whereas most organic PSs are linear or planar molecules, metal complexes can exhibit much more complex—three-dimensional—geometries, which can improve interaction and molecular recognition with cellular targets, enlarge the spectrum of activity, and impact on biological fate [98–100]. Furthermore, the modulation of the design of metal complexes allows to fine tune their hydrophilic–lipophilic balance, solubility, photophysical properties, and eventual “dark toxicity” (i.e., the toxicity in the absence of specific irradiation). Metal complexes can display many excited-state electronic configurations associated with the central metal, the ligands, or involving both the metal and the ligand(s) in charge-transfer states (metal-to-ligand charge transfer or ligand-to-metal charge transfer). Although it is not always considered, the investigation of excited states of metal complexes (Figure 1A) is however of prime importance. Triplet states can be more easily accessed due to the enhanced spin-orbit coupling induced by the presence of the heavy metallic atom. Compared with natural PSs, metal complexes can act, besides ROS generation, via other mechanisms including redox activation, ligand exchange, and depletion of substrates involved in vital cellular processes [96,97,101].

Besides their first intended development as anticancer compounds, metal complexes have also been envisaged as potential “metallo-antibiotics”, benefiting from the knowledge accumulated about their chemical properties and biological behaviors [102]. Quite recently, several metal compounds were characterized for their activity in aPDT. For instance, platinum(II), molybdenum(II), ruthenium(II), cobalt(II), and iridium(III) were proposed as new classes of stable photo-activatable metal complexes capable of combating AMR [11,103–108]. In particular, many mononuclear and polynuclear Ru(II/III) complexes have been considered as potential antibiotics, antifungals, antiparasitics, or antivirals, which have been recently extensively reviewed [107]. It is worth noticing here that, within a series of 906 metal compounds, ruthenium was the most frequent element in active antimicrobial compounds that are nontoxic to eukaryotic cells, followed by silver, palladium, and iridium [97]. Ru(II) polypyridyl complexes were assayed in several aPDT studies. For instance, Ru(DIP)<sub>2</sub>(bdt) and Ru(dqpCO<sub>2</sub>Me)<sub>2</sub>(ptpy)<sup>2+</sup> (DIP = 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline, bdt = 1,2-benzenedithiolate, dqpCO<sub>2</sub>Me = 4-methylcarboxy-2,6-di(quinolin-8-yl)pyridine) and ptpy = 4'-phenyl-2,2':6', 2''-terpyridine) were tested with *S. aureus* and *E. coli* [109]. The complexes were found active against the Gram(+) strain and to a lesser extent against the Gram(−) strain, such difference in susceptibility being commonly reported in studies using other PSs [110] (Figure 2B). This observation was further detailed and rationalized by us when investigating a collection of 17 metal-bearing derivatives; two neutral Ru(II) complexes (Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and Ru(phen-Fluorene)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) as well as a mono-cationic Ir(III) complex (Ir(phen-Fluorene)(ppy)<sup>2+</sup>; ppy = phenypyridyl ligand) were found almost inactive, whereas a dicationic Ru(II) (Ru(phen-Fluorene)(phen)<sub>2</sub><sup>2+</sup>) was found to be the most active against a panel of clinical bacterial strains [11]. More recently, Sun et al. described a Ru(II) complex bearing photolabile ligands; they showed its ability to safely photoinactivate intracellular MRSA while inducing only negligible resistance after bacterial exposure for up to 700 generations [111]. Although the precise mechanism(s) of action is not well-established in every case, Ru(II/III) compounds are also increasingly considered for their potential anti-parasitic activity for combating neglected tropical diseases such as malaria, Chagas' disease, and leishmaniasis. Moreover, potent antiviral activities have been noted for the ruthenium complex BOLD-100, particularly against HIV and SARS-CoV-2 [112]; importantly, this compound appears to retain its activity on all mutant strains of the SARS-CoV-2 [107]. All combined, metal complexes—especially ruthenium-based compounds—can display antimicrobial activity via multiple, likely synergistic, mechanisms, involving notably their ability to produce ROS. Therefore, they are of major interest for a wide range of aPDT-related applications.

#### 4.2. Multicomponent PSs and Nanoscale Implementation: Extension to Nanoedifices with PSs

The eventual limitations in the use of singular photoactive molecules as PSs for aPDT applications reside notably in the recurrent lack of solubility and stability in the target media (typically leading to aggregates and/or PS quenching), biocompatibility (“immune stealth”) and bioavailability, but also in the relative absence of selectivity for a prospected target (e.g., efficiency in the interactions with a defined target, stimuli-responsive or alternate triggers for controlled release). Thus, the widespread nanoscale implementation into the development progress of upgraded PSs has indubitably provided significant flexibility to first address these drawbacks, and implicitly contribute to the optimization of the aPDT activity via an extensive panel of mainly exclusive features specific to nano entities; the latter typically include an advantageous surface to volume ratio (with a high PS per mass content), access to unique chemical/physical/biological properties (e.g., optical properties with QDs or magnetic ones with superparamagnetic iron oxide NPs (SPIONs)), and almost inexhaustible synthetic options in the design of nanoplatfoms [113–115].

Due to their paramount structural diversity and intrinsic variety of properties, the classification of the so-called “PS nanosystems” or “nano-PSs”—which partly include and overlap with “conjugated systems” and “combinatorial strategies”—remains rather challenging; however, we can usually identify the following criteria as the main pillars to rationalize and compare these aPDT nanomaterials [27,80,116]:

- (i) Role(s) and nature of the nanocomponent(s) in the PS nanosystems: the two criteria typically considered for the discrimination of nano-PSs are the role and nature of the nano building block(s) involved. With regards to the role of the latter, we can conventionally discern on the one hand the “PS nanocarriers” (e.g., polymersomes or Au NPs) in which the nanomoiety acts as a delivery system for singular PS molecules (e.g., MB) while either complementing, facilitating, or enhancing the aPDT activity (depending on the nature and eventual intrinsic properties of the nanovector), and on the other hand, the “PS active” nanoagents with the nanocomponent endorsing the role of PS. Among the examples, some versatile nanotemplates may ultimately display a dual role, i.e., “active PS” and “PS conveyor” (e.g., ZnO NPs), while distinct nanomoieties might be simultaneously required for the design of utterly sophisticated hybrid nano-PSs (e.g., Au@AgNP@SiO<sub>2</sub>@PS) [117,118]. In addition to the chemical composition, the nature of the nano building block(s) will also be defined by the fundamental characteristics of nano-objects, such as size, shape, topology, and crystal structure, which will all ineluctably contribute to tailor the biological behavior of the nanomaterials and the interactions with the targets (e.g., with the membranes of the bacteria) [119]. Moreover, for the same nanocore, the nature and role of the eventual surfactant(s) involved (e.g., silica coating or poly(ethylene glycol) (PEG) coating for metal NPs) can drastically alter the overall behaviors of the nanosystems.
- (ii) Type of interactions between the nano entity and the PS, and localization of the PS in the nanosystems: other criteria of relevance when describing nano-PSs—specifically PS nanocarriers—reside in the nature of the interactions between the nanocomponent and the PS molecules involved, but also the location of the PSs. Thus, we can distinguish the common cases of PS molecules “embedded” within a nanovector either by physisorption or functionalized (chemisorption), and alternately the nanoplatfoms with surfaces decorated with PSs, again, either by physical or chemical adsorption. The differences between the two types of interactions and distinct localizations of the PSs implicitly imply distinctive chemical engineering and related requirements, and may potentially impact the resulting stability of the nanoedifices, but also the aPDT activity. For instance, in the case of PS molecules located inside the edifice and not released, the selected “nanomatrix” should adequately permit the photoactivation process of the internalized PSs, be sufficiently porous/permeable to both triplet and singlet oxygen and eventual ROS generated by the photosensitizers (i.e., efficient internal diffusion of molecular oxygen to react with the PSs then external diffusion of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> to the targets) while also presenting inertness to the latter to not compromise or

quench the aPDT activity. Meanwhile, with surfaces of nano-objects decorated with PSs, the PSs may then contribute to some extent as an interface with the biological medium or the target.

- (iii) Biological impacts of the PS nanosystems: in addition to the biocompatibility and aPDT efficiency (including the critical concentrations just as the half-maximal effective concentration  $EC_{50}$ , minimum inhibitory concentration MIC, or 50% growth inhibition concentration  $GIC_{50}$ ), the eventual biodegradability, elimination process, or ecotoxicity of the aPDT nanomaterials can markedly vary from one system to another (based on factors such as composition and size/shape), but are rather difficult to evaluate or compare; ergo, these factors are not systematically addressed in the reports.
- (iv) Relative sustainability of the nano-PSs for aPDT applications: the reproducibility, eco-friendliness, and cost-effectiveness parameters of the synthetic protocols and production of aPDT nanomaterials, as well as the ease of storage and use, and the stability over time are also ultimately to be evaluated for any system aiming to be viable and reasonably applied; however, similar to (iii), these parameters are complex and so scarcely investigated.

Thus, in the overview presentation of the different PS nanosystems hereafter, the chemical features (i) and (ii) have been conventionally defined as the main criteria for the classification. Alternatively, the nature of the aPDT applications has also been used as the main criterion for classification in some references [120]. Another approach consists of systemizing all the nanosystems dedicated to a given PS (e.g., curcumin) [121].

Within the extensive collection of aPDT nanomaterials reported to date, the majority belongs to the category labeled as “PS nanocarriers” with the nanocomponent acting as a delivery system for PS molecules; however, increasing examples involving PS-active nano building blocks have emerged as well. Overall, this multipurpose role of the nanomoiety may include avoiding aggregation (e.g., dimerization, trimerization) and correlated PS quenching, enhancing “solubility” (i.e., dispersibility), stability and bioavailability, allowing “biological stealth”, on-demand release and target specificity, and ultimately triggering eventual synergistic aPDT activity with the complementary or ameliorative intrinsic properties of the nanocomponent; although irrevocably confirmed in many nano-PSs, the mechanisms involved in the synergy may differ from one system to another, and often remain partly or integrally unresolved due to the complexity of these tacit multiparameter contextures [113]. It is noteworthy that most systems comprise “classic”/“traditional” organic PSs (natural or synthetic, e.g., curcumin, MB) with fewer examples involving metal-lated PS molecules such as the recent review from Jain et al. dedicated to ruthenium-based photoactive metalloantibiotics [108]. Among aPDT nanomaterials, we can thus identify various families of nanoplatforms based on the nature of the nanocore, starting here with the inorganic vectors followed by the organic templates; as an indication, in the common cases of “multi-component nano-PSs”, the classification has been defined hereafter according to the main/prominent nano building block involved in the composition, i.e., metal-based systems, silicon-based systems, carbon-based systems, lipid-based systems, and polymer-based systems. Regarding the following presentation of aPDT nanosystems, it is important to specify that it is not exhaustive, but instead provides a panorama of the main categories of nanosystems—either colloids or surfaces [27,122]—and their related specificities, with an emphasis on recent developments.

#### 4.2.1. Metal-Based Systems

Metal-based nanostructures have been extensively investigated—both as “PS cargo” and PS active entities—through the exploration of the richness and diversity of the respective subcategories related to this class of compounds, as detailed below. Each of the below-mentioned inorganic classes presents distinct specificities of relevance for aPDT applications, with a choice to be defined on a case-by-case basis according to the target, the nature of the PSs involved (with possible preferential affinity), or the anticipated complementary or synergistic role of the selected nano entity (based upon its chemical, physical,

and/or biological features, with the eventual PS molecules located either at the surface of the NPs or within, when present). It is important to notice that the nanocores from each subcategory can be either further implemented, with silica or polymer coating for example, or combined (multicomponent nano-PSs) in order to adequately optimize the efficiency of the systems [117]; however, the outcomes of these hybridity processes are complex to anticipate with systematic rationality, with either enhancement or quenching of the properties observed depending on the composition of the combinations.

### Metal NPs

Metal NPs—mainly gold, but also silver—maybe considered among the “gold standards” in nanomaterials through the history and expansion of nanosciences in terms of dedicated publications and vastness of related possible applications [123]. As already well documented for Au and Ag NPs, the reasons are numerous and reside notably in their relatively easy accessibility with low-cost and highly reproducible (large scale) biogenic and chemical synthetic routes, in addition to the flexibility to finely tailor the properties via a refined size and shape control (with narrow size distribution and diverse shapes), and the facility for functionalization with various types of molecules. Moreover, gold NPs display biocompatibility, low toxicity, and immunogenicity, almost chemical inertness (distinctly from their inherent catalytic properties), while silver nanomaterials present intrinsic antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganisms and related MDR infections (e.g., towards Gram(−) and Gram(+) mature biofilms of MRSA), and disruption of biofilm formations while being safe for mammalian cells [124–126]. Ultimately, both Au and Ag NPs share nano features specific to noble metal systems, i.e., localized surface plasmon resonance (LSPR, arising from their resonant oscillation of their free electrons upon light exposure) and resonance energy transfer (RET), with subsequent optical and photothermal properties of enhancing appositeness in aPDT applications and PDI efficacy (e.g., ROS production) [127–129]. For the most part, Au and Ag NPs of various shapes (e.g., spheres, rods, cubes) are combined with organic PS molecules such as RB and MB [128–136], but also with metallated PSs such as ruthenium complexes, metallophthalocyanines, and metalloporphyrins [108,137,138]; the corresponding PS nanovehicles can also be labeled as “conjugates” but they strictly differ from the “mixtures” involving metal NPs and PS molecules [139]. Other noble metal NPs, viz., platinum, have also been employed in aPDT applications due to their multitarget action to inactivate microbes, although to a lower degree up to now owing to synthetic limitations [27,140]. Alternately, redox-active copper NPs are typically less costly and easier to access and present unique features among which the faculty to generate oxidative stress to various microbes through the genesis of ROS [141], such as in the recently developed copper–cysteamine (Cu–Cy) nano-PS that can be activated either by UV, X-ray, microwave, or ultrasound, to produce ROS against cancer cells and bacteria [142,143]. More unwontedly, approaches to treat subcutaneous abscesses lead to the use of acetylcholine (ACh) ruthenium composite NPs (ACh@RuNPs) as an effective appealing PDT/PTT dual-modal phototherapeutic killing agent of pathogenic bacteria, with ACh playing a role in targeting the bacteria and promoting the entry into the bacterial cells [108]. While belonging to the same category, each metal displays particular specificities; consequently, with the objective of optimization, nano-PSs resulting from alloys or multimetallic NPs have been further designed such as the Au@AgNP@SiO<sub>2</sub>@PS and AA@Ru@HA-MoS<sub>2</sub> (AA: ascorbic acid, HA: hyaluronic acid) nanocomposites [117,118].

### Metal Oxides

Similar to gold and silver, metal oxides such as iron oxide, titanium oxide and zinc oxide have been cornerstone contributors in the global evolution of applied nanomaterials (particularly in medicine), due notably to intrinsic magnetic and optical nanoscale features, with the latter typically available at “room temperature” and commonly finely tunable via shape, size, and crystal structure parameters [144]. Indeed, specific single-domain superparamagnetic iron oxide NPs (SPIONs)—either magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) or maghemite

( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) of various shapes and sizes, including ferrite or doped derivatives—exhibit an outstanding magnetization behavior with no remanent or coercive responses upon exposure to a magnetic field. As a result, such magnetic NPs have legitimately generated interest and use as magnetic resonance imaging (MRI) and magnetic particle imaging (MPI) agents, as well as magnetic fluid hyperthermia (MFH), magnetic cell separators [145], or drug delivery conveyers with the possibility to guide the NPs to the targeted area via external magnetic fields [146]. More recently, iron oxide nano-objects proved to be also of pertinence for aPDT applications not only as a magnetic “nanocargo” for various organic and inorganic PSs such as curcumin, MB, ICG, BODIPYs, porphyrins, metallophthalocyanines, or ruthenium derivatives among others [27,108,147–155], but also with peroxidase-like activity to enhance the cleavage of biological macromolecules for biofilm elimination [156]. Extension in the design of more elaborate multicomponent architectures involving hybrid iron oxide nanocore led *inter alia* to Ag/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Ag/CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MnO<sub>2</sub> NPs conjugated with different PSs [27,117,147,150,151,157–160].

Other oxides have also drawn heavy attention, in particular zinc oxide and titanium oxide, as the photophysical properties of these wide bandgap semiconducting nanomaterials efficiently translate into a multi-level antimicrobial activity including PS vessel and/or PS active agent (with possible coupled aPDT response), and/or membrane disruptor [161–164]. Thus, ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoplateforms possess the ability to alter microbes’ integrity—through alternate mechanisms involving ROS and/or metallic ions—in the dark or via photoactivation [165]. The latter is customarily triggered by UV or X-ray irradiation, with the eventual possibility to adequately shift to other wavelengths such as visible light irradiation in virtue of diverse modification methods of the oxides encompassing notably: doping or surface alteration (e.g., F-doped ZnO, coatings or oxygen deficiency), coupling with other bandgap semiconductors (e.g., ZnO/TiO<sub>2</sub>) or sensitizing dyes, and composites [121,156,164,166–171]. Furthermore, beside the size and shape of the NPs, the crystallographic phase appears to be a tuning parameter of particular importance for the antimicrobial effects of some oxides, especially for TiO<sub>2</sub> with the distinction between the anatase, rutile, and brookite structures [172–175]. Although reported to a lesser extent, the list of alternate oxides exhibiting potential in aPDT applications comprises CuO/Cu<sub>2</sub>O, MnO<sub>2</sub>, and rare earth oxides to mention just a few [141,176–180].

#### QDs and Metal Chalcogenide Nanomaterials

Aside from zinc/titanium oxides, distinct semiconductors such as QDs and metal chalcogenide (e.g., metal sulfide) nanomaterials (involving elements from different groups in the periodic table) proved to be efficient disruptors against various multi-drug-resistant microorganisms. Due to their smaller size of a few nanometers (ca. up to 10 nm), QDs differ from other nano-objects with physical and optoelectronic properties governed by the rules of quantum mechanics, high chemical stability and resistance to photobleaching, and near-infrared (NIR) emission (typically above 700 nm) notably allowing for deep-tissue imaging [181]. Appositely comparable, metal chalcogenide likewise reveals unorthodox physio and physicochemical properties, accordingly garnering a legit interest for antimicrobial applications [182]. Consequently, not only can these nano building blocks carry PS molecules and alter the integrity of microbial walls/membranes or gene expression, but they may as well act as PSs; when coupled with other PSs, synergistic interactions in the QD-PS edifices might occur resulting from mechanisms such as Förster resonance energy transfer (FRET, non-radiative energy transfer from QD donors to PS acceptors) to generate free radicals and ROS. Among examples of such QDs and metal chalcogenide aPDT systems can be cited CdTe QDs and related CdTe-PS conjugates, CdSe/ZnS QDs combined with PSs, InP and InP-PS, Mn-doped ZnS, MoS<sub>2</sub>, but also CuS and CdS nanocrystals, with ultimately hybrid systems involving for instance CoZnO/MoS<sub>2</sub> or AgBiS<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> composites [123,183–196].

## Metal–Organic Framework (MOF) Nanoscaffolds, Upconversion Nanomaterials and Other Metal Ion Nanostructures

Although less investigated than the above-mentioned alternatives, other original metal-based nanostructures identified as MOF nanostructures, upconversion nanoplat-forms, and alternate metal ion nanomaterials tend to further consolidate their promising potential for aPDT applications. Considering their towering surface area and porous ordered structure with substantial loading capacity (e.g., adsorption of O<sub>2</sub> and ensuing photocatalytic production of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> via a heterogeneous process), stable versions of col-loidal nano-MOFs—or less common covalent organic frameworks (COFs), i.e., reticulation variants typically defined by non-metal “nodes” instead of metal ones—have emerged as efficient heterogeneous photosensitizers—with frameworks acting as PSs or entrapping PSs—towards antimicrobial applications (e.g., enhanced penetration for bacterial biofilms eradication), with porphyrin-based or porphyrin-containing MOFs and COFs, or Cu-based MOFs embedded with CuS NPs for rapid NIR sterilization among recently reported solutions [197–205].

Moreover, upconversion NPs (UCNPs) generally involve actinide- or lanthanide-doped transition metals and refer to the nonlinear process of photon upconversion, viz., a sequential absorption of two or more photons resulting in an anti-Stokes type emission (i.e., emission of light at a shorter wavelength than the excitation wavelength); when translated into biomedical context, UCNPs can be typically activated by NIR light—characterized by deeper tissue penetration and reduced autofluorescence, phototoxicity, and photodamage when compared with UV or blue light—and produce high energy photons for optical imag-ing or more recently aPDT when combined with PSs [206–209]. Intrinsically limited by low upconversion quantum yield, the current focus consists of developing hybrid UCNPs to im-prove aPDT efficiency; thus, auspicious progress has been achieved with examples such as {UCNPs (NaYF<sub>4</sub>:Mn/Yb/Er)/MB/CuS-chitosan} multicomponent nanostructured system revealing a superior antibacterial activity with the UCNPs enhancing the energy transfer to MB, the CuS triggering synergistic PDT/PTT effects, and chitosan assuring stability and biocompatibility [156]. Other examples also include silica coating β-NaYF<sub>4</sub>:Yb, Er@NaYF<sub>4</sub> UCNPs loaded with MB as PS and lysozyme as a natural protein-inducing bacterial au-tolysis, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NaGdF<sub>4</sub>:Yb:Er combined with the photo/sonosensitizer hematoporphyrin monomethyl ether (HMME), UCNPs@TiO<sub>2</sub>, N-octyl chitosan (OC) coated UCNP loaded with the photosensitizer zinc phthalocyanine (OC-UCNP-ZnPc), or the UCNPs-CPZ-PVP system (CPZ: β-carboxy-phthalocyanine zinc, PVP: polyvinylpyrrolidone) to name but a few [206,210–213].

Alternatively, more disparate metal-ion aPDT systems have been reported such as PS encapsulated dual-functional metallocationic vesicles against drug-resistant bacteria in-volving copper-based cationic metallosurfactant, or self-assembled porphyrin nanoparticle PSs ZnTPyP@NO using zinc meso-tetra(4-pyridyl)porphyrin (ZnTPyP) and nitric oxide (NO) [214–216].

### 4.2.2. Silicon-Based NPs

This category will be divided hereafter into two main subclasses—porous silicon (pSi) and (mesoporous) silica (SiO<sub>2</sub>)—which differ in the oxidation state of the silicon and display distinctive properties, more specifically different quenching behavior and photodynamic activity (singlet oxygen quantum yield under irradiation).

Porous silicon NPs (pSi NPs) are among the most promising types of inorganic nanocarriers for biomedical applications and have been intensively investigated since the first publication by Sailor et al. in 2009 regarding their application for in vivo treatment of ovarian cancer. Composed of pure silicon, pSi NPs indeed exhibit relevant features encom-passing not only pores with large capacity for drug loading combined with specific surface area allowing for implemental functionalization, but also degradability in an aqueous environment, and biocompatibility [217]. Moreover, porous silicon particles are known to be photodynamically active with related inherent antimicrobial properties by generation

of ROS under irradiation with light of a specific wavelength [218,219]. Because of the low quantum yield of singlet oxygen production from porous silicon itself, particles can be grafted with additional PSs, such as porphyrins, to enhance the yield of singlet oxygen generation and thereby antimicrobial properties for PDT applications [219,220]. Consequently, several silicon-based systems have been reported in recent years, mainly for PDT applications [221,222]. Furthermore, pSi NPs display intrinsic fluorescence, which can be applied for imaging and real-time diagnostics regardless of any surface functionalization [220,223].

As previously mentioned, pSi has a low singlet oxygen quantum yield due to quenching, which makes silica particles in comparison a more suitable substitutional system combining similar biocompatibility with improved optical properties. On the other hand, one of the pivotal advantages to use silica (SiO<sub>2</sub>) conjugates with PSs is to achieve a better “solubilization”—or more accurately, dispersibility—of hydrophobic dyes and a better photostabilization, thus limiting the self-photobleaching of PSs. Further advantages to name as the most important features of silica are high biocompatibility, antimicrobial properties, and high surface area for mesoporous silica that can be synthesized easily from commercially available precursors [27,224,225]. Furthermore, SiO<sub>2</sub> exhibits an effective PS-grafting capacity [226]; the latter can be accomplished via adsorption, covalent bonding, binding to the hydroxyl groups from silica surface, and entrapment during formation in silica particles or matrix [27]. Recently, Dube et al. reported about the photo-physicochemical behavior of silica NPs with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), and subsequently PS-modified surfaces for aPDT [150]. In addition, silica coatings have also been reported to prevent the degradation of nanocarriers (magnetite) and prolong the stability and functionality of PS systems [227]. Interestingly, coupling PSs to silica or Merrifield resin leads to distinct advantages; indeed, immobilized Ce6 notably displays significantly higher aPDT efficiency in comparison with the free form, which is probably due to an enhancement of the adhesion of PSs to bacterial cells resulting in a stronger cell wall disorganization [228,229]. Unsurprisingly, many approaches with encapsulated PSs in silica NPs for potential aPDT applications have been reported in recent years [229–232].

Distinctly, combinatory approaches involving other nanocomponents, such as silica-containing core-shell particles or silica-coated inorganic NPs, have emerged to further implement the properties of silica with the specific features (e.g., magnetic, photoactive, or antimicrobial properties) from other nanomaterials of relevance [118]. Thus, since the surface of silica can be easily grafted with PSs and is highly biocompatible, the surface modification of silica particles using metallic NPs (e.g., Ag NPs) to enhance the antibacterial photodynamic activity, has been developed for improved aPDT [233] while combinations with carbon quantum dots have been assessed for imaging-guided aPDT [234]. Another example refers to sufficient aPDT/PDI systems, more precisely to mesoporous silica-coated NaYF<sub>4</sub>:Yb:Er NPs with the PSs (silicon 2,9,16,23-tetra-tert-butyl-29H,31H-phthalocyanine dihydroxide) loaded in the silica shell to enhance bacterial targeting of *E. coli* and *S. aureus* [235].

In addition to silica-based NPs or silica-containing core-shell particles, lesser-known silica nanofibers also proved to be suitable substrates for potential aPDT, PDT, and PDI applications. As an illustration, Mapukata et al. [236] recently reported silver NP-modified silica nanofibers with embedded zinc phthalocyanine as PS for aPDT applications. The nanofiber-based substrates offer the advantage of fast removal after application, which can allow limiting any dark toxicity [236–238].

Silica NPs and fibrous or dendritic fibrous nanosilica have also been reported for the formation of nanocomposites to create antimicrobial photodynamically active surfaces for aPDT or PDI; to create such surfaces, silica NPs can be embedded into polymeric matrices for enhanced biocompatibility and complementary surface properties from the selected polymer [239].

Additionally, silica substrates and nanoconjugates offer a suitable platform for combinatory approaches since they can be easily modified. For example, Zhao et al. described polyelectrolyte-coated silica NPs modified with Ce6 [240]. These complexes could be

extracted, by bacteria, from silica NPs to form stable binding on the bacterial surface, changing the aggregation state of Ce6 and leading to both the recovery of PS fluorescence and  $^1\text{O}_2$  generation. Such bacteria-responsive multifunctional nanomaterials allowed for simultaneous sensing and treating of MRSA. Another approach is illustrated by the photo-induced antibacterial activity of amino- and mannose-decorated silica NPs loaded with MB against *E. coli* and *P. aeruginosa* strains [241]. The modification of silica substrates with mannose led to an increased targeting of *P. aeruginosa* and reduced dark toxicity of the systems.

#### 4.2.3. Carbon-Based Nanomaterials

Akin to silicon-based nano-objects, the notable diversity of allotropic customizable carbon-based nanostructures—either conveyers for traditional PS molecules or intrinsically PS active—legitimizes their distinct consideration in the actual classification of nano-PSs [242–244], with the following subcategories.

##### Fullerenes, Carbon Nanotubes (CNTs), and Nanodiamonds

In the evolution of carbon-based nano-objects, fullerenes and carbon nanotubes derivatives may be chronologically introduced as the “first generation”. Discovered in the mid-1980s, the proper  $\text{C}_n$  ( $n = 60\text{--}100$ ) spheroidal “soccer ball”  $\pi$ -conjugated structures of the fullerenes yield tremendous chemical modularity and electrochemical and physical properties, including photostability, the propensity to act as a PS via Type I or Type II pathways (Figure 1A) with high ROS quantum yield, and oxygen-independent photo-killing by electron transfer. Despite their intrinsic hydrophobicity typically requiring surface functionalization for biocompatibility and related dispersibility, they have proven even nowadays their effectiveness as broad-spectrum photodynamic antimicrobial agents, with photoactive antimicrobial coating based on a PEDOT-fullerene  $\text{C}_{60}$  polymeric dyad (PEDOT: poly(3,4-ethylenedioxythiophene)), BODIPY-fullerene  $\text{C}_{60}$ , diketopyrrolopyrrole-fullerene  $\text{C}_{60}$ , and cationic fullerene derivatives among recent examples [80,92,156,245–251]. Mainly developed a few years later, carbon nanotubes (CNTs)—either single wall CNTs (SWCNTs) describable simply as a single-layer sheet of a hexagonal arrangement of hybridized carbon atoms (graphene) rolled up into a hollow cylindrical nanostructure, or multiwall CNTs (MWCNTs) consisting of nested SWCNTs—unveil both independent capacities to produce ROS upon irradiation and high surface area for decoration with PS molecules [156]. Neoteric specimen of PS-CNTs encompass toluidine blue, polypyrrole, malachite green, MB, RB, and porphyrins [156,252–257]. Although purportedly older since it was discovered in the 1960s, diamond NPs or nanodiamonds seemingly remain the lesser known carbon-based nanomaterials to date; nevertheless, the latter dispose of legit aPDT arguments with their fluorescence, photostability, proclivity for conjugation with diverse PSs such as porphyrins or metallated phthalocyanines and silver NPs, but also inherent antibacterial activity [120,258–262].

##### Carbon QDs (CQDs)

As the next momentum in the blossoming of “nano-carbon” era, the carbon QDs were discovered in the early 2000s [263,264]. The physical and chemical properties of these fluorescent particles, commonly quasi-spherical with less than 10 nm in diameter, can be finely tuned upon size/shape variations or doping with heteroatoms (e.g., B, N, O, P, S) [263,265]. By virtue of their biocompatibility and dispersibility, photostability, low toxicity and related eco-friendliness, good quantum yield and conductivity, CQDs have been investigated for various applications, and more recently as antimicrobial agents; withal, their environment-friendly features combined with low cost and rather ecological biogenic or synthetic routes (from natural or synthetic precursors) place them advantageously as a viable scalable photocatalytic disinfection material compared with alternate nano-PSs. Late cases involve doped or hybrid CQDs or more conventional conjugates of CQDs with PSs [121,266–271].

### Graphene, Graphene QDs (GQDs), and Graphene Oxide (GO) Nanostructures

In a similar timescale to CQDs is the quantum leap discovery and blooming of graphene and graphene oxide materials. Graphene can be defined as a 2D allotrope of carbon, more accurately a monolayer of atoms with a hexagonal lattice structure (or single-layered graphite) and identifiable as the “building block” for the discrete fullerenes, 1D carbon nanotubes, and 3D graphite. Despite its stunning mechanical/electronic properties and chemical inertness, the limitations of graphene, such as zero bandgap and low absorptivity, lead to the ulterior conversion of the 2D graphene into “0D” GQDs [272,273]. Due to quantum confinement and edge effects, GQDs exhibit different chemical and physical properties when compared with other carbon-based materials, as well as a non-zero bandgap, good dispersibility, and propensity for functionalization and doping. Structurally, GQDs differ from CQDs because they comprise graphene nanosheets with a plane size less than 100 nm [272,274]. Likewise, graphene oxide (GO) is the oxidized form of graphene i.e., a single atomic sheet of graphite with various oxygen-containing moieties either on the basal plane or at the edges. Meanwhile, reduced graphene oxide (rGO) can be summarily described as an “intermediate” structure between graphene and GO, with variable and higher C/O elemental ratios compared with GO, but remaining residual oxygen and structural defects with reference to the pristine graphene structure. Although GO was reported a couple of centuries ago, GO and rGO nanomaterials have mainly emerged for various applications after the discovery of graphene since GO is a precursor to prepare graphene, and both present distinctive physical and chemical properties that differ from graphene. As a result, countless and rising fast illustrations of graphene derivatives for antibacterial applications are regularly reported [121,275–280].

#### 4.2.4. Lipid-Based Systems

Due to their amphiphilic nature (typically hydrophilic “head” and hydrophobic “tail”), some lipids—natural and synthetic—have been extensively studied to develop efficient biocompatible delivery systems—initially for drugs and DNA/RNA, but also for aPDT PSs—with synthetic flexibility and structural diversity. Among the prevalent examples, we can distinguish the micelles (lipid monolayers with polar units at the surface and hydrophobic core) and the liposomes (one or more concentric lipid bilayer with a hydrophilic surface and an internal aqueous compartment). Although sharing similar chemical constituents, the micelles and liposomes present significant differences to be taken into consideration depending on the intended application (nature of the target) and the nature of the PSs. Indeed, the micelles are typically smaller than liposomes (with a diameter starting from a few nanometers for the micelles, and ca. 20 nm for the liposomes), with distinct stability and permeability in biological medium and uptake pathways for the PSs into bacteria. With reference to the nature of the transported PSs, the liposomes display the additional flexibility to carry both hydrophilic PSs (in the core compartment or between the bilayers) or/and hydrophobic PSs (within the lipid bilayer), while the micelles are usually easier and cheaper to prepare [80,156]. As often critical to address for biomedical applications, the surface charge of these nano-objects can be tailored to further optimize the interactions with the bacteria, with cationic modification of liposomes identified as a promising aPDT efficiency “amplifier” [80,156,281]. In addition to recent examples such as the hypericin loaded liposomes against Gram(+) bacteria [282–286], another emerging and promising alternative includes the development of modified liposome-like derivatives labeled either as “ethosomes”, “transfersomes”, or “invasomes”, which can be briefly described as ultra-deformable vesicular carriers with upgraded transdermal penetration and increased permeability into the skin for the PSs compared with conventional liposomes [287–290]. On the other hand, recently reported aPDT micellar systems refer to micelles loaded with various hydrophobic PSs such as curcumin, BODIPY, porphyrins, hypocrellin A, or hypericin among others [121,291–293]. Furthermore, solid lipid NPs (SLN) composed of solid biodegradable lipids have been recently highlighted as delivery systems used for actual mRNA COVID-19 vaccines [294], but they also have been reported as transporters

for curcumin for the treatment of oral mucosal infection [121]. Besides, we may also include nanoemulsions in this category of lipid-based nanovehicles since the latter conventionally involve lipids in the oily phase during the formulation process, with recent curcumin/curcuminoid nanoemulsions [121,295].

#### 4.2.5. Polymer-Based Systems

In direct correlation with the above-mentioned lipid-based systems, polymer-based nanocarriers have been positioned as a logical extension with the objective to implement a “degree of freedom” in the synthesis flexibility while expanding the panel of building blocks available in the design of aPDT nanostructures. A categorization of polymeric systems for the delivery of PSs to therapeutically relevant sites can be done using as criteria either the nature of the polymer(s) involved or the type of polymeric (nano)structures. Thus, in the following, we will use a classification primarily based on the structure of the polymeric systems with differentiation between NPs (including hydrogels, biopolymers, and aerogels), polymersomes, polymeric micelles, dendrimers, fibers, and polymeric films and layers (including hybrid systems and nanocomposites). The nanostructure of polymeric systems is implicitly highly correlated to the molecular structure, i.e., composition (nature of the polymer(s), ratios, and distribution and amount of hydrophilic and hydrophobic moieties), charge, and size, as reviewed recently by Osorno et al. [296]. The refined control of these parameters enables the design and fine-tuning of specific polymeric nanostructures spanning from long-ranged ordered lamellar sheets, tubes, and fibers to oval or spherical particles, micelles, and polymersomes [296] (Figure 2C).

#### Conjugated Polymers as PSs or Polymer-Functionalized PSs

One of the easiest approaches reported to develop polymeric carrier systems is to enhance water solubility and biocompatibility of PS molecules through the use of functionalized polymers, by introducing the PSs in a post-modification reaction to a hydrophilic and/or biocompatible polymer, or to modify the PS with a polymerizable group (e.g., acrylate) to react as a monomer for further polymerization with suitable monomers. Other apt options are conjugated polymers incorporating a backbone with alternating double and single bonds which provide photodynamic and optical properties, and therefore might act as PSs themselves [297,298]. For example, poly[(9,9-bis(6'-[N-(triethylene glycol methyl ether)-di(1H-imidazolium)-methane]hexyl)-2,7-fluorene)-co-4,7-di-2-thienyl-2,1,3-benzo-thiadiazole] tetrabromide (PFDBT-BIMEG) is a conjugated polymer which affords salt bridges and electrostatic interactions with microorganisms; these interactions enable the simultaneous detection and inhibition of microorganisms [297]. Conjugated polymers were intensively investigated for the development of multifunctional NPs in antibacterial applications because of their generally low-toxicity toward eukaryotic cells, their flexibility, and their high potential to vehicle versatile therapeutic molecules [298]. Improved PSs based on conjugated polymers or polymerized PSs with antimicrobial photodynamic properties have been amply reported in recent years [299–303]. For example, Huang et al. demonstrated the efficiency and selectivity of polyethyleneimine-Ce6 conjugated in potential aPDT/PDI applications [304].

Other polymeric systems also show antimicrobial properties or preferential target infection sites and are thus suitable for aPDT applications when combined with PSs. For example, cationic polymers, which are known to be highly hydrophilic, can be used to target cell walls and thus microbial infections. Hence, such polymers are adequate for potential aPDT applications [305,306]. Exemplary amphiphilic or cationic poly(oxanorbornene)s doped with PSs, which exhibit pronounced antimicrobial activity (99.9999% efficiency) against *E. coli* and *S. aureus* strains, have been reported [307]. By contrast, anionic polymer particles and nanocarriers with negatively charged surfaces and membranes invade the reticuloendothelial system, which leads to elongated blood circulation times [308–310]. Polymers with large fractions of functional groups, such as the biopolymers mentioned above, can be easily modified and offer many loading sites for suitable PSs. Thus, among

many suitable materials, hyperbranched and dendrimeric polymers are particularly promising candidates for PS nanocarriers.

### Dendrimers

Dendrimers, dendrimeric polymers, or dendrons are highly ordered and highly branched polymers, which may form spherical three-dimensional structures with diameters typically ranging from 1–10 nm [311]. The dimensions of dendrimers are relatively small compared with other drug delivery systems, but as they consist of individual well-defined molecules, the drug loading can be subtly established with reproducibility. The incorporation or encapsulation of drugs may be achieved by covalent binding of the PSs or drug molecules to reactive functional groups along the dendrimeric structure [312,313]. Alternatively, the PS or drug molecule may act as a scaffold from which the dendrimer is synthesized. Finally, drug or PS encapsulation may occur inside the voids of the dendrimer [311,314,315]. Thus, dendrimers offer a substrate for PSs with many reaction sites, and controllable sterical and hydrophobic properties depending on the backbone of the dendrimer. Approaches using hyperbranched polymers for stimuli-responsive release of PSs, such as porphyrins, under acidic or reductive conditions, with improved targeting of bacterial sites have been reported, such as mannose-functionalized polymers by Staegemann et al. [316,317].

### Polymeric NPs and Nanocomposites

In many cases, polymeric nano-systems are not clearly classified, but instead typically grouped under the terminology “polymeric NPs”, since the exact structure may not be fully characterized or considered less relevant with respect to the application efficiency. Polymeric NPs are commonly defined as physically or chemically crosslinked polymer networks with a size in the range of 1 to 1000 nm, but if not further defined may also include nanocapsules, such as polymersomes, micelles, chitosomes, and even highly branched polymers and dendrimers [318].

In aPDT, polymeric NPs may be either used to encapsulate PS molecules (loading with PSs), or built from inherent photoactive polymers acting as PSs [303]. Various PS molecules (e.g., RB, porphyrin derivatives, or curcumin) encapsulated in biocompatible polymeric NPs, such as polystyrene-, PEG-, polyester- (including poly-beta-amino esters), or polyacrylamide-based NPs, are widely used in aPDT/PDI approaches, as recently reported [319–321]. In addition to the role of nanovehicle, the polymeric particles may also help to address the lack of solubility in the biological medium from the PSs and/or reduce their toxicity, as reported among others by Gualdesi et al. [320,322]. For instance, polystyrene NPs with encapsulated hydrophobic TPP-NP(5,10,15,20-tetraphenylporphyrin) have been reported as nano-PS for efficient aPDI approaches towards multi-resistant bacteria [321]. In addition, biocompatible PLGA (polylactic-co-glycolic acid) NPs were employed to encapsulate curcumin, which could potentially serve as an orthodontic adhesive antimicrobial additive [322]. Alternatively, combinatory approaches such as polymeric NPs merging a polymeric PS, a photothermal polymeric agent, and poly(styrene-co-maleic anhydride) as dispersants have recently been reported for coupled aPDT/PTT nano-platforms in aqueous media [323,324]. Furthermore, Kubát et al. reported an increase in the stability of physically crosslinked polymeric NPs (polystyrene) to comparable nanocapsules (PEG-poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) micelles) equipped with identical PS [319].

The term polymeric NP also includes NPs obtained from natural polymers (e.g., chitosan and alginate), hydrogels, or aerogels. Hydrogels are chemically or physically crosslinked polymeric networks, which are able to absorb large amounts of water due to their pronounced hydrophilicity, but do not dissolve because of the crosslinking, whereas aerogels are formed by replacement of liquid with a gas resulting in low-density polymeric structures [325]. Recently, Kirar et al. reported PS-loaded biodegradable NPs fabricated from gelatin, a naturally occurring biopolymer, and hydrogel, for application in aPDT [326]. Moreover, also recently, some polymers such as Carbopol-forming hydrogel matrix en-

trapping PS molecules attracted attention because of their bio/muco-adhesive property, allowing a prolonged local PS delivery. Nevertheless, the viscosity of such systems can prevent the efficiency of PDT by decreasing the photostability and ROS production, thus calling for further optimizations [327,328]. Furthermore, the incorporation of hydrophobic PSs such as curcumin in polyurethane hydrogel has demonstrated to be an efficient PS release system [329].

Another suitable hydrogel for aPDT is chitosan, which is a polycationic biopolymer with good biocompatibility and antibacterial properties [330,331]. Indeed, cationic polymers, which can be antimicrobials by themselves such as chitosan and poly-Lysine, can assure a better recognition toward bacteria thus improving antimicrobial efficiency. Typically, polycationic chitosan may form nanogels or NPs in the presence of (poly)anionic molecules. Alternatively, another promising aPDT approach for the treatment of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was recently reported [332,333], in which anionic PS indocyanine green was used to form PS-doped chitosan NPs. These NPs were shown to significantly reduce biofilm growth-related gene expression. Other similar approaches have also been reported, in which PS doped chitosan NPs showed enhanced cellular uptake and improved antimicrobial properties compared with free PS against different bacteria [212,334,335].

The above-mentioned approach has not only been implemented with NPs, but also in thin films and layers to create biocompatible and antimicrobial surfaces [336]. Indeed, in aPDT and especially aPDI, polymers are also used to create antimicrobial surfaces or matrices to embed PS units. Thus, combinatory approaches—using cellulose derivatives, alginates, chitosan, and other polymer-based materials as biocompatible substrates for PSs and nanocomposites to create photoactive antimicrobial surfaces—have recently been reported [337–339]. The development of such surfaces, and in particular antimicrobial membranes, is of considerable interest, especially in numerous and diverse fields in which providing hygienic and sterile surfaces is essential. As an illustration, Müller et al. reported polyethersulfone membranes doped with polycationic PS that provide antimicrobial properties for potential use as filter membranes in water purification or medicine [340]. Other recent distinctive systems for aPDI refer to self-sterilizing and photoactive antimicrobial surfaces made from (i) natural polymers such as chitosan doped with chlorophyll [336], (ii) “bioplastic” poly(lactic acid) surfaces coated with a BODIPY PS [341], or (iii) synthetic polyurethanes doped with curcumin and cationic bacterial biocides [336,342–345].

Alternatively, other combinatory approaches—in which polymeric nanocomposites embedding inorganic nanomaterials with relevant complementary features are conceived—have garnered attention in recent years. Examples include fullerenes or silver NPs that are incorporated as PSs into polymeric matrices [346], phthalocyanine-silver nanoprism conjugates [347], or mesoporous silica NPs loaded into polymer membranes [348]. Additionally, the embedding of zinc-based PS—such as Zn (II) porphyrin [349]—into polymer matrices to create antimicrobial polymers and polymeric surfaces for aPDI and possibly aPDT has also been reported, with pronounced antimicrobial activity against several bacteria strains and viruses [350,351]. Furthermore, protein-based approaches were developed as reported by Ambrósio et al. [352] and Silva et al. [353] using BSA (bovine serum albumin) NPs or BSA conjugated to PSs to improve solubility and biocompatibility.

Lastly, stimuli-responsive polymeric NPs are generally known to be sensitive to an internal or external stimulus (e.g., pH, temperature, light) and so of utmost interest for the controlled release of PSs for PDT and aPDT, whereas the stimuli-responsiveness depends on the structure and properties of the used polymer such as the assembly of polymer chains and linkages [354]. For example, Dolanský et al. reported light- and temperature-triggered ROS and NO release from polystyrene NPs for combinatory aPDT/PTT approaches [355]. Unlike micelles or polymersomes, crosslinked NPs have been reported to be thermodynamically stable, while stimulus-responsive behavior such as pH-responsive release of PSs has been more often achieved using self-assembled micellar or vesicular structures [319,356–358].

## Polymersomes

Polymersomes are polymeric vesicles that resemble liposomes, which were previously described in Section 4.2.4 dedicated to lipid-based systems. Polymersomes are formed from amphiphilic copolymers, which self-assemble in aqueous media, resulting in capsules. The lumen of the polymersomes is filled with an aqueous medium and the wall comprises a hydrophobic interior with a hydrophilic corona on both inner and outer interfaces. Polymersomes typically form when the weight fraction of the hydrophilic parts (e.g., PEG in a PEG-b-poly(lactic acid) (PLA) block copolymers) comprises up to 20–40% of the polymer. They also form at comparatively large water fractions in the solvent shift method [359–361]. At higher weight fractions, the system tends to form micellar structures [296,362,363]. The hydrophilic and hydrophobic compartments inside the polymersomes enable the uptake and encapsulation of both hydrophobic and hydrophilic molecules [364–367], making polymersomes a relevant candidate for the development of advanced nanocarriers for PSs [368]. In aPDT and similar approaches, efficient delivery of the PSs to the targeted tissue is essential, not only to minimize toxic side effects and overcome low solubility in body fluids, but also to enable elongated circulation in the blood stream and prevent dimerization and quenching of the PSs. Li et al. reported that PSs encapsulated in polymeric nanocarriers exhibit an increased singlet oxygen  $^1\text{O}_2$  quantum yield compared with non-encapsulated PSs [308]; by contrast, non-encapsulated PSs may tend to aggregate and lose efficiency [308,369,370]. Additionally, most polymersomes offer certain advantages compared with the established liposome-based systems such as enhanced biocompatibility, lower immune response, controlled membrane properties, stimuli-responsive drug release, biodegradability, and higher stability, with those mainly resulting from the individual design of polymers and polymersomes for the anticipated applications [296,371].

The encapsulation of PSs into specifically designed nanosized polymersomes with stimulus-triggered release of PSs has been reported in recent years, including temperature, pH, and light-induced release of the PSs [296,372,373]. For instance, Lanzilotto et al. recently reported a system used for aPDT consisting of polymersomes of the tri-block-copolymer poly(2-methyl-2-oxazoline)-block-poly-(dimethylsiloxane)-block-poly(2-methyl-2-oxazoline) (PMOXA34–PDMS6–PMOXA34) encapsulating water-soluble porphyrin derivatives [372].

## Polymeric Micelles

In contrast to polymersomes or liposomes, micelles are particles that contain a hydrophobic core. Typical micelles range between 10 to 100 nm in size. More specifically, polymeric micelles are formed of amphiphilic polymers, with a higher ratio of hydrophilic parts in the case of block copolymers compared with polymersomes [296,362,363]. They also form at comparatively small water fractions in the solvent shift method [359–361]. Due to their structures, micelles are implicitly used to encapsulate hydrophobic drugs or agents, such as PSs, to convey the latter to the target (e.g., cancer cells or microbial infections) while overcoming their low solubility in aqueous media [374]. Additionally, encapsulation may reduce the toxicity of the PSs [375,376]. When compared with polymersomes, one disadvantage is the lack of flexibility to encapsulate or transport both hydrophilic and hydrophobic molecules. On the other hand, as reported in the review by Kashef et al. [377], polymeric micelles are easier to produce, hence they are more cost-efficient than liposomes and potentially polymersomes, while providing similar applicable features [378,379]. Among examples, an aPDT system of polymeric micelles, fabricated from methoxy-PEG and PCL and loaded with the hydrophobic PS curcumin and ketoconazole for the PDI of fungal biofilms, has been reported with an increased water solubility and controlled release of the PSs on display [380]. Additionally, Caruso et al. recently reported the synthesis of thermodynamically stable PEG-PLA micelles for efficient aPDI of *S. aureus*, suggesting that this delivery system is promising in aPDI applications, which also reduces toxicity compared with pure PSs [291]. Moreover, a significant advantage of polymeric micelles compared with lipid-based micelles resides notably in the adjustability of properties by

individual design of the polymer and membrane surface with respect to the selected application. Hence, the polymeric micelles can be equipped with target ligands and/or their morphology can be tuned to increase the cellular uptake of the micelle, PS, or other therapeutic agents in a specific tissue, such as in tumors [381]. Like polymersomes, polymeric micelles can be tuned to release drugs or collapse by application of external stimuli, such as light, temperature or pH [357,358].

#### Niosomes

Niosomes are closely related to liposomes. They are vesicular structures consisting of non-ionic surfactants, including polymers, and lipids such as cholesterol. The addition of lipids to the non-ionic surfactants leads to increased rigidity of the membrane and the vesicular structure. Niosomes range from 10 to 3000 nm in size, and also may include multi-layered systems typically consisting of more than one bilayer. Niosomes offer enhanced stability and biocompatibility compared with vesicular structures based on ionic surfactants [288]. Due to the bilayer structure and adjustability of the selected polymers for the applications of choice, they exhibit similar properties and offer similar advantages as polymersomes, and can be used for encapsulation of a variety of hydrophobic and hydrophilic molecules [288,358]. They may also be equipped with targeting ligands, such as folic acid that enhances uptake into cancer cells for PDT of cervical cancer [382]. A niosome-based system, using MB as encapsulated PS, has been reported for aPDT treatment of hidradenitis suppurativa [383].

#### Polymeric Fibers

Another approach to obtain PS carrier systems relies on polymeric or polymer-hybrid fibers with diameters in micro and nano range [384–386]. The fibers can either be loaded after formation with various PSs, such as cationic yellow or RB [387] incorporated into wool/acrylic blended fabrics to obtain antimicrobial properties, or they can be electrospun from PS containing polymer solution to form polymeric fibers loaded with PSs [388]. Since many polymers (such as nylon, cellulose acetate, or polyacrylonitrile) are used in the textile industry, those materials may offer a novel approach to create substrates or textiles with self-sterilizing and antimicrobial properties in the presence of visible light [386,389]. Furthermore, combinatory approaches using various NPs, such as magnetite NPs, to form polymeric fiber-based nanocomposites have shown some efficiency for antimicrobial photodynamic chemotherapy [390,391].

To conclude this Section 4.2, the list of above-mentioned aPDT nanosystems is non exhaustive and aims at providing an overview of the diversity and richness in the composition of aPDT nanomaterials. The next section focusing on “combinatorial strategies” partly overlaps with the description of aPDT systems, which further complicates the classification process. Moreover, a distinction must be settled between strict “mixtures” of components and “chemical combinations” of components in the development of aPDT treatments with possible synergistic behaviors.

### 5. Focus on Combinatory aPDT Approaches

Given its intrinsic characteristics, PDT is highly amenable to versatile combinations with other drugs, treatments, or modalities in view to potentiate therapeutic effects, which include enhanced efficacy, limitation of side effects, and reduction in the risk of resistance emergence. Proof-of-concept for various combinatory aPDT are thus being increasingly recorded, exploiting the additive/synergistic effects arising from single or multiple therapeutic species acting via different mechanistic pathways. The following part aims to review recent works following such strategies (Table 2).

Table 2. Examples of recent studies that combined aPDT with other antimicrobial actives or treatments.

Combination with Antibiotics	Target(s)	In Vitro and/or In Vivo Effect(s)	Reference
5-ALA + Gentamicin	<i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i>	In vitro: antibiofilm synergistic effect	[392]
Photodithazine + Metronidazole	<i>E. nucleatum</i> and <i>P. gingivalis</i>	In vitro: improvement of antibiofilm effect	[393]
Ce6 NP + Tinidazole	Periodontal pathogenic bacteria	In vitro: synergistic antiperiodontitis effects; in vivo: reduced adsorption of alveolar bone in a rat model of periodontitis	[394]
MB + Clindamycin / Amoxicillin	<i>E. coli</i>	In vitro: enhancement of antibiotic susceptibility following aPDT treatment; in vivo: prolonged survival of infected <i>G. mellonella</i> larvae	[43]
MB + Gentamicin	<i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>	In vitro: synergistic effect on planktonic cultures of both bacteria; positive effect on <i>P. aeruginosa</i> biofilm	[395]
MB + Carbapenem	<i>S. marcescens</i> , <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. aerogenes</i>	In vitro: impairment of the enzymatic activity and genetic determinants of carbapenemases; restoration of the susceptibility to Carbapenem	[396]
[Ir(ppy) <sub>2</sub> (ppdh)]PF <sub>6</sub> + Cefotaxime	<i>K. pneumoniae</i>	In vitro: synergistic aPDI effect with Cefotaxime	[397]
<b>Combination with other antibacterial compounds</b>	<b>Target(s)</b>	<b>In vitro and/or in vivo effect(s)</b>	<b>Reference</b>
MB or Ce6 + aurein 1.2 monomer or aurein 1.2-C-terminal dimer	<i>E. faecalis</i>	In vitro: prevention of biofilm formation with all treatments; improvement of aurein monomer effect when combined with Ce6-PDT	[398]
RB + Concanavalin A	<i>E. coli</i>	In vitro: improvement of RB uptake, increased membrane damages and enhanced PDT effect	[399]
MB@GNPDEX-ConA + Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone	<i>K. pneumoniae</i>	In vitro: enhancement of the MB-NPs mediated phototoxicity with the efflux pump inhibitor CCCP	[40]
Quinine hydrochloride + antimicrobial blue light	MDR <i>P. aeruginosa</i> and <i>A. baumannii</i>	In vitro: photo-inactivation of planktonic cells and biofilms; in vivo: potentiation of aBL effect in a mouse skin abrasion infection model	[400]
<b>Combination with other antifungal treatment compounds</b>	<b>Target(s)</b>	<b>In vitro and/or in vivo effect(s)</b>	<b>Reference</b>
5-ALA + ITZ, itraconazole; TBF, terbinafine; VOR, voriconazole	<i>Candida</i> species, dermatophytes, <i>A. fumigatus</i> and <i>F. monophora</i>	In vitro: reduction/improvement of lesions, disappearance of plaque	[401]
Photodithazine + Nystatin	Fluconazole-resistant <i>C. albicans</i>	In vitro: reduction of fungal viability, decrease in oral lesions and inflammatory reaction; in vivo: decrease in tongue lesions	[54]
5-ALA + Itraconazole	<i>Trichosporon asahii</i>	In vitro: better elimination of planktonic and biofilms fungi than single therapy	[402]

Table 2. Cont.

	Target(s)	In vitro and/or in vivo effects)	Reference
<b>Combination with immunotherapy</b>			
Schiff base complexes	<i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	In vitro: blockage of the production of inflammatory TNF $\alpha$ cytokine	[403]
Porphyrin + phthalocyanine	HIV-infected cells	In vitro: specific phototoxicity against infected cells	[404]
<b>Combination with sonodynamic therapy (SDT)</b>	Target(s)	In vitro and/or in vivo effect(s)	Reference
Ce6 derivative Photodithazine + RB	<i>C. albicans</i>	In vitro: inactivation of biofilm (viability and total biomass)	[405]
UCNPs + hematoporphyrin + SiO <sub>2</sub> -RB <sup>1</sup>	Antibiotic-resistant bacteria	In vitro: greater antibacterial effect with SDT and PDT at once	[406]
<b>Combination with electrochemotherapy</b>	Target(s)	In vitro and/or in vivo effect(s)	Reference
Hypericin	<i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	In vitro: better bacterial inactivation with combined therapies	[407]
<b>Combination with viral NPs</b>	Target(s)	In vitro and/or in vivo effect(s)	Reference
TVP-A (luminogen) + PAP phage	<i>P. aeruginosa</i>	In vitro: synergistic bacterial recognizing and killing; in vivo: acceleration of healing rates	[408]
Pheophorbide A (chlorophyll) + JM-phage	<i>C. albicans</i>	In vitro: better specificity of PS targeting	[409]
Ru(bpy) <sub>2</sub> phen-1A + Cowpea chlorotic mottle virus	<i>S. aureus</i>	In vitro: targeted bacterial photodynamic inactivation	[410]
<b>Combination of several PSs</b>	Target(s)	In vitro and/or in vivo effect(s)	Reference
Carboxypterin + MB	<i>K. pneumoniae</i>	In vitro: better biofilm eradication	[411]
Phthalocyanines + Graphene QDs	<i>S. aureus</i>	In vitro: better bacterial photoinactivation	[412]
ICG + Metformin + Curcumin	<i>E. faecalis</i>	In vitro: better biofilm eradication	[35]
Porphyrin + Phthalocyanine	<i>Leishmania braziliensis</i>	In vitro: better assimilation of photo-inactivated parasites by macrophages	[413]
<b>Combination with photothermal therapy (PTT)</b>	Target(s)	In vitro and/or in vivo effect(s)	Reference
Ruthenium NPs	Pathogenic bacteria	In vitro: bacterial inhibition; in vivo: reduction of bacterial load and repair of infected wounds	[414]
Graphene oxide	<i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	In vitro: efficient vector for both PDT and PTT	[415]
ICG + SPIONS	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and <i>S. epidermis</i>	In vitro: antimicrobial and antibiofilm activity at a low dose	[148]
Ag-conjugated graphene QDs	<i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i>	In vitro: efficient photoinactivation by PDT and PTT; in vivo: promoted healing in bacteria-infected rat wounds	[280]
PDPPT (photothermal agent) + MEH-PPV (PS) <sup>2</sup>	<i>E. coli</i>	In vitro: better inhibition rate than PTT/PDT systems used alone	[324]
Mesoporous polydopamine NPs + ICG	<i>S. aureus</i>	In vivo: eradication of <i>S. aureus</i> biofilm on titanium implant	[416]

Table 2. Cont.

Combination with NO phototherapy	Target(s)	In vitro and/or in vivo effect(s)	Reference
N-(3-aminopropyl)-3-(trifluoromethyl)-4-nitrobenzenamine + TMPyP/ZnPc	<i>E. coli</i>	In vitro: dual-mode photoantibacterial action	[417]
Sulfonated polystyrene NPs (NO photodonor + porphyrin/ phthalocyanine)	<i>E. coli</i>	In vitro: strong antibacterial action	[355]
[Ru(bpy) <sub>3</sub> ]Cl <sub>2</sub>	<i>P. aeruginosa</i>	In vitro: PDT/NO synergistic antibiofilm effect	[418]

ALA, alanine; MB, methylene blue; RB, rose bengal; Ce6, chlorin e6; ICG, indocyanine green; SPION, superparamagnetic iron oxide NP. <sup>1</sup>, hematoporphyrin monomethyl ether enclosed into yolk-structured up-conversion core and covalently linked RB on SiO<sub>2</sub> shell; <sup>2</sup>, photothermal agent poly(diketopyrrolopyrrole-thienothiophene) (PDPTT) and the photosensitizer poly(2-methoxy-5-(2-ethylhexyl)oxy)-p-phenylenevinylene) (MEH-PPV) in the presence of poly(styrene-co-maleic anhydride).

## 5.1. "Basic" aPDT Combinations

### 5.1.1. Combination of Several PSs

The simplest combinatory aPDT approach probably consists in combining two or more PSs in a single treatment. Thus, besides aPDT making use of a single PS, aPDT may rely on the simultaneous use of several PSs in an attempt to obtain additive or synergistic antimicrobial effects. The PSs combined may exhibit different photophysical characters showing complementarities. For example, carboxypterin-based aPDT upon sunlight irradiation demonstrates a significant planktonic bacterial load reduction [419]. However, eradication of biofilm formation needs a PS concentration 500 times higher than assays performed with planktonic forms. When combined with MB, Tosato et al. showed that reasonable concentrations of both PSs exert synergistic effect on both biofilm and planktonic MDR bacteria [411]. In other studies, alternative dual-PSs aPDT systems have shown even better antibacterial and antibiofilm properties [35,412].

### 5.1.2. Addition of Inorganic Salts

The combination of PSs with inorganic salts can modulate the PDT effectiveness, potentiating or inhibiting the antimicrobial activity through the production of additional reactive species or quenching  $^1\text{O}_2$  [420]. As an example, azide sodium can modulate aPDT effectiveness by promoting or inhibiting the binding of bacteria with PSs, depending on lipophilicity of the latter. Indeed, azide sodium is a  $^1\text{O}_2$  quencher, but can also produce highly reactive azide radicals, via electron transfer from PS at the excited state. This has been reported with many phenothiazinium dyes and also fullerenes [93,421,422]. Other salts can amplify the bacterial killing mediated by MB-PDT such as potassium iodide (KI), a very versatile salt, involved in the generation of short-lived reactive iodine radicals ( $\text{I}^\bullet/\text{I}_2^{\bullet-}$ ) [423,424]; similar findings have been obtained when using KI with cationic BOD-IPY derivatives [425] or porphyrin–Schiff base conjugates bearing basic amino groups [426]. Potassium thiocyanate and potassium selenocyanate could also form reactive species, such as the sulfur trioxide radical anion and selenocyanogen ( $\text{SeCN}$ )<sub>2</sub>, respectively [427]. In addition, interactions between PSs and target microorganisms could be improved thanks to inorganic salts. For example, calcium and magnesium cations can modulate the electrostatic interaction between PSs and bacterial membranes [428]. It is worth noting here that most of the above-mentioned studies were conducted under in vitro settings. While inorganic salts can be useful to enhance in vitro or ex vivo aPDT effects, the use of such additives in animals or human beings would need to be carefully examined, considering the dose to be used and potential concomitant side effects.

## 5.2. Combinations of aPDT with Other Antimicrobial Drugs or Antimicrobial Therapies

Various classes of antimicrobial drugs or other antimicrobial therapies, which action does not depend on light, have been considered with regard to their aPDT compatibility.

### 5.2.1. Antibiotics

Antibiotherapy is an obvious complementary therapy to aPDT, which may allow obtaining stronger antimicrobial effects and/or restore antibiotic susceptibility. Combinations of PSs with antibiotics have been investigated in numerous studies addressing various infectious diseases, such as skin and mucosal infections as recently reviewed [429]. Aminoglycosides are the most common antibiotics used in combination with a PS. For instance, kanamycin, tobramycin, and gentamicin combined respectively to RB, porphyrin, and 5-Alanine have been reported, showing potent effects against bacteria of clinical interest, notably by improving biofilm clearance and reducing microbial loads [392,430–433]. In addition, combinations with other antibiotic classes, such as nitroimidazoles (e.g., metronidazole) or glycopeptides (e.g., vancomycin), also showed some effect against biofilms of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* [393], as well as *S. aureus* [434]. Further, PSs can also be useful to combine with antibiotics in order to restore the susceptibility of bacteria to the latter, notably to last-resort antibiotics. As a recent example, Feng et al. reported the photo-

dynamic inactivation of bacterial carbapenemases, both restoring bacterial susceptibility to carbapenems and enhancing the effectiveness of these antibiotics [396]. However, all combinations of PSs and antibiotics may not be effective, since in some cases antibiotics can have an antagonistic effect on PS activity [435]. Finally, it is noteworthy that some antibiotics can act themselves as PSs; Jiang et al. indeed reported light-excited antibiotics for potentiating bacterial killing via ROS generation [436].

#### 5.2.2. Antifungals

The combination of PSs with antifungals is a powerful approach to thwart growing antifungal resistance, especially to fluconazole, which is commonly observed in *C. albicans* strains [437]. Quiroga et al. showed that sublethal photoinactivation mediated by a tetracationic tentacle porphyrin allowed to reduce the MIC of fluconazole in *C. albicans* [438]. Nystatin, a common antifungal used to prevent and treat candidiasis, was combined with photodithazine-based PS and red light in *C. albicans*-infected mice. The combined therapy reduced the fungal viability and decreased the oral lesions and the inflammatory reaction [54]. Moreover, other antifungals (e.g., terbinafine, itraconazole and voriconazole) combined to ALA reported promising results. These combinations could be alternative methods for the treatment of refractory and complex cases of chromoblastomycosis [401,439].

#### 5.2.3. Other Antimicrobial Compounds

Many other antimicrobial compounds may be used in combination with PSs. Antimicrobial peptides (AMPs) are oligopeptides (commonly consisting of 10–50 amino acids) with high affinity for bacterial cells thanks to an overall positive charge. Their antimicrobial spectrum can be modulated through variation of their amino acids sequence. AMPs encompass a large set of natural compounds that may be used in aPDT. For example, de Freitas et al. reported that sub-lethal doses of PSs (either Ce6 or MB) and aurein peptides (either aurein 1.2 monomer or aurein 1.2 C-terminal dimer) were able to prevent biofilm development by *E. faecalis* [398]. In another study, a membrane-anchoring PS, named TBD-anchor, demonstrated both bacterial membrane-anchoring abilities and ROS production [440]. In a similar way to peptide therapy, LPS-binding proteins were used to improve the contact of PSs with the cytoplasmic membrane of bacteria. For instance, the antibacterial efficacy of a complex consisting of a combination of RB with the lectin concanavalin A (ConA) was demonstrated in a planktonic culture of *E. coli*; ConA-RB conjugates increased membrane damages and enhanced the RB efficacy up to 117-fold [399]. In addition, coupling pump efflux inhibitors, such as CCCP EPI (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone), to PSs was also investigated. This highlighted the interest to combine PSs with molecules acting on targets susceptible to induce resistance modulations [40]. Other antimicrobial molecules may be good candidates to be used in aPDT strategies. For example, quinine used in combination with antimicrobial blue light was shown efficient to photo-inactivate MDR *P. aeruginosa* and *A. baumannii* [400]. Some cationic molecules, such as cationic lipids, can have a good affinity for bacterial cell membrane and a good antibacterial activity [126,441]. Thus, PS-amphiphiles conjugates would also deserve to be investigated for aPDT applications.

#### 5.2.4. Viral NPs and Phagotherapy

In recent years, viral NPs (VNPs) deriving from phages, animal, or plant viruses have been proposed as biological vehicles for delivery of PSs. Such carriers can exhibit a series of advantageous properties including natural targeting, easy manufacture and good safety profile [442]. Compared with nanomaterials used as PS carriers, VNPs are natural protein-based NPs that may display higher biocompatibility and tissue specificity. In addition, VNPs can be tuned through genetic and synthetic engineering with appropriate biological and chemical modifications (e.g., surface decoration). Alternatively, the combination of aPDT with so-called phagotherapy may be useful for various reasons, following different strategies. One study suggests that, following a PDT treatment, ROS damages can cause

quorum sensing and virulence pathway alterations rendering micro-organisms more susceptible to other therapies. Among these, phagotherapy is known to be modulated by multiple virulence factors [443]. Another approach can consist of conjugating phages with PSs, in order to improve interaction/delivery of the latter into target microorganisms. For example, Dong et al. showed that a phage carrying the chlorophyll-based PS pheophorbide efficiently induced apoptosis in *C. albicans*, thus demonstrating the potential of phototherapeutic nanostructures for fungal inactivation [409]. However, such an approach has to be prudently considered regarding the occurrence of phage resistance already reported in numerous investigations [444].

### 5.3. Combinations of aPDT with Other Light-Based Treatments

Multiple modalities entirely controlled by light stimuli may be combined with aPDT in multifunctional antimicrobial treatments. The following part reports some very recent studies illustrating multiple light-based antimicrobial strategies combined to operate independently, with potential additive or synergistic effects and without reciprocal interferences. This may be obtained with a single PS displaying such multiple properties and/or through combination of PSs with other light-activatable compounds exhibiting complementary properties.

#### 5.3.1. aPDT and Photothermal Therapy

Photothermal therapy (PTT) is a local treatment modality relying on the property of a PS to absorb energy and convert it into heat upon stimulation with an electromagnetic radiation, such as radiofrequency, microwaves, near-infrared irradiation, or visible light. The localized hyperthermia can lead to various damages resulting in microbial inactivation in the treatment area. Following this principle, ruthenium NPs have been used for PDT/PTT dual-modal phototherapeutic killing of pathogenic bacteria [414]. Moreover, GO demonstrated antibacterial effect against *E. coli* and *S. aureus* as a result of both PDT and PTT effects following irradiation with ultra-low doses ( $65 \text{ mW/cm}^2$ ) of 630 nm light [415]. Furthermore, combination of sonodynamic, photodynamic, and photothermal therapies with an external controllable source recently reported against breast cancer [445] may also show promising applications for treating bacterial infection. Mai et al. reported a FDA-approved sinoporphyrin sodium (DVDMS) for photo- and sono-dynamic therapy in cancer cells and photoinactivation of *S. aureus* strains, in vitro and in vivo models. However, no bacterial sonoinactivation by DVDMS was obtained [446].

#### 5.3.2. aPDT and NO Phototherapy

Combination of aPDT with NO phototherapy is gaining increasing interest for antimicrobial applications [447]. For instance, light-responsive dual NO and  $^1\text{O}_2$  releasing materials showed phototoxicities against *E. coli* [355,417]. More recently, Parisi et al. developed a molecular hybrid based on a BODIPY light-harvesting antenna producing simultaneously NO and  $^1\text{O}_2$  upon single photon excitation with green light for anticancer applications; according to the authors, this system may also act as an effective PS and NO photodonor antibacterial agent [448].

#### 5.3.3. aPDT and Low Laser Therapy

Photobiomodulation (PBM), also called low-level laser therapy, is a non-destructive process that may alleviate pain and inflammation or promote tissue healing and regeneration. The use of this method coupled to aPDT is a very recent approach. A concomitant use of aPDT and PBM was reported as an adjunct treatment for palatal ulcer [449]. In a clinic-laboratory study, aPDT and PBM showed similar improvement in gingival inflammatory and microbiological parameters compared with conventional treatment [450]. More recently, some benefits of this combined therapy were reported such as the modulation of inflammatory state, pain relief, and acceleration of tissue repair of patients contracting *herpes simplex labialis* virus or orofacial lesions in patients suffering from COVID-19 [451–453].

#### 5.4. Coupling of aPDT with Other Physical Treatments

##### 5.4.1. aPDT and Sonodynamic Therapy

Sonodynamic therapy (SDT), combining so-called sonosensitizers (SS) and ultrasounds (US) is a relatively new approach for treating microbial infections [454,455]. The ultrasonic waves have the property to induce a cavitation phenomenon thus enhancing the efficacy of combined antimicrobial treatments. The rationale for combining PDT with SDT relies on specific advantages of the latter, notably, a deeper propagation of US into the tissue than light; therefore, PDT/SDT may be used to treat deeper lesions in vivo, alleviating the limitations of light propagation and delivery presented by aPDT [405,456]. An approach combining PDT and SDT, called sonophotodynamic therapy (SPDT), has been reported to improve microbial inactivation compared with individual aPDT or SDT [457]. Because of the complicated system of SPDT, its mechanisms have not been clearly revealed yet. Some studies have demonstrated that sonoporation mechanism induced by US improves the transfer of large molecules into the bacteria by forming transient pores. Moreover, US waves could potentiate the microorganisms dispersion in the medium resulting in (i) a better biodisponibility of therapeutic agent and light diffusion and (ii) a reduction of microbial aggregation and networks, such as biofilm [457,458]. The mention of a new class of PS characterized by the dual ability to be activated by both US and light, for SPDT application, has been questioned. Indeed, Harris et al. recently suggested that this specific PS/SS class could be useful for antimicrobial application – beside previously reported anticancer application – with initial investigation using chlorins as dual PS/SS agent [459]. Since this study by Harris et al., a few dual-activated PS/SS have been described that would warrant further investigations [460,461].

##### 5.4.2. aPDT and Electrochemotherapy

Electrochemotherapy, also called pulsed electromagnetic fields (PEMFs) or electropor-meabilization, is a method consisting in applying an electrical field to cells in order to enhance their permeability to therapeutic molecules (often chemical drugs or DNA). Combination of PDT with electrochemotherapy has been used many times to treat cancer diseases [14,462,463]. One study showed that, compared with aPDT used alone, hypericin combined with electrochemotherapy allows to achieve more than 2 to 3 log<sub>10</sub> CFU reduction in *E. coli* and *S. aureus*, respectively [407]. To our knowledge, no other study combining electrochemotherapy with aPDT was recorded since then. However, combination of aPDT and a cell-permeabilization technique with a controllable toxicity degree may be highly relevant since most PSs can act in extracellular medium without having a specific target. Accordingly, electrochemotherapy may allow boosting aPDT activity by promoting PSs internalization into target microorganisms.

#### 5.5. aPDT and Other Antimicrobial-Related Therapies

Immunotherapeutic effects may be obtained as a result of PDT itself or due to other treatments used in combination. For instance, Schiff base complexes with differential immune-stimulatory and immune-modulatory activities were reported efficient to eliminate both Gram(+) and Gram(−) bacteria. Furthermore, upon photoactivation, these complexes blocked the production of the inflammatory cytokine TNF $\alpha$ , thereby allowing to treat at once bacterial infections associated with damaging inflammation [403]. One recent study proposed the first application of antimicrobial photoimmunotherapy (PIT) by developing a PS-antibody complex, selective to the HIV antigen anchored to the infected cell membranes [404]. Such an approach supports the therapeutic applicability of PDT against antimicrobial infections, especially those mediated by intracellular pathogens. In addition, photodynamic therapy using PSs at sub-lethal concentrations may exhibit interesting properties for inflammatory and infectious conditions [464]. It was shown effective to alter immune cell function and alleviate immune-mediated disease, to hasten the process of wound healing, and to enhance antibacterial immunity. PDT thus appears as

a promising therapeutic modality in infectious and chronic inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease and arthritis.

## 6. Other aPDT Perspectives: New Strategies to Efficiently Target Bacteria

Irrespective of the biomedical applications, achieving a precise targeting is crucial to guarantee both efficiency and specificity. For anticancer PDT, many targeting studies have been done, notably for evaluating PSs covalently attached to molecules having affinity for neoplasia or ligands for receptors expressed on tumors. By this way, PSs may be chosen considering primarily their ability to achieve high PDT effects rather than depending on their intrinsic targeting properties. Following the same rationale, aPDT-based combinatory systems can be developed, benefiting from earlier studies performed in multimodal oncology [465].

### 6.1. Aggregation-Induced Emission (AIE) Luminogens

AIE luminogens exhibit, in the aggregated state, nonradiative decay and show bright fluorescence due to the restriction of intramolecular motions [9]. Recently, their interests for antimicrobial applications have been reported, showing the possibility to simultaneously perform detection and image-guided elimination of bacteria for theranostics applications [466]. In comparison with classical PSs, AIE luminogens in an aggregated state do not exhibit self-quenched fluorescence and ROS production is better. For instance, Gao et al. reported a tetraphenylethylene-based discrete organoplatinum(II) metallacycle electrostatically assembled with a peptide-decorated virus coat protein. This assembly showed strong membrane-intercalating ability, especially in Gram(−) bacteria, and behaved as a potent AIE-PS upon light irradiation [467].

### 6.2. Photochemical Internalization (PCI)

PCI may be used to enhance cell internalization of diverse macromolecules. It consists of PDT-induced disruption of endocytic vesicles and lysosomes improving the release of their payloads into the cytoplasm of target cells. Although most PCI applications relate to cancer treatments, PCI could be extended to treat intracellular infections by delivering antimicrobials into infected cells [468]. For instance, Zhang et al. reported PCI as an antibiotic delivery strategy allowing to enhance cytoplasmic release of Gentamicin, to counter intracellular staphylococcal infection in eukaryotic cells and in zebrafish embryos [469].

### 6.3. Genetically-Encoded PSs

Internalization of PSs inside target microorganisms could be facilitated thanks to their conjugation with adjuvants, as mentioned before. Alternatively, it could be possible to use genetically-encoded ROS-generating proteins (RGPs), also called genetically-encoded PSs. Such an approach represents a powerful way to “completely localize” PSs inside target microorganisms for highly specific antimicrobial phototoxicity. Furthermore, in situ production of RGPs allows to enhance interaction with intracellular targets and better control the biodistribution of PSs, while limiting side-effects for the host tissues and environments [470]. To date, two groups of RGPs have been reported; those that belong to the green fluorescent protein (GFP) family and form their chromophores auto catalytically, and those that use external ubiquitous co-factors (flavins) as chromophores [471]. For example, Endres et al. compared eleven light-oxygen-voltage-based flavin binding fluorescent proteins and showed that most were potent PSs for light-controlled killing of bacteria [472].

### 6.4. pH-Sensitive aPDT

Some studies have reported smart photoactive systems consisting in PSs assembled in nanoconjugates with acid-cleavable linkers. For instance, Staegemann et al. described porphyrins conjugated with acid-labile benzacetal linkers and demonstrated the cleavage of the active PS agents from the polymer carrier in the acidic bacterial environment [316]. In addition, photoacids may be useful to design pH-sensitive aPDT systems. Upon light

irradiation, such agents promote the spatial and temporal control of proton-release processes and could provide a way to convert photoenergy into other types of energy [473]. Thus, proof-of-concept was reported for the use of reversible photo-switchable chemicals as antimicrobials inducing MDR bacteria photoinactivation mediated by the acidification of intercellular environment [474]. To our knowledge, no studies have yet reported the potential of photoacids in combination with aPDT systems. However, some pH-sensitive PSs can induce remarkable variations of antimicrobial photoinactivation levels under different environmental pH [475]. These observations suggest the potential of photoacids as PDT potentiators for enhanced antimicrobial applications.

#### 6.5. DNA Origami as PS Carriers

The quite recent development of DNA origami based on well-established DNA nanotechnology can serve as an excellent scaffold for the functionalization with different kinds of molecules and could be a powerful tool, as described by Yang et al., to study in a real-time conditions the assemble/disassemble of photo-controllable nanostructures [476]. Oligonucleotides organized as DNA origami could thus be used as PS-carrying nanostructures featuring numerous and dense intercalation sites. In addition, the tightly packed double helices can avoid the degradation by DNA hydrolases in the cellular environment. For instance, Zhuang et al. reported the uptake in tumor cells of a PS-loaded DNA origami nanostructure where it generated free radicals, releasing PSs due to DNA photocleavage, and induced cell apoptosis [477]. To our knowledge, such an approach has not yet been investigated for antimicrobial purposes.

### 7. Discussion

Antimicrobial PDT has the potential to fight against a wide spectrum of infective agents, including those resistant to conventional antimicrobials, under non-clinical and clinical settings. Rather than replacement, aPDT may be a complementary approach to reduce the use of current, especially last resort, antimicrobials. This review aims to give a non-exhaustive overview of the diversity and richness of synthetic, natural, or hybrid single PSs and aPDT nanosystems that were recently reported, with respect to their specific advantages, limitations, and possible evolutions. It is noteworthy that many systems and strategies primarily developed for anticancer PDT have been or could be applied—*per se* or following adaptations—to antimicrobial applications.

Beyond the “chemical space” that can be explored with individual PSs, versatile combinations with other compounds can allow the design of multimodular/multimodal systems. Along this line, the various PSs available may be considered as “basic ingredients”. Apart from offering alternative possibilities for overcoming the most common limitations of PSs (i.e., solubility, delivery, and specificity), reasons for implementing PSs in complex systems can be related to (i) the ability to target several types of pathogens at once (extended antimicrobial spectrum), (ii) synergistic antimicrobial effects, (iii) reduction in the dose of each combined component, (iv) beneficial effects in severe poly-pathogenic infections, and (v) reduction in the risk of resistance emergence.

In addition to the many possible variations concerning PSs, optimizations can also consider other critical parameters in PDT, namely light irradiation and oxygenation. The latter was considered for a long time as an indispensable component. However, control of the oxygen level in the aPDT system is questionable. Indeed, additional oxygen-independent phototoxic mechanisms have been reported, for example with psoralens, which can produce more effective aPDT without oxygen [21]. Furthermore, recent studies suggest that various strategies could be used to reduce or bypass the limitations of oxygen and light supplies (read below). All combined, optimizations targeting not only the PSs, but also light irradiation and oxygen supply, could allow to evolve toward integrative, highly sophisticated, antimicrobial photodynamic therapy.

Light irradiation and its various modalities have been reviewed in depth by different authors [12,478–480]. Typically, the irradiation in PDT occurs in the UV (200–400 nm) or

in the visible light (400–700 nm) with a power of  $\leq 100$  mW [479]. However, the low light-penetration depth (around mm) and possible occurrence of tissue photodamage limit the applicability of this spectral range for PDT. This can be circumvented by application of a near-infrared (NIR) irradiation (750–1100 nm), particularly via a two-photon excitation, which is emerging for PDT applications [223,481]. Being a third-order nonlinear optical phenomenon and corresponding to the simultaneous absorption of two photons with half the resonant energy, it allows deeper penetration in biological tissues (around 2 cm), lower scattering losses, and a three-dimensional spatial resolution [482]. Light sources are also constantly improving. Laser is an exceptional source of radiation, capable of producing extremely fine spectral bands, intense, coherent electromagnetic fields ranging from NIR to UV. In comparison, LEDs feature other advantages, notably the possibility to be arranged in many ways, in large quantity, for irradiating wide areas while inducing negligible heating [478,479].

Considering that light-emitted sources can become a brake to any PDT applications, several promising options have been envisaged quite recently. Notably, Blum et al. have identified a series of “self-exiting way” that allows to abolish the need of light to achieve efficient PDT [483]. Among them, chemiluminescence was extensively investigated by using luminol or luciferase energy transfer to induce a chemiexcitation of PS as antibacterial therapeutics [484]. In addition, other methods may be based on Cherenkov radiation, which occurs when an emitted charged particle, such as an electron, moves with high speed through a dielectric medium, such as water. Thus, the polarization of electrons in the medium produces electromagnetic waves in the visible wavelengths that could activate PDT reaction. Another way to induce Cherenkov radiation is to use radioactive isotopes with high beta emissions (e.g.,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , or  $^{68}\text{Ga}$ ) as an electronic excitation source [483]. The relevance of such approaches for the design of a self-induced aPDT system remains to be evaluated. In addition, another external source of excitation, such as microwaves, could activate photoactive molecules such as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  when they are complexed with carbon nanotubes. This was recently evaluated by Qiao et al. for treating MRSA-infected osteomyelitis [48]. Furthermore, X-ray as an activated source can also facilitate the activation of the PDT system by transferring energy harvested from X-ray irradiation to the PS used [485]. Kamanli et al. compared pulse and superpulse radiation modes, showing that the latter is more effective to produce  $^1\text{O}_2$  and *S. aureus* eradication than the former [486].

Oxygen is also a critical limiting factor that determines PDT efficiency, especially in poorly oxygenated environments. However, it is noteworthy that PDT can be achieved in cancers that typically feature a low oxygenation rate. To alleviate the possible limitations of oxygen supply in PDT systems, several strategies have also been recently considered. One is based on catalase grafting to achieve oxygen self-sufficient NPs in order to convert  $\text{H}_2\text{O}_2$  into available dissolved oxygen in the tumor environment. The abundant ROS in tumors compared with normal tissues provide a coherent substrate for catalase and thus allows an improvement of PDT activity [487]. Some multifunctional nanomaterials, called nanozymes, can also be used in combination with PSs to achieve a catalase-like activity supplying an oxygen source for the PS functioning [488,489]. In addition, it was also reported that noble metal NPs – such as Ru, Pt, and Au NPs – exhibit catalase-like nanozyme activities [490]. The use of catalases or nanozymes may have the crucial role of oxygen helpers in aPDT for treating deep infections.

The possibilities to design combinatorial aPDT strategies seem unlimited. Those presented in this review partly overlap with the description of aPDT systems, showing the complexity of any classification process. Awareness and caution may be raised about some sort of “paradox” or “dilemma”; indeed, while the seemingly boundless collection of chemical options and modular tools to develop nanoscale aPDT therapeutics implicitly defines extensive design flexibility, it staggeringly complicates and bewilders at the same time the optimization process aiming to compare, rationalize, and identify the “best” option for each application. Along this line, data concerning structure-activity relationships are

usually missing, with not many studies yet dedicated to this matter [11,42,91,491]. Similar to the CLSI guidelines defined for antibiotics, uniform research methodologies would be useful to assay aPDT systems under well-defined standards and guidelines, considering notably (i) illumination settings, (ii) positive controls [492], (iii) microorganisms and cell lines relevant for a given application, and (iv) assessment of antimicrobial efficacy; this would guarantee better-conducted preclinical and clinical trials of aPDT systems used as mono or combinatory therapy. Furthermore, a public database compiling the efficacy/side effects of various systems would also be useful, facilitating meta-analyses for delineating (quantitative) structure/activity relationships and computational simulations [493].

Finally, in view of translation to clinical practice, a series of precautions and potential limitations must also be considered, especially when dealing with combinatory strategies. Beside possible reciprocal interferences (antagonisms) between combined partners, safety and specificity parameters must also be carefully examined. One main advantage of aPDT is the possibility to control the production of ROS thanks to the use of nontoxic PSs triggered with inducers (specific light and free oxygen) and/or enhancers. The vast majority of PSs are considered safe and dark cytotoxic side effects toward non-target eukaryotic cells are rarely reported. However, in many cases, more studies are needed for examining—beyond potential side-effects—other parameters such as bioavailability, biodispersion, persistence in host cells and body, and elimination pathways. With regard to combinatory strategies, it is noteworthy that studies conducted to date were mostly based on *in vitro* evaluation or using animal models bearing well-defined sites of infection (Table 2). Thus, much more data in preclinical and clinical settings are required to support the actual potential of such strategies. Moreover, considering that many microbial infections are systemic, the use of modalities such as sonodynamic therapy or electrochemotherapy is at present not realistically feasible. Therefore, in spite of significant progress and real promise, further important work/innovations are needed to effectively broaden the range of infectious conditions that could be treated via aPDT approaches. Lastly, cost effectiveness of multiplexed aPDT therapies over monomodal conventional antimicrobial agents is another crucial point to be considered in view of clinical applications. Potent, but too expensive solutions may fail to be used in practice, especially in under-developed countries where conventional antimicrobials will continue to be used, allowing microorganisms to increase in resistance.

## 8. Concluding Remarks

In conclusion, aPDT is a versatile approach that tends to evolve from quite a simple method to reach much higher degrees of complexity, with several expected advantages, but also possible drawbacks or undesirable effects. Among the latter, any direct/indirect impact on AMR should be more thoroughly considered. It is noteworthy that aPDT clinical trials conducted to date evaluated quite simple PSs. Any increase in the complexity of therapeutic systems would lead to an increase in difficulty before being able to reach clinical applications. The development of effective and safe aPDT treatments requires expertise in many fields of research, including biology (microbiology, cell biology, biochemistry, pharmacology), chemistry, physics (optical physics), and engineering. This is even more the case with combinatory strategies involving different modalities as reviewed in this article. Translation to practical applications also implies strong collaborations with the different sectors of health care and pharmaceutical companies. In these conditions, aPDT and its many therapeutic combinations could become a frontline routine treatment to fight against microorganisms possibly responsible for the next healthcare crises [61].

**Funding:** This work was supported by grants from ANR/BMBF (TARGET-THERAPY; PIs: Tony Le Gall and Holger Schönherr; ANR grant number: ANR-20-AMRB-0009, RPY21103NNA; BMBF Förderkennzeichen: 16GW0342). We also thank the “Association de Transfusion Sanguine et de Biogénétique Gaétan Saleün” (France) and the “Conseil Régional de Bretagne” (France) for their financial support. Raphaëlle Youf is recipient of a PhD fellowship from the French “Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” (Paris, France).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

### Abbreviations

AIE	aggregation-induced emission
ALA	alanine
AMP	antimicrobial peptide
AMR	antimicrobial resistance
aPDT	antimicrobial PDT
ConA	concanavalin A
CNTs	carbon nanotubes
Ce6	chlorin e6
CFU	colony forming unit
e <sup>-</sup>	electron
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , and <i>Enterobacter</i> spp.
IC	internal conversion
ICG	indocyanine green
ISC	inter-system crossing
GO	graphene oxide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide
HO•	hydroxyl radical
MB	methylene blue
MDR	multidrug resistance
MRSA	methicillin resistant <i>S. aureus</i>
MOF	metal organic framework
NIR	near infrared
NO	nitric oxide
NP	nanoparticle
O <sub>2</sub>	dioxygen
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoxide anion radical
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singlet oxygen
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	ground state molecular oxygen
PDT	photodynamic therapy
PS	photosensitizer
PS <sup>•-</sup>	PS radical anion
<sup>1</sup> PS	PS in the ground state
<sup>1</sup> PS*	PS in a first excited singlet state
<sup>3</sup> PS*	PS in a triplet excited state
PEG	poly(ethylene glycol)
PCI	photochemical internalization
PCL	poly(ε-caprolactone)
PLA	poly(lactic acid)
pSi	porous silicon
PTT	photothermal therapy
QD	quantum dot
R	reduced molecule
R <sup>•+</sup>	oxidized molecule
RB	rose bengal
ROS	reactive oxygen species
SS	sonosensitizer
SDT	sonodynamic therapy
SPDT	sonophotodynamic therapy
SPION	superparamagnetic iron oxide NP
TB(O)	toluidine blue

UCNP	upconversion NP
UV	ultraviolet
WHO	world health organisation

## References

- Laxminarayan, R.; Matsoso, P.; Pant, S.; Brower, C.; Røttingen, J.-A.; Klugman, K.; Davies, S. Access to Effective Antimicrobials: A Worldwide Challenge. *Lancet* **2016**, *387*, 168–175. [[CrossRef](#)]
- Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 539. [[CrossRef](#)]
- Antoñanzas, F.; Goossens, H. The Economics of Antibiotic Resistance: A Claim for Personalised Treatments. *Eur. J. Health Econ.* **2019**, *20*, 483–485. [[CrossRef](#)]
- Cassini, A.; Högberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable Deaths and Disability-Adjusted Life-Years Caused by Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 56–66. [[CrossRef](#)]
- Dadgostar, P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 3903–3910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hutchings, M.I.; Truman, A.W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80. [[CrossRef](#)]
- Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R. Photoantimicrobials—Are We Afraid of the Light? *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, e49–e55. [[CrossRef](#)]
- Daniell, M.D.; Hill, J.S. A History of Photodynamic Therapy. *Aust. N. Z. J. Surg.* **1991**, *61*, 340–348. [[CrossRef](#)]
- Shi, X.; Zhang, C.Y.; Gao, J.; Wang, Z. Recent Advances in Photodynamic Therapy for Cancer and Infectious Diseases. *WIREs Nanomed. NanoBiotechnol.* **2019**, *11*, e1560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sabino, C.P.; Wainwright, M.; Ribeiro, M.S.; Sellera, F.P.; dos Anjos, C.; Baptista, M.d.S.; Lincopan, N. Global Priority Multidrug-Resistant Pathogens Do Not Resist Photodynamic Therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *208*, 111893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Le Gall, T.; Lemerrier, G.; Chevreux, S.; Tücking, K.-S.; Ravel, J.; Thétiot, F.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Montier, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure–Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2229–2239. [[CrossRef](#)]
- Cieplik, F.; Deng, D.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy—What We Know and What We Don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44*, 571–589. [[CrossRef](#)]
- Hu, X.; Huang, Y.-Y.; Wang, Y.; Wang, X.; Hamblin, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1299. [[CrossRef](#)]
- Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy—Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wozniak, A.; Grinholc, M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials—State of the Art. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 930. [[CrossRef](#)]
- Baier, J.; Maier, M.; Engl, R.; Landthaler, M.; Bäuml, W. Time-Resolved Investigations of Singlet Oxygen Luminescence in Water, in Phosphatidylcholine, and in Aqueous Suspensions of Phosphatidylcholine or HT29 Cells. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3041–3046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Maisch, T.; Baier, J.; Franz, B.; Maier, M.; Landthaler, M.; Szeimies, R.-M.; Bäuml, W. The Role of Singlet Oxygen and Oxygen Concentration in Photodynamic Inactivation of Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7223–7228. [[CrossRef](#)]
- Ogilby, P.R. Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181. [[CrossRef](#)]
- Foote, C.S. Definition of Type I and Type II Photosensitized Oxidation. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 659. [[CrossRef](#)]
- Baptista, M.d.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.; et al. Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 912–919. [[CrossRef](#)]
- Hamblin, M.R.; Abrahamse, H. Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism? *Antibiotics* **2020**, *9*, 53. [[CrossRef](#)]
- Quiroga, E.D.; Cormick, M.P.; Pons, P.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. Mechanistic Aspects of the Photodynamic Inactivation of *Candida Albicans* Induced by Cationic Porphyrin Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 332–339. [[CrossRef](#)]
- Wiehe, A.; O'Brien, J.M.; Senge, M.O. Trends and Targets in Antiviral Phototherapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 2565–2612. [[CrossRef](#)]
- Beirão, S.; Fernandes, S.; Coelho, J.; Faustino, M.A.F.; Tomé, J.P.C.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A.C.; Almeida, A.; Cunha, A. Photodynamic Inactivation of Bacterial and Yeast Biofilms with a Cationic Porphyrin. *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 1387–1396. [[CrossRef](#)]

25. Garcez, A.S.; Núñez, S.C.; Azambuja, N.; Fregnani, E.R.; Rodriguez, H.M.H.; Hamblin, M.R.; Suzuki, H.; Ribeiro, M.S. Effects of Photodynamic Therapy on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Biofilms by Bioluminescence Imaging and Scanning Electron Microscopic Analysis. *Photomed. Laser Surg.* **2013**, *31*, 519–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Alves, E.; Faustino, M.A.; Neves, M.G.; Cunha, A.; Tome, J.; Almeida, A. An Insight on Bacterial Cellular Targets of Photodynamic Inactivation. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 141–164. [[CrossRef](#)]
27. Mesquita, M.Q.; Dias, C.J.; Neves, M.G.P.M.S.; Almeida, A.; Faustino, M.A.F. Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules* **2018**, *23*, 2424. [[CrossRef](#)]
28. Lam, M.; Jou, P.C.; Lattif, A.A.; Lee, Y.; Malbasa, C.L.; Mukherjee, P.K.; Oleinick, N.L.; Ghannoum, M.A.; Cooper, K.D.; Baron, E.D. Photodynamic Therapy with Pc 4 Induces Apoptosis of *Candida Albicans*. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 904–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Konopka, K.; Goslinski, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *J. Dent. Res.* **2007**, *86*, 694–707. [[CrossRef](#)]
30. Hirakawa, K.; Ota, K.; Hirayama, J.; Oikawa, S.; Kawanishi, S. Nile Blue Can Photosensitize DNA Damage through Electron Transfer. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 649–655. [[CrossRef](#)]
31. Choi, S.S.; Lee, H.K.; Chae, H.S. In Vitro Photodynamic Antimicrobial Activity of Methylene Blue and Endoscopic White Light against *Helicobacter Pylori* 26695. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2010**, *101*, 206–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Abdulrahman, H.; Misba, L.; Ahmad, S.; Khan, A.U. Curcumin Induced Photodynamic Therapy Mediated Suppression of Quorum Sensing Pathway of *Pseudomonas Aeruginosa*: An Approach to Inhibit Biofilm In Vitro. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *30*, 101645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Boluki, E.; Moradi, M.; Azar, P.S.; Fekrazad, R.; Pourhajibagher, M.; Bahador, A. The Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy against Virulence Genes Expression in Colistin-Resistance *Acinetobacter Baumannii*: APDT in Genes Expression of Colistin-Resistance A. *Baumannii*. *Laser Ther.* **2019**, *28*, 27–33. [[CrossRef](#)]
34. Ghorbanzadeh, R.; Assadian, H.; Chiniforush, N.; Parker, S.; Pourakbari, B.; Ehsani, B.; Alikhani, M.Y.; Bahador, A. Modulation of Virulence in *Enterococcus Faecalis* Cells Surviving Antimicrobial Photodynamic Inactivation with Reduced Graphene Oxide-Curcumin: An *Ex Vivo* Biofilm Model. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *29*, 101643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pourhajibagher, M.; Plotino, G.; Chiniforush, N.; Bahador, A. Dual Wavelength Irradiation Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green and Metformin Doped with Nano-Curcumin as an Efficient Adjunctive Endodontic Treatment Modality. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *29*, 101628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Marasini, S.; Leanse, L.G.; Dai, T. Can Microorganisms Develop Resistance against Light Based Anti-Infective Agents? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *175*, 113822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tschowri, N.; Lindenberg, S.; Hengge, R. Molecular Function and Potential Evolution of the Biofilm-Modulating Blue Light-Signalling Pathway of *Escherichia Coli*. *Mol. Microbiol.* **2012**, *85*, 893–906. [[CrossRef](#)]
38. Prates, R.A.; Kato, I.T.; Ribeiro, M.S.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R. Influence of Multidrug Efflux Systems on Methylene Blue-Mediated Photodynamic Inactivation of *Candida Albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 1525–1532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tegos, G.P.; Masago, K.; Aziz, F.; Higginbotham, A.; Stermitz, F.R.; Hamblin, M.R. Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps Potentiate Antimicrobial Photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3202–3209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Khan, S.; Khan, S.N.; Akhtar, F.; Misba, L.; Meena, R.; Khan, A.U. Inhibition of Multi-Drug Resistant *Klebsiella Pneumoniae*: Nanoparticles Induced Photoinactivation in Presence of Efflux Pump Inhibitor. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *157*, 165–174. [[CrossRef](#)]
41. Kashef, N.; Akbarizare, M.; Kamrava, S.K. Effect of Sub-Lethal Photodynamic Inactivation on the Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation of Clinical *Staphylococcus Aureus* Isolates. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 368–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gollmer, A.; Felgenräger, A.; Bäuml, W.; Maisch, T.; Späth, A. A Novel Set of Symmetric Methylene Blue Derivatives Exhibits Effective Bacteria Photokilling—A Structure–Response Study. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 335–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Garcez, A.S.; Kaplan, M.; Jensen, G.J.; Scheidt, F.R.; Oliveira, E.M.; Suzuki, S.S. Effects of Antimicrobial Photodynamic Therapy on Antibiotic-Resistant *Escherichia Coli*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *32*, 102029. [[CrossRef](#)]
44. Pazziani, M.H.; Tonani, L.; de Menezes, H.D.; Bachmann, L.; Wainwright, M.; Braga, G.Ú.L.; von Zeska Kress, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Phenothiazinium Photosensitizers in Non-Vertebrate Model *Galleria Mellonella* Infected with *Fusarium Keratoplasticum* and *Fusarium Moniliforme*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *25*, 197–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Santezi, C.; Reina, B.D.; Dovigo, L.N. Curcumin-Mediated Photodynamic Therapy for the Treatment of Oral Infections—A Review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2018**, *21*, 409–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cieplik, F.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Hiller, K.-A.; Maisch, T.; Karygianni, L. Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct for Treatment of Deep Carious Lesions—A Systematic Review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2017**, *18*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Briggs, T.; Blunn, G.; Hislop, S.; Ramallete, R.; Bagley, C.; McKenna, D.; Coathup, M. Antimicrobial Photodynamic Therapy—a Promising Treatment for Prosthetic Joint Infections. *Lasers Med. Sci.* **2018**, *33*, 523–532. [[CrossRef](#)]
48. Qiao, Y.; Liu, X.; Li, B.; Han, Y.; Zheng, Y.; Yeung, K.W.K.; Li, C.; Cui, Z.; Liang, Y.; Li, Z.; et al. Treatment of MRSA-Infected Osteomyelitis Using Bacterial Capturing, Magnetically Targeted Composites with Microwave-Assisted Bacterial Killing. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Pappas, P.G.; Lionakis, M.S.; Arendrup, M.C.; Ostrosky-Zeichner, L.; Kullberg, B.J. Invasive Candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4*, 18026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. Baltazar, L.M.; Ray, A.; Santos, D.A.; Cisalpino, P.S.; Friedman, A.J.; Nosanchuk, J.D. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Fungal Infections. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Cabrini Carmello, J.; Alves, F.; Basso, F.G.; de Souza Costa, C.A.; Tedesco, A.C.; Lucas Primo, F.; Mima, E.G.d.O.; Pavarina, A.C. Antimicrobial Photodynamic Therapy Reduces Adhesion Capacity and Biofilm Formation of *Candida Albicans* from Induced Oral Candidiasis in Mice. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *27*, 402–407. [[CrossRef](#)]
52. Freire, F.; Ferraresi, C.; Jorge, A.O.C.; Hamblin, M.R. Photodynamic Therapy of Oral Candida Infection in a Mouse Model. *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *159*, 161–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Leanse, L.G.; Goh, X.S.; Dai, T. Quinine Improves the Fungicidal Effects of Antimicrobial Blue Light: Implications for the Treatment of Cutaneous Candidiasis. *Lasers Surg. Med.* **2020**, *52*, 569–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Janeth Rimachi Hidalgo, K.; Cabrini Carmello, J.; Carolina Jordão, C.; Aboud Barbugli, P.; de Sousa Costa, C.A.; Mima, E.G.d.O.; Pavarina, A.C. Antimicrobial Photodynamic Therapy in Combination with Nystatin in the Treatment of Experimental Oral Candidiasis Induced by *Candida Albicans* Resistant to Fluconazole. *Pharmaceutics* **2019**, *12*, 140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Shen, J.J.; Jemec, G.B.E.; Arendrup, M.C.; Saunte, D.M.L. Photodynamic Therapy Treatment of Superficial Fungal Infections: A Systematic Review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *31*, 101774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, Z.; Tang, J.; Sun, Y.; Gao, L. Effects of Photodynamic Inactivation on the Growth and Antifungal Susceptibility of *Rhizopus Oryzae*. *Mycopathologia* **2019**, *184*, 315–319. [[CrossRef](#)]
57. De Clercq, E.; Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 695–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Mohr, H.; Knüver-Hopf, J.; Gravemann, U.; Redecker-Klein, A.; Müller, T.H. West Nile Virus in Plasma Is Highly Sensitive to Methylene Blue-Light Treatment. *Transfusion* **2004**, *44*, 886–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ohtsuki, A.; Hasegawa, T.; Hirasawa, Y.; Tsuchihashi, H.; Ikeda, S. Photodynamic Therapy Using Light-Emitting Diodes for the Treatment of Viral Warts. *J. Dermatol.* **2009**, *36*, 525–528. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, W.; Zhang, A.; Sun, W.; Yue, Y.; Li, H. Efficacy and Safety of Photodynamic Therapy for Cervical Intraepithelial Neoplasia and Human Papilloma Virus Infection. *Medicine* **2018**, *97*, e10864. [[CrossRef](#)]
61. Almeida, A.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Control of COVID-19. *Antibiotics* **2020**, *9*, 320. [[CrossRef](#)]
62. Zarubaev, V.V.; Belousova, I.M.; Kiselev, O.I.; Piotrovsky, L.B.; Anfimov, P.M.; Krisko, T.C.; Muraviova, T.D.; Rylkov, V.V.; Starodubzev, A.M.; Sirotkin, A.C. Photodynamic Inactivation of Influenza Virus with Fullerene C60 Suspension in Allantoic Fluid. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2007**, *4*, 31–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Abada, Z.; Cojean, S.; Pomel, S.; Ferrié, L.; Akagah, B.; Lormier, A.T.; Loiseau, P.M.; Figadère, B. Synthesis and Antiprotozoal Activity of Original Porphyrin Precursors and Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 158–165. [[CrossRef](#)]
64. Espitia-Almeida, F.; Díaz-Urbe, C.; Vallejo, W.; Gómez-Camargo, D.; Romero Bohórquez, A.R. In Vitro Anti-Leishmanial Effect of Metallic Meso-Substituted Porphyrin Derivatives against *Leishmania Braziliensis* and *Leishmania Panamensis* Promastigotes Properties. *Molecules* **2020**, *25*, 1887. [[CrossRef](#)]
65. Alves, E.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; Cunha, Â.; Nadais, H.; Almeida, A. Potential Applications of Porphyrins in Photodynamic Inactivation beyond the Medical Scope. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2015**, *22*, 34–57. [[CrossRef](#)]
66. de Souza, L.M.; Venturini, F.P.; Inada, N.M.; Iermak, I.; Garbuio, M.; Mezzacappo, N.F.; de Oliveira, K.T.; Bagnato, V.S. Curcumin in Formulations against *Aedes Aegypti*: Mode of Action, Photolarvicidal and Ovicidal Activity. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *31*, 101840. [[CrossRef](#)]
67. Khater, H.; Hendawy, N.; Govindarajan, M.; Murugan, K.; Benelli, G. Photosensitizers in the Fight against Ticks: Safranin as a Novel Photodynamic Fluorescent Acaricide to Control the Camel Tick *Hyalomma Dromedarii* (Ixodidae). *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 3747–3758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Biel, M.A.; Pedigo, L.; Gibbs, A.; Loebel, N. Photodynamic Therapy of Antibiotic Resistant Biofilms in a Maxillary Sinus Model. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2013**, *3*, 468–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Biel, M.A.; Sievert, C.; Usacheva, M.; Teichert, M.; Wedell, E.; Loebel, N.; Rose, A.; Zimmermann, R. Reduction of Endotracheal Tube Biofilms Using Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Lasers Surg. Med.* **2011**, *43*, 586–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Karner, L.; Drechsler, S.; Metzger, M.; Hacobian, A.; Schädler, B.; Slezak, P.; Grillari, J.; Dungal, P. Antimicrobial Photodynamic Therapy Fighting Polymicrobial Infections—A Journey from In Vitro to In Vivo. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1332–1343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Calzavara-Pinton, P.G.; Venturini, M.; Capezzer, R.; Sala, R.; Zane, C. Photodynamic Therapy of Interdigital Mycoses of the Feet with Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2004**, *20*, 144–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Lin, J.; Wan, M.T. Current Evidence and Applications of Photodynamic Therapy in Dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2014**, *7*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Mannucci, E.; Genovese, S.; Monami, M.; Navalesi, G.; Dotta, F.; Anichini, R.; Romagnoli, F.; Gensini, G. Photodynamic Topical Antimicrobial Therapy for Infected Foot Ulcers in Patients with Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study—The D.A.N.T.E (Diabetic Ulcer Antimicrobial New Topical Treatment Evaluation) Study. *Acta Diabetol.* **2014**, *51*, 435–440. [[CrossRef](#)]
74. Morley, S.; Griffiths, J.; Philips, G.; Moseley, H.; O’Grady, C.; Mellish, K.; Lankester, C.L.; Faris, B.; Young, R.J.; Brown, S.B.; et al. Phase IIa Randomized, Placebo-Controlled Study of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Bacterially Colonized, Chronic

- Leg Ulcers and Diabetic Foot Ulcers: A New Approach to Antimicrobial Therapy. *Br. J. Dermatol.* **2013**, *168*, 617–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Tardivo, J.P.; Adami, F.; Correa, J.A.; Pinhal, M.A.S.; Baptista, M.S. A Clinical Trial Testing the Efficacy of PDT in Preventing Amputation in Diabetic Patients. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 342–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hamblin, M.R.; Viveiros, J.; Yang, C.; Ahmadi, A.; Ganz, R.A.; Tolkoff, M.J. Helicobacter Pylori Accumulates Photoactive Porphyrins and Is Killed by Visible Light. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2822–2827. [[CrossRef](#)]
77. Rahimi, R.; Fayyaz, F.; Rassa, M. The Study of Cellulosic Fabrics Impregnated with Porphyrin Compounds for Use as Photo-Bactericidal Polymers. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *59*, 661–668. [[CrossRef](#)]
78. Fonseca, G.A.M.D.; Dourado, D.C.; Barreto, M.P.; Cavalcanti, M.F.X.B.; Pavelski, M.D.; Ribeiro, L.B.Q.; Frigo, L. Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) for Decontamination of High-Speed Handpieces: A Comparative Study. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *30*, 101686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Abrahamse, H.; Hamblin, M.R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 347–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Ghorbani, J.; Rahban, D.; Aghamiri, S.; Teymouri, A.; Bahador, A. Photosensitizers in Antibacterial Photodynamic Therapy: An Overview. *Laser Ther.* **2018**, *27*, 293–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Polat, E.; Kang, K. Natural Photosensitizers in Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Biomedicines* **2021**, *9*, 584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Ahmad, A. Phthalocyanines Derivatives as Control Approach for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J. Am. J. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2019**, *2*, 8.
83. Amos-Tautua, B.M.; Songca, S.P.; Oluwafemi, O.S. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules* **2019**, *24*, 2456. [[CrossRef](#)]
84. Jeon, Y.-M.; Lee, H.-S.; Jeong, D.; Oh, H.-K.; Ra, K.-H.; Lee, M.-Y. Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Chlorin E6 with Halogen Light for Acne Bacteria-Induced Inflammation. *Life Sci.* **2015**, *124*, 56–63. [[CrossRef](#)]
85. Li, X.; Lee, D.; Huang, J.-D.; Yoon, J. Phthalocyanine-Assembled Nanodots as Photosensitizers for Highly Efficient Type I Photoreactions in Photodynamic Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9885–9890. [[CrossRef](#)]
86. Terra Garcia, M.; Correia Pereira, A.H.; Figueiredo-Godoi, L.M.A.; Jorge, A.O.C.; Strixino, J.F.; Junqueira, J.C. Photodynamic Therapy Mediated by Chlorin-Type Photosensitizers against *Streptococcus Mutans* Biofilms. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2018**, *24*, 256–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Zhang, Y.; Lovell, J.F. Recent Applications of Phthalocyanines and Naphthalocyanines for Imaging and Therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9*, e1420. [[CrossRef](#)]
88. Hirose, M.; Yoshida, Y.; Horii, K.; Hasegawa, Y.; Shibuya, Y. Efficacy of Antimicrobial Photodynamic Therapy with Rose Bengal and Blue Light against Cariogenic Bacteria. *Arch Oral Biol.* **2021**, *122*, 105024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Galdino, D.Y.T.; da Rocha Leódido, G.; Pavani, C.; Gonçalves, L.M.; Bussadori, S.K.; Benini Paschoal, M.A. Photodynamic Optimization by Combination of Xanthene Dyes on Different Forms of *Streptococcus Mutans*: An In Vitro Study. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**, *33*, 102191. [[CrossRef](#)]
90. Silva, A.F.; Dos Santos, A.R.; Trevisan, D.A.C.; Bonin, E.; Freitas, C.F.; Batista, A.F.P.; Hioka, N.; Simões, M.; Graton Mikcha, J.M. Xanthene Dyes and Green LED for the Inactivation of Foodborne Pathogens in Planktonic and Biofilm States. *Photochem Photobiol* **2019**, *95*, 1230–1238. [[CrossRef](#)]
91. Mizuno, K.; Zhiyentayev, T.; Huang, L.; Khalil, S.; Nasim, F.; Tegos, G.P.; Gali, H.; Jahnke, A.; Wharton, T.; Hamblin, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Functionalized Fullerenes: Quantitative Structure-Activity Relationships. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Sharma, S.K.; Chiang, L.Y.; Hamblin, M.R. Photodynamic Therapy with Fullerenes In Vivo: Reality or a Dream? *Nanomedicine* **2011**, *6*, 1813–1825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Yin, R.; Hamblin, M. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 2159–2185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ali, I.; Alsehli, M.; Scotti, L.; Tullius Scotti, M.; Tsai, S.-T.; Yu, R.-S.; Hsieh, M.F.; Chen, J.-C. Progress in Polymeric Nano-Medicines for Theranostic Cancer Treatment. *Polymers* **2020**, *12*, 598. [[CrossRef](#)]
95. Josefsen, L.B.; Boyle, R.W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Met.-Based Drugs* **2008**, *2008*, 1–23. [[CrossRef](#)]
96. Frei, A. Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential? *Antibiotics* **2020**, *9*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Frei, A.; Zuegg, J.; Elliott, A.G.; Baker, M.; Braese, S.; Brown, C.; Chen, F.; Dowson, C.G.; Dujardin, G.; Jung, N.; et al. Metal Complexes as a Promising Source for New Antibiotics. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2627–2639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Morrison, C.N.; Prosser, K.E.; Stokes, R.W.; Cordes, A.; Metzler-Nolte, N.; Cohen, S.M. Expanding Medicinal Chemistry into 3D Space: Metallofragments as 3D Scaffolds for Fragment-Based Drug Discovery. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 1216–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Galloway, W.R.J.D.; Isidro-Llobet, A.; Spring, D.R. Diversity-Oriented Synthesis as a Tool for the Discovery of Novel Biologically Active Small Molecules. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 80. [[CrossRef](#)]
100. Hung, A.W.; Ramek, A.; Wang, Y.; Kaya, T.; Wilson, J.A.; Clemons, P.A.; Young, D.W. Route to Three-Dimensional Fragments Using Diversity-Oriented Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6799–6804. [[CrossRef](#)]

101. Claudel, M.; Schwarte, J.V.; Fromm, K.M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. *Chemistry* **2020**, *2*, 56. [[CrossRef](#)]
102. Li, F.; Collins, J.G.; Keene, F.R. Ruthenium Complexes as Antimicrobial Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2529–2542. [[CrossRef](#)]
103. Deng, T.; Zhao, H.; Shi, M.; Qiu, Y.; Jiang, S.; Yang, X.; Zhao, Y.; Zhang, Y. Photoactivated Trifunctional Platinum Nanobiotics for Precise Synergism of Multiple Antibacterial Modes. *Small* **2019**, *15*, 1902647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Kirakci, K.; Zelenka, J.; Rumlová, M.; Cvačka, J.; Ruml, T.; Lang, K. Cationic Octahedral Molybdenum Cluster Complexes Functionalized with Mitochondria-Targeting Ligands: Photodynamic Anticancer and Antibacterial Activities. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 1386–1392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Sudhamani, C.N.; Bhojya Naik, H.S.; Sangeetha Gowda, K.R.; Girija, D.; Giridhar, M. DNA Binding, Prominent Photonuclease Activity and Antibacterial PDT of Cobalt(II) Complexes of Phenanthroline Based Photosensitizers. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2018**, *37*, 546–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wang, L.; Monro, S.; Cui, P.; Yin, H.; Liu, B.; Cameron, C.G.; Xu, W.; Hetu, M.; Fuller, A.; Kilina, S.; et al. Heteroleptic Ir(III)N<sub>6</sub> Complexes with Long-Lived Triplet Excited States and In Vitro Photobiological Activities. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 3629–3644. [[CrossRef](#)]
107. Munteanu, A.-C.; Uivarosi, V. Ruthenium Complexes in the Fight against Pathogenic Microorganisms. An Extensive Review. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 874. [[CrossRef](#)]
108. Jain, A.; Garrett, N.T.; Malone, Z.P. Ruthenium-based Photoactive Metalloantibiotics. *Photochem. Photobiol.* **2021**, php.13435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Frei, A.; Rubbiani, R.; Tubafard, S.; Blacque, O.; Anstaett, P.; Felgenträger, A.; Maisch, T.; Spiccia, L.; Gasser, G. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of New Ru(II) Polypyridyl Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7280–7292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Hamblin, M.R.; Hasan, T. Photodynamic Therapy: A New Antimicrobial Approach to Infectious Disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 436–450. [[CrossRef](#)]
111. Sun, W.; Jian, Y.; Zhou, M.; Yao, Y.; Tian, N.; Li, C.; Chen, J.; Wang, X.; Zhou, Q. Selective and Efficient Photoinactivation of Intracellular *Staphylococcus Aureus* and MRSA with Little Accumulation of Drug Resistance: Application of a Ru(II) Complex with Photolabile Ligands. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 7359–7370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Ibrahim, I.M.; Abdelmalek, D.H.; Elshahat, M.E.; Elfiky, A.A. COVID-19 Spike-Host Cell Receptor GRP78 Binding Site Prediction. *J. Infect.* **2020**, *80*, 554–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Wang, L.; Hu, C.; Shao, L. The Antimicrobial Activity of Nanoparticles: Present Situation and Prospects for the Future. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 1227–1249. [[CrossRef](#)]
114. Eleraky, N.E.; Allam, A.; Hassan, S.B.; Omar, M.M. Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 142. [[CrossRef](#)]
115. Khorsandi, K.; Fekrazad, S.; Vahdatinia, F.; Farmany, A.; Fekrazad, R. Nano Antiviral Photodynamic Therapy: A Probable Biophysicochemical Management Modality in SARS-CoV-2. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2021**, *18*, 265–272. [[CrossRef](#)]
116. Perni, S.; Prokopovich, P.; Pratten, J.; Parkin, I.P.; Wilson, M. Nanoparticles: Their Potential Use in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 712–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Basavegowda, N.; Baek, K.-H. Multimetallic Nanoparticles as Alternative Antimicrobial Agents: Challenges and Perspectives. *Molecules* **2021**, *26*, 912. [[CrossRef](#)]
118. Zhou, Z.; Peng, S.; Sui, M.; Chen, S.; Huang, L.; Xu, H.; Jiang, T. Multifunctional Nanocomplex for Surface-Enhanced Raman Scattering Imaging and near-Infrared Photodynamic Antimicrobial Therapy of Vancomycin-Resistant Bacteria. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *161*, 394–402. [[CrossRef](#)]
119. Gupta, A.; Landis, R.F.; Rotello, V.M. Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality Is Critical. *F1000Res* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Alfirmoud, R.A.; Garcia, I.M.; Balhaddad, A.A.; Collares, F.M.; Martinho, F.C.; Melo, M.A.S. Advancing Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection with Nanoparticles: Present Evidence and Upcoming Approaches. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 4759. [[CrossRef](#)]
121. Trigo-Gutierrez, J.K.; Vega-Chacón, Y.; Soares, A.B.; Mima, E.G.d.O. Antimicrobial Activity of Curcumin in Nanoformulations: A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Yetisgin, A.A.; Cetinel, S.; Zuvun, M.; Kosar, A.; Kutlu, O. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules* **2020**, *25*, 2193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Nair, A.B.; Morsy, M.A.; Shinu, P.; Kotta, S.; Chandrasekaran, M.; Tahir, A. Advances of Non-iron Metal Nanoparticles in Biomedicine. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2021**, *24*, 41–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Belekov, E.; Kholikov, K.; Cooper, L.; Banga, S.; Er, A.O. Improved Antimicrobial Properties of Methylene Blue Attached to Silver Nanoparticles. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *32*, 102012. [[CrossRef](#)]
125. Franci, G.; Falanga, A.; Galdiero, S.; Palomba, L.; Rai, M.; Morelli, G.; Galdiero, M. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules* **2015**, *20*, 8856–8874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Mottais, A.; Berchel, M.; Sibiril, Y.; Laurent, V.; Gill, D.; Hyde, S.; Jaffrès, P.-A.; Montier, T.; Le Gall, T. Antibacterial Effect and DNA Delivery Using a Combination of an Arsonium-Containing Lipophosphoramidate with an N-Heterocyclic Carbene-Silver Complex—Potential Benefits for Cystic Fibrosis Lung Gene Therapy. *Int. J. Pharm.* **2018**, *536*, 29–41. [[CrossRef](#)]

127. Ribeiro, M.S.; de Melo, L.S.A.; Farooq, S.; Baptista, A.; Kato, I.T.; Núñez, S.C.; de Araujo, R.E. Photodynamic Inactivation Assisted by Localized Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles: In Vitro Evaluation on *Escherichia Coli* and *Streptococcus Mutans*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2018**, *22*, 191–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Yamamoto, M.; Shitomi, K.; Miyata, S.; Miyaji, H.; Aota, H.; Kawasaki, H. Bovine Serum Albumin-Capped Gold Nanoclusters Conjugating with Methylene Blue for Efficient  $^1\text{O}_2$  Generation *via* Energy Transfer. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *510*, 221–227. [[CrossRef](#)]
129. Rizzi, V.; Vurro, D.; Placido, T.; Fini, P.; Petrella, A.; Semeraro, P.; Cosma, P. Gold-Chlorophyll a-Hybrid Nanoparticles and Chlorophyll a/Cetyltrimethylammonium Chloride Self-Assembled-Suprastructures as Novel Carriers for Chlorophyll a Delivery in Water Medium: Photoactivity and Photostability. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *161*, 555–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Miyata, S.; Miyaji, H.; Kawasaki, H.; Yamamoto, M.; Nishida, E.; Takita, H.; Akasaka, T.; Ushijima, N.; Iwanaga, T.; Sugaya, T. Antimicrobial Photodynamic Activity and Cytocompatibility of  $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$  Clusters Photoexcited by Blue LED Light Irradiation. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 2703–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Kubheka, G.; Uddin, I.; Amuhaya, E.; Mack, J.; Nyokong, T. Synthesis and Photophysicochemical Properties of BODIPY Dye Functionalized Gold Nanorods for Use in Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J. Porphy. Phthalocyanines* **2016**, *20*, 1016–1024. [[CrossRef](#)]
132. Okamoto, I.; Miyaji, H.; Miyata, S.; Shitomi, K.; Sugaya, T.; Ushijima, N.; Akasaka, T.; Enya, S.; Saita, S.; Kawasaki, H. Antibacterial and Antibiofilm Photodynamic Activities of Lysozyme-Au Nanoclusters/Rose Bengal Conjugates. *ACS Omega* **2021**, *6*, 9279–9290. [[CrossRef](#)]
133. Rigotto Caruso, G.; Tonani, L.; Marcato, P.D.; von Zeska Kress, M.R. Phenothiazinium Photosensitizers Associated with Silver Nanoparticles in Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Antibiotics* **2021**, *10*, 569. [[CrossRef](#)]
134. Morales-de-Echegaray, A.V.; Lin, L.; Sivasubramaniam, B.; Yermembetova, A.; Wang, Q.; Abutaleb, N.S.; Seleem, M.N.; Wei, A. Antimicrobial Photodynamic Activity of Gallium-Substituted Haemoglobin on Silver Nanoparticles. *Nanoscale* **2020**, *12*, 21734–21742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Parasuraman, P.; Thamanna, R.Y.; Shaji, C.; Sharan, A.; Bahkali, A.H.; Al-Harhi, H.F.; Syed, A.; Anju, V.T.; Dyavaiah, M.; Siddhardha, B. Biogenic Silver Nanoparticles Decorated with Methylene Blue Potentiated the Photodynamic Inactivation of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Chen, J.; Yang, L.; Chen, J.; Liu, W.; Zhang, D.; Xu, P.; Dai, T.; Shang, L.; Yang, Y.; Tang, S.; et al. Composite of Silver Nanoparticles and Photosensitizer Leads to Mutual Enhancement of Antimicrobial Efficacy and Promotes Wound Healing. *Chem. Eng. J.* **2019**, *374*, 1373–1381. [[CrossRef](#)]
137. Sen, P.; Nyokong, T. Enhanced Photodynamic Inactivation of *Staphylococcus Aureus* with Schiff Base Substituted Zinc Phthalocyanines through Conjugation to Silver Nanoparticles. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1232*, 130012. [[CrossRef](#)]
138. Shabangu, S.M.; Babu, B.; Soy, R.C.; Managa, M.; Sekhosana, K.E.; Nyokong, T. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy of Asymmetric Porphyrin-Silver Conjugates towards Photoinactivation of *Staphylococcus Aureus*. *J. Coord. Chem.* **2020**, *73*, 593–608. [[CrossRef](#)]
139. Wanarska, E.; Maliszewska, I. Gold Nanoparticles in an Enhancement of Antimicrobial Activity. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* **2020**, *56*, 269–279. [[CrossRef](#)]
140. Managa, M.; Antunes, E.; Nyokong, T. Conjugates of Platinum Nanoparticles with Gallium Tetra-(4-Carboxyphenyl) Porphyrin and Their Use in Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy When in Solution or Embedded in Electrospun Fiber. *Polyhedron* **2014**, *76*, 94–101. [[CrossRef](#)]
141. Ermini, M.L.; Voliani, V. Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age. *ACS Nano* **2021**, *15*, 6008–6029. [[CrossRef](#)]
142. Zhen, X.; Chudal, L.; Pandey, N.K.; Phan, J.; Ran, X.; Amador, E.; Huang, X.; Johnson, O.; Ran, Y.; Chen, W.; et al. A Powerful Combination of Copper-Cysteamine Nanoparticles with Potassium Iodide for Bacterial Destruction. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2020**, *110*, 110659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Sah, B.; Wu, J.; Vanasse, A.; Pandey, N.K.; Chudal, L.; Huang, Z.; Song, W.; Yu, H.; Ma, L.; Chen, W.; et al. Effects of Nanoparticle Size and Radiation Energy on Copper-Cysteamine Nanoparticles for X-Ray Induced Photodynamic Therapy. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Shkodenko, L.; Kassirov, I.; Koshel, E. Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Namanga, J.; Foba, J.; Ndinteh, D.T.; Yufanyi, D.M.; Krause, R.W.M. Synthesis and Magnetic Properties of a Superparamagnetic Nanocomposite "Pectin-Magnetite Nanocomposite". *J. Nanomater.* **2013**, *2013*, 87. [[CrossRef](#)]
146. Dadfar, S.M.; Camozzi, D.; Darguzyte, M.; Roemhild, K.; Varvarà, P.; Metselaar, J.; Banala, S.; Straub, M.; Güvener, N.; Engelmann, U.; et al. Size-Isolation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Improves MRI, MPI and Hyperthermia Performance. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 22. [[CrossRef](#)]
147. Alves, E.; Rodrigues, J.M.M.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Lin, Z.; Cunha, Â.; Nadais, M.H.; Tomé, J.P.C.; Almeida, A. A New Insight on Nanomagnet-Porphyrin Hybrids for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Dye. Pigment.* **2014**, *110*, 80–88. [[CrossRef](#)]
148. Bilici, K.; Atac, N.; Muti, A.; Baylam, I.; Dogan, O.; Sennaroglu, A.; Can, F.; Yagci Acar, H. Broad Spectrum Antibacterial Photodynamic and Photothermal Therapy Achieved with Indocyanine Green Loaded SPIONs under near Infrared Irradiation. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 4616–4625. [[CrossRef](#)]

149. de Santana, W.M.O.S.; Caetano, B.L.; de Annunzio, S.R.; Pulcinelli, S.H.; Ménager, C.; Fontana, C.R.; Santilli, C.V. Conjugation of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Curcumin Photosensitizer to Assist in Photodynamic Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *196*, 111297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Dube, E.; Soy, R.; Shumba, M.; Nyokong, T. Photophysicochemical Behaviour of Phenoxy Propanoic Acid Functionalised Zinc Phthalocyanines When Grafted onto Iron Oxide and Silica Nanoparticles: Effects in Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *J. Lumin.* **2021**, *234*, 117939. [[CrossRef](#)]
151. Mapukata, S.; Nwahara, N.; Nyokong, T. The Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy of *Staphylococcus Aureus* Using an Asymmetrical Zinc Phthalocyanine Conjugated to Silver and Iron Oxide Based Nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2020**, *402*, 112813. [[CrossRef](#)]
152. Scanone, A.C.; Gsponer, N.S.; Alvarez, M.G.; Heredia, D.A.; Durantini, A.M.; Durantini, E.N. Magnetic Nanoplatforms for *In Situ* Modification of Macromolecules: Synthesis, Characterization, and Photoinactivating Power of Cationic Nanoimman–Porphyrin Conjugates. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 5930–5940. [[CrossRef](#)]
153. Scanone, A.C.; Santamarina, S.C.; Heredia, D.A.; Durantini, E.N.; Durantini, A.M. Functionalized Magnetic Nanoparticles with BODIPYs for Bioimaging and Antimicrobial Therapy Applications. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 1061–1070. [[CrossRef](#)]
154. Sun, X.; Wang, L.; Lynch, C.D.; Sun, X.; Li, X.; Qi, M.; Ma, C.; Li, C.; Dong, B.; Zhou, Y.; et al. Nanoparticles Having Amphiphilic Silane Containing Chlorin E6 with Strong Anti-Biofilm Activity against Periodontitis-Related Pathogens. *J. Dent.* **2019**, *81*, 70–84. [[CrossRef](#)]
155. Toledo, V.H.; Yoshimura, T.M.; Pereira, S.T.; Castro, C.E.; Ferreira, F.F.; Ribeiro, M.S.; Haddad, P.S. Methylene Blue-Covered Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Combined with Red Light as a Novel Platform to Fight Non-Local Bacterial Infections: A Proof of Concept Study against *Escherichia Coli*. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, *209*, 111956. [[CrossRef](#)]
156. Qi, M.; Chi, M.; Sun, X.; Xie, X.; Weir, M.D.; Oates, T.W.; Zhou, Y.; Wang, L.; Bai, Y.; Xu, H.H. Novel Nanomaterial-Based Antibacterial Photodynamic Therapies to Combat Oral Bacterial Biofilms and Infectious Diseases. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 6937–6956. [[CrossRef](#)]
157. Collen Makola, L.; Nyokong, T.; Amuhaya, E.K. Impact of Axial Ligation on Photophysical and Photodynamic Antimicrobial Properties of Indium (III) Methylsulfanylphenyl Porphyrin Complexes Linked to Silver-Capped Copper Ferrite Magnetic Nanoparticles. *Polyhedron* **2021**, *193*, 114882. [[CrossRef](#)]
158. Makola, L.C.; Managa, M.; Nyokong, T. Enhancement of Photodynamic Antimicrobialtherapy through the Use of Cationic Indium Porphyrin Conjugated to Ag/CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *30*, 101736. [[CrossRef](#)]
159. Philip, S.; Kuriakose, S. Photodynamic Antifungal Activity of a Superparamagnetic and Fluorescent Drug Carrier System against Antibiotic-Resistant Fungal Strains. *Cellulose* **2021**, *28*, 9091–9102. [[CrossRef](#)]
160. Sun, X.; Sun, J.; Sun, Y.; Li, C.; Fang, J.; Zhang, T.; Wan, Y.; Xu, L.; Zhou, Y.; Wang, L.; et al. Oxygen Self-Sufficient Nanoplatform for Enhanced and Selective Antibacterial Photodynamic Therapy against Anaerobe-Induced Periodontal Disease. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31*, 2101040. [[CrossRef](#)]
161. Siddiqi, K.S.; Ur Rahman, A.; Tajuddin; Husen, A. Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, 141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Gudkov, S.V.; Burmistrov, D.E.; Serov, D.A.; Rebezov, M.B.; Semenova, A.A.; Lisitsyn, A.B. A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. *Front. Phys.* **2021**, *9*, 641481. [[CrossRef](#)]
163. Da Silva, B.L.; Abuçafy, M.P.; Manaia, E.B.; Junior, J.A.O.; Chiari-Andréo, B.G.; Pietro, R.C.R.; Chiavacci, L.A. Relationship Between Structure and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 9395–9410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Ziental, D.; Czarzynska-Goslinska, B.; Mlynarczyk, D.T.; Glowacka-Sobotta, A.; Stanisz, B.; Goslinski, T.; Sobotta, L. Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Joe, A.; Park, S.-H.; Shim, K.-D.; Kim, D.-J.; Jhee, K.-H.; Lee, H.-W.; Heo, C.-H.; Kim, H.-M.; Jang, E.-S. Antibacterial Mechanism of ZnO Nanoparticles under Dark Conditions. *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *45*, 430–439. [[CrossRef](#)]
166. Liou, J.-W.; Chang, H.-H. Bactericidal Effects and Mechanisms of Visible Light-Responsive Titanium Dioxide Photocatalysts on Pathogenic Bacteria. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2012**, *60*, 267–275. [[CrossRef](#)]
167. Oves, M.; Arshad, M.; Khan, M.S.; Ahmed, A.S.; Azam, A.; Ismail, I.M.I. Anti-Microbial Activity of Cobalt Doped Zinc Oxide Nanoparticles: Targeting Water Borne Bacteria. *J. Saudi Chem. Soc.* **2015**, *19*, 581–588. [[CrossRef](#)]
168. Raut, A.V.; Yadav, H.M.; Gnanamani, A.; Pushpavanam, S.; Pawar, S.H. Synthesis and Characterization of Chitosan-TiO<sub>2</sub>:Cu Nanocomposite and Their Enhanced Antimicrobial Activity with Visible Light. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *148*, 566–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Xu, X.; Dutta, A.; Khurgin, J.; Wei, A.; Shalae, V.M.; Boltasseva, A. TiN@TiO<sub>2</sub> Core-Shell Nanoparticles as Plasmon-Enhanced Photosensitizers: The Role of Hot Electron Injection. *Laser Photonics Rev.* **2020**, *14*, 1900376. [[CrossRef](#)]
170. Page, K.; Wilson, M.; Parkin, I.P. Antimicrobial Surfaces and Their Potential in Reducing the Role of the Inanimate Environment in the Incidence of Hospital-Acquired Infections. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3819–3831. [[CrossRef](#)]
171. Karthikeyan, K.T.; Nithya, A.; Jothivenkatachalam, K. Photocatalytic and Antimicrobial Activities of Chitosan-TiO<sub>2</sub> Nanocomposite. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1762–1773. [[CrossRef](#)]

172. Pantaroto, H.N.; Ricomini-Filho, A.P.; Bertolini, M.M.; Dias da Silva, J.H.; Azevedo Neto, N.F.; Sukotjo, C.; Rangel, E.C.; Barão, V.A.R. Antibacterial Photocatalytic Activity of Different Crystalline TiO<sub>2</sub> Phases in Oral Multispecies Biofilm. *Dent. Mater.* **2018**, *34*, e182–e195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Suketa, N.; Sawase, T.; Kitaura, H.; Naito, M.; Baba, K.; Nakayama, K.; Wennerberg, A.; Atsuta, M. An Antibacterial Surface on Dental Implants, Based on the Photocatalytic Bactericidal Effect. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2005**, *7*, 105–111. [[CrossRef](#)]
174. Kumar, S.G.; Devi, L.G. Review on Modified TiO<sub>2</sub> Photocatalysis under UV/Visible Light: Selected Results and Related Mechanisms on Interfacial Charge Carrier Transfer Dynamics. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 13211–13241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. De Dicastillo, C.L.; Correa, M.G.; Martínez, F.B.; Streitt, C.; Galotto, M.J. *Antimicrobial Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles*; IntechOpen: London, UK, 2020; ISBN 978-1-83962-433-9.
176. Farkhonde Masoule, S.; Pourhajibagher, M.; Safari, J.; Khoobi, M. Base-Free Green Synthesis of Copper(II) Oxide Nanoparticles Using Highly Cross-Linked Poly(Curcumin) Nanospheres: Synergistically Improved Antimicrobial Activity. *Res. Chem. Intermed.* **2019**, *45*, 4449–4462. [[CrossRef](#)]
177. Varaprasad, K.; López, M.; Núñez, D.; Jayaramudu, T.; Sadiku, E.R.; Karthikeyan, C.; Oyarzúnc, P. Antibiotic Copper Oxide-Curcumin Nanomaterials for Antibacterial Applications. *J. Mol. Liq.* **2020**, *300*, 112353. [[CrossRef](#)]
178. Xiu, W.; Gan, S.; Wen, Q.; Qiu, Q.; Dai, S.; Dong, H.; Li, Q.; Yuwen, L.; Weng, L.; Teng, Z.; et al. Biofilm Microenvironment-Responsive Nanotheranostics for Dual-Mode Imaging and Hypoxia-Relief-Enhanced Photodynamic Therapy of Bacterial Infections. *Research* **2020**, *2020*, 9426453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Sambhaji, R.B.; Vijay, J.S. Folate Tethered Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles Exhibit Photoactive Antimicrobial Effects and pH Responsive Delivery of 5-Fluorouracil into MCF-7 Cells. *Drug Deliv. Lett.* **2019**, *9*, 58–68.
180. Hossain, M.K.; Khan, M.I.; El-Denglawey, A. A Review on Biomedical Applications, Prospects, and Challenges of Rare Earth Oxides. *Appl. Mater. Today* **2021**, *24*, 101104. [[CrossRef](#)]
181. Matea, C.T.; Mocan, T.; Tabaran, F.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Puia, C.; Iancu, C.; Mocan, L. Quantum Dots in Imaging, Drug Delivery and Sensor Applications. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 5421–5431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Tang, Y.; Qin, Z.; Yin, S.; Sun, H. Transition Metal Oxide and Chalcogenide-Based Nanomaterials for Antibacterial Activities: An Overview. *Nanoscale* **2021**, *13*, 6373–6388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Rajendiran, K.; Zhao, Z.; Pei, D.-S.; Fu, A. Antimicrobial Activity and Mechanism of Functionalized Quantum Dots. *Polymers* **2019**, *11*, 1670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. McCollum, C.R.; Levy, M.; Bertram, J.R.; Nagpal, P.; Chatterjee, A. Photoexcited Quantum Dots as Efficacious and Nontoxic Antibiotics in an Animal Model. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 1863–1875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Nain, A.; Wei, S.-C.; Lin, Y.-F.; Tseng, Y.-T.; Mandal, R.P.; Huang, Y.-F.; Huang, C.-C.; Tseng, F.-G.; Chang, H.-T. Copper Sulfide Nanoassemblies for Catalytic and Photoresponsive Eradication of Bacteria from Infected Wounds. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 7865–7878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Jiang, C.; Scholle, F.; Ghiladi, R.A.; Dai, T.; Wu, M.X.; Popp, J. Mn-Doped Zn/S Quantum Dots as Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Inactivation. In *Photonic Diagnosis and Treatment of Infections and Inflammatory Diseases II*; SPIE BiOS: San Francisco, CA, USA, 2019; p. 10863. [[CrossRef](#)]
187. McCollum, C.R.; Bertram, J.R.; Nagpal, P.; Chatterjee, A. Photoactivated Indium Phosphide Quantum Dots Treat Multidrug-Resistant Bacterial Abscesses In Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 30404–30419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Tian, X.; Sun, Y.; Fan, S.; Boudreau, M.D.; Chen, C.; Ge, C.; Yin, J.-J. Photogenerated Charge Carriers in Molybdenum Disulfide Quantum Dots with Enhanced Antibacterial Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 4858–4866. [[CrossRef](#)]
189. Narband, N.; Mubarak, M.; Ready, D.; Parkin, I.P.; Nair, S.P.; Green, M.A.; Beeby, A.; Wilson, M. Quantum Dots as Enhancers of the Efficacy of Bacterial Lethal Photosensitization. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 445102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Nadeau, J.; Chibli, H.; Carlini, L. Photosensitization of InP/ZnS Quantum Dots for Anti-Cancer and Anti-Microbial Applications. In *Proceedings of the Colloidal Nanocrystals for Biomedical Applications VII*; SPIE: San Francisco, CA, USA, 2012; Volume 8232, pp. 87–95.
191. Liu, J.; Cheng, W.; Wang, Y.; Fan, X.; Shen, J.; Liu, H.; Wang, A.; Hui, A.; Nichols, F.; Chen, S. Cobalt-Doped Zinc Oxide Nanoparticle–MoS<sub>2</sub> Nanosheet Composites as Broad-Spectrum Bactericidal Agents. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4*, 4361–4370. [[CrossRef](#)]
192. Courtney, C.M.; Goodman, S.M.; McDaniel, J.A.; Madinger, N.E.; Chatterjee, A.; Nagpal, P. Photoexcited Quantum Dots for Killing Multidrug-Resistant Bacteria. *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 529–534. [[CrossRef](#)]
193. Goodman, S.M.; Levy, M.; Li, F.-F.; Ding, Y.; Courtney, C.M.; Chowdhury, P.P.; Erbse, A.; Chatterjee, A.; Nagpal, P. Designing Superoxide-Generating Quantum Dots for Selective Light-Activated Nanotherapy. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Ganguly, P.; Mathew, S.; Clarizia, L.; Kumar, R.S.; Akande, A.; Hinder, S.; Breen, A.; Pillai, S.C. Theoretical and Experimental Investigation of Visible Light Responsive AgBiS<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> Heterojunctions for Enhanced Photocatalytic Applications. *Appl. Catal. B Environ.* **2019**, *253*, 401–418. [[CrossRef](#)]
195. Nazir, M.; Aziz, M.I.; Ali, I.; Basit, M.A. Revealing Antimicrobial and Contrasting Photocatalytic Behavior of Metal Chalcogenide Deposited P25-TiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *Photonics Nanostruct.-Fundam. Appl.* **2019**, *36*, 100721. [[CrossRef](#)]
196. Suganya, M.; Balu, A.R.; Balamurugan, S.; Srivind, J.; Narasimman, V.; Manjula, N.; Rajashree, C.; Nagarethnam, V.S. Photoconductive, Photocatalytic and Antifungal Properties of PbS:Mo Nanoparticles Synthesized *via* Precipitation Method. *Surf. Interfaces* **2018**, *13*, 148–156. [[CrossRef](#)]

197. Schlachter, A.; Asselin, P.; Harvey, P.D. Porphyrin-Containing MOFs and COFs as Heterogeneous Photosensitizers for Singlet Oxygen-Based Antimicrobial Nanodevices. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 26651–26672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Qian, S.; Song, L.; Sun, L.; Zhang, X.; Xin, Z.; Yin, J.; Luan, S. Metal-Organic Framework/Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Hybrid Electrospun Nanofibrous Membranes with Effective Photodynamic Antibacterial Activities. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2020**, *400*, 112626. [[CrossRef](#)]
199. Nie, X.; Wu, S.; Mensah, A.; Wang, Q.; Huang, F.; Wei, Q. FRET as a Novel Strategy to Enhance the Singlet Oxygen Generation of Porphyrinic MOF Decorated Self-Disinfecting Fabrics. *Chem. Eng. J.* **2020**, *395*, 125012. [[CrossRef](#)]
200. Yu, P.; Han, Y.; Han, D.; Liu, X.; Liang, Y.; Li, Z.; Zhu, S.; Wu, S. In-Situ Sulfuration of Cu-Based Metal-Organic Framework for Rapid near-Infrared Light Sterilization. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *390*, 122126. [[CrossRef](#)]
201. Xiong, K.; Li, J.; Tan, L.; Cui, Z.; Li, Z.; Wu, S.; Liang, Y.; Zhu, S.; Liu, X. Ag<sub>2</sub>S Decorated Nanocubes with Enhanced Near-Infrared Photothermal and Photodynamic Properties for Rapid Sterilization. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2019**, *33*, 100201. [[CrossRef](#)]
202. Bagchi, D.; Bhattacharya, A.; Dutta, T.; Nag, S.; Wulferding, D.; Lemmens, P.; Pal, S.K. Nano MOF Entrapping Hydrophobic Photosensitizer for Dual-Stimuli-Responsive Unprecedented Therapeutic Action against Drug-Resistant Bacteria. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 1772–1780. [[CrossRef](#)]
203. Golmohamadpour, A.; Bahramian, B.; Khoobi, M.; Pourhajibagher, M.; Barikani, H.R.; Bahador, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy Assessment of Three Indocyanine Green-Loaded Metal-Organic Frameworks against *Enterococcus Faecalis*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2018**, *23*, 331–338. [[CrossRef](#)]
204. Wang, M.; Nian, L.; Cheng, Y.; Yuan, B.; Cheng, S.; Cao, C. Encapsulation of Colloidal Semiconductor Quantum Dots into Metal-Organic Frameworks for Enhanced Antibacterial Activity through Interfacial Electron Transfer. *Chem. Eng. J.* **2021**, *426*, 130832. [[CrossRef](#)]
205. Hynek, J.; Zelenka, J.; Rathouský, J.; Kubát, P.; Ruml, T.; Demel, J.; Lang, K. Designing Porphyrinic Covalent Organic Frameworks for the Photodynamic Inactivation of Bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 8527–8535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Liang, G.; Wang, H.; Shi, H.; Wang, H.; Zhu, M.; Jing, A.; Li, J.; Li, G. Recent Progress in the Development of Upconversion Nanomaterials in Bioimaging and Disease Treatment. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Zhang, T.; Ying, D.; Qi, M.; Li, X.; Fu, L.; Sun, X.; Wang, L.; Zhou, Y. Anti-Biofilm Property of Bioactive Upconversion Nanocomposites Containing Chlorin E6 against Periodontal Pathogens. *Molecules* **2019**, *24*, 2692. [[CrossRef](#)]
208. Chen, B.; Wang, F. Emerging Frontiers of Upconversion Nanoparticles. *Trends Chem.* **2020**, *2*, 427–439. [[CrossRef](#)]
209. Yao, J.; Huang, C.; Liu, C.; Yang, M. Upconversion Luminescence Nanomaterials: A Versatile Platform for Imaging, Sensing, and Therapy. *Talanta* **2020**, *208*, 120157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Li, Z.; Lu, S.; Liu, W.; Dai, T.; Ke, J.; Li, X.; Li, R.; Zhang, Y.; Chen, Z.; Chen, X. Synergistic Lysozyme-Photodynamic Therapy Against Resistant Bacteria Based on an Intelligent Upconversion Nanoplatfrom. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 19201–19206. [[CrossRef](#)]
211. Wang, Z.; Liu, C.; Zhao, Y.; Hu, M.; Ma, D.; Zhang, P.; Xue, Y.; Li, X. Photomagnetic Nanoparticles in Dual-Modality Imaging and Photo-Sonodynamic Activity against Bacteria. *Chem. Eng. J.* **2019**, *356*, 811–818. [[CrossRef](#)]
212. Li, S.; Cui, S.; Yin, D.; Zhu, Q.; Ma, Y.; Qian, Z.; Gu, Y. Dual Antibacterial Activities of a Chitosan-Modified Upconversion Photodynamic Therapy System against Drug-Resistant Bacteria in Deep Tissue. *Nanoscale* **2017**, *9*, 3912–3924. [[CrossRef](#)]
213. Zhang, Y.; Huang, P.; Wang, D.; Chen, J.; Liu, W.; Hu, P.; Huang, M.; Chen, X.; Chen, Z. Near-Infrared-Triggered Antibacterial and Antifungal Photodynamic Therapy Based on Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10*, 15485–15495. [[CrossRef](#)]
214. Sharma, B.; Kaur, G.; Chaudhary, G.R.; Gawali, S.L.; Hassan, P.A. High Antimicrobial Photodynamic Activity of Photosensitizer Encapsulated Dual-Functional Metallocatanionic Vesicles against Drug-Resistant Bacteria *S. Aureus*. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 2905–2920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Kaur, G.; Berwal, K.; Sharma, B.; Chaudhary, G.R.; Gawali, S.L.; Hassan, P.A. Enhanced Antimicrobial Photodynamic Activity of Photosensitizer Encapsulated Copper Based Metallocatanionic Vesicles against *E. coli* Using Visible Light. *J. Mol. Liq.* **2021**, *324*, 114688. [[CrossRef](#)]
216. Wang, D.; Niu, L.; Qiao, Z.-Y.; Cheng, D.-B.; Wang, J.; Zhong, Y.; Bai, F.; Wang, H.; Fan, H. Synthesis of Self-Assembled Porphyrin Nanoparticle Photosensitizers. *ACS Nano* **2018**, *12*, 3796–3803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Park, Y.; Yoo, J.; Kang, M.-H.; Kwon, W.; Joo, J. Photoluminescent and Biodegradable Porous Silicon Nanoparticles for Biomedical Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 6271–6292. [[CrossRef](#)]
218. Jabir, M.S.; Nayef, U.M.; Jawad, K.H.; Taqi, Z.J.; Buthenhia, A.H.; Ahmed, N.R. Porous Silicon Nanoparticles Prepared via an Improved Method: A Developing Strategy for a Successful Antimicrobial Agent against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *454*, 012077. [[CrossRef](#)]
219. Xiao, L.; Gu, L.; Howell, S.B.; Sailor, M.J. Porous Silicon Nanoparticle Photosensitizers for Singlet Oxygen and Their Phototoxicity against Cancer Cells. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3651–3659. [[CrossRef](#)]
220. Secret, E.; Maynadier, M.; Gallud, A.; Gary-Bobo, M.; Chaix, A.; Belamie, E.; Maillard, P.; Sailor, M.J.; Garcia, M.; Durand, J.-O.; et al. Anionic Porphyrin-Grafted Porous Silicon Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4202–4204. [[CrossRef](#)]

221. Chaix, A.; Cheikh, K.E.; Bouffard, E.; Maynadier, M.; Aggad, D.; Stojanovic, V.; Knezevic, N.; Garcia, M.; Maillard, P.; Morère, A.; et al. Mesoporous Silicon Nanoparticles for Targeted Two-Photon Theranostics of Prostate Cancer. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 3639–3642. [[CrossRef](#)]
222. Näkki, S.; Martínez, J.O.; Evangelopoulos, M.; Xu, W.; Lehto, V.-P.; Tasciotti, E. Chlorin E6 Functionalized Theranostic Multistage Nanovectors Transported by Stem Cells for Effective Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 23441–23449. [[CrossRef](#)]
223. Knežević, N.Ž.; Stojanovic, V.; Chaix, A.; Bouffard, E.; Cheikh, K.E.; Morère, A.; Maynadier, M.; Lemerrier, G.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; et al. Ruthenium(II) Complex-Photosensitized Multifunctionalized Porous Silicon Nanoparticles for Two-Photon near-Infrared Light Responsive Imaging and Photodynamic Cancer Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 1337–1342. [[CrossRef](#)]
224. Capeletti, L.B.; de Oliveira, L.F.; Gonçalves, K.d.A.; de Oliveira, J.F.A.; Saito, Â.; Kobarg, J.; dos Santos, J.H.Z.; Cardoso, M.B. Tailored Silica–Antibiotic Nanoparticles: Overcoming Bacterial Resistance with Low Cytotoxicity. *Langmuir* **2014**, *30*, 7456–7464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Guo, Y.; Rogelj, S.; Zhang, P. Rose Bengal-Decorated Silica Nanoparticles as Photosensitizers for Inactivation of Gram-Positive Bacteria. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 065102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Wang, C.; Chen, P.; Qiao, Y.; Kang, Y.; Yan, C.; Yu, Z.; Wang, J.; He, X.; Wu, H. PH Responsive Superporogen Combined with PDT Based on Poly Ce6 Ionic Liquid Grafted on SiO<sub>2</sub> for Combating MRSA Biofilm Infection. *Theranostics* **2020**, *10*, 4795–4808. [[CrossRef](#)]
227. Scanone, A.C.; Gsponer, N.S.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. Photodynamic Properties and Photoinactivation of Microorganisms Mediated by 5,10,15,20-Tetrakis(4-Carboxyphenyl)Porphyrin Covalently Linked to Silica-Coated Magnetite Nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2017**, *346*, 452–461. [[CrossRef](#)]
228. Mesquita, M.Q.; Menezes, J.C.J.M.D.S.; Pires, S.M.G.; Neves, M.G.P.M.S.; Simões, M.M.Q.; Tomé, A.C.; Cavaleiro, J.A.S.; Cunha, Â.; Daniel-da-Silva, A.L.; Almeida, A.; et al. Pyrrolidine-Fused Chlorin Photosensitizer Immobilized on Solid Supports for the Photoinactivation of Gram Negative Bacteria. *Dye. Pigment.* **2014**, *110*, 123–133. [[CrossRef](#)]
229. Baigorria, E.; Reynoso, E.; Alvarez, M.G.; Milanesio, M.E.; Durantini, E.N. Silica Nanoparticles Embedded with Water Insoluble Phthalocyanines for the Photoinactivation of Microorganisms. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2018**, *23*, 261–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Amin, A.; Kaduskar, D.V. Comparative Study on Photodynamic Activation of Ortho-Toluidine Blue and Methylene Blue Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles Against Resistant Microorganisms. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2018**, *12*, 154–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
231. Paramanatham, P.; Siddhardha, B.; Sb, S.L.; Sharan, A.; Alyousef, A.A.; Dosary, M.S.A.; Arshad, M.; Syed, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy on *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* Using Malachite Green Encapsulated Mesoporous Silica Nanoparticles: An In Vitro Study. *PeerJ* **2019**, *7*, e7454. [[CrossRef](#)]
232. Parasuraman, P.; Antony, A.P.; S.B, S.L.; Sharan, A.; Siddhardha, B.; Kasinathan, K.; Bahkali, N.A.; Dawoud, T.M.S.; Syed, A. Antimicrobial Photodynamic Activity of Toluidine Blue Encapsulated in Mesoporous Silica Nanoparticles against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*. *Biofouling* **2019**, *35*, 89–103. [[CrossRef](#)]
233. Wysocka-Król, K.; Olsztyńska-Janus, S.; Plesch, G.; Plecenik, A.; Podbielska, H.; Bauer, J. Nano-Silver Modified Silica Particles in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *461*, 260–268. [[CrossRef](#)]
234. Liu, Y.; Liu, X.; Xiao, Y.; Chen, F.; Xiao, F. A Multifunctional Nanoplatfrom Based on Mesoporous Silica Nanoparticles for Imaging-Guided Chemo/Photodynamic Synergetic Therapy. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 31133–31141. [[CrossRef](#)]
235. Grüner, M.C.; Arai, M.S.; Carreira, M.; Inada, N.; de Camargo, A.S.S. Functionalizing the Mesoporous Silica Shell of Upconversion Nanoparticles to Enhance Bacterial Targeting and Killing via Photosensitizer-Induced Antimicrobial Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2018**, *1*, 1028–1036. [[CrossRef](#)]
236. Mapukata, S.; Britton, J.; Osifeko, O.L.; Nyokong, T. The Improved Antibacterial Efficiency of a Zinc Phthalocyanine When Embedded on Silver Nanoparticle Modified Silica Nanofibers. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2021**, *33*, 102100. [[CrossRef](#)]
237. Al-Omari, S. Toward a Molecular Understanding of the Photosensitizer-Copper Interaction for Tumor Destruction. *Biophys. Rev.* **2013**, *5*, 305–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Eckl, D.B.; Dengler, L.; Nemmert, M.; Eichner, A.; Bäuml, W.; Huber, H. A Closer Look at Dark Toxicity of the Photosensitizer TMPyP in Bacteria. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 165–172. [[CrossRef](#)]
239. Ma, J.; Liu, C.; Yan, K. CQDs-MoS<sub>2</sub> QDs Loaded on Dendritic Fibrous Nanosilica/Hydrophobic Waterborne Polyurethane Acrylate for Antibacterial Coatings. *Chem. Eng. J.* **2022**, *429*, 132170. [[CrossRef](#)]
240. Zhao, Z.; Yan, R.; Wang, J.; Wu, H.; Wang, Y.; Chen, A.; Shao, S.; Li, Y.-Q. A Bacteria-Activated Photodynamic Nanosystem Based on Polyelectrolyte-Coated Silica Nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 3572–3579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
241. Planas, O.; Bresolí-Obach, R.; Nos, J.; Gallavardin, T.; Ruiz-González, R.; Agut, M.; Nonell, S. Synthesis, Photophysical Characterization, and Photoinduced Antibacterial Activity of Methylene Blue-Loaded Amino- and Mannose-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles. *Molecules* **2015**, *20*, 6284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Paramanatham, P.; Anju, V.T.; Dyavaiah, M.; Siddhardha, B. Applications of Carbon-Based Nanomaterials for Antimicrobial Photodynamic Therapy. In *Microbial Nanobionics: Volume 2, Basic Research and Applications*; Prasad, R., Ed.; Nanotechnology in the Life Sciences; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; pp. 237–259. ISBN 978-3-030-16534-5.
243. Alavi, M.; Jabari, E.; Jabbari, E. Functionalized Carbon-Based Nanomaterials and Quantum Dots with Antibacterial Activity: A Review. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2021**, *19*, 35–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

244. Bacakova, L.; Pajorova, J.; Tomkova, M.; Matejka, R.; Broz, A.; Stepanovska, J.; Prazak, S.; Skogberg, A.; Siljander, S.; Kallio, P. Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Agazzi, M.L.; Durantini, J.E.; Gsponer, N.S.; Durantini, A.M.; Bertolotti, S.G.; Durantini, E.N. Light-Harvesting Antenna and Proton-Activated Photodynamic Effect of a Novel BODIPY–Fullerene C60 Dyad as Potential Antimicrobial Agent. *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 1110–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Agazzi, M.L.; Almodovar, V.A.S.; Gsponer, N.S.; Bertolotti, S.; Tomé, A.C.; Durantini, E.N. Diketopyrrolopyrrole–Fullerene C60 Architectures as Highly Efficient Heavy Atom-Free Photosensitizers: Synthesis, Photophysical Properties and Photodynamic Activity. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 1449–1461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Agazzi, M.L.; Durantini, J.E.; Quiroga, E.D.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. A Novel Tricationic Fullerene C60 as Broad-Spectrum Antimicrobial Photosensitizer: Mechanisms of Action and Potentiation with Potassium Iodide. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2021**, *20*, 327–341. [[CrossRef](#)]
248. Huang, Y.-Y.; Sharma, S.K.; Yin, R.; Agrawal, T.; Chiang, L.Y.; Hamblin, M.R. Functionalized Fullerenes in Photodynamic Therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1918–1936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Palacios, Y.B.; Durantini, J.E.; Heredia, D.A.; Martínez, S.R.; González de la Torre, L.; Durantini, A.M. Tuning the Polarity of Fullerene C60 Derivatives for Enhanced Photodynamic Inactivation. *Photochem. Photobiol.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Reynoso, E.; Durantini, A.M.; Solis, C.A.; Macor, L.P.; Otero, L.A.; Gervaldo, M.A.; Durantini, E.N.; Heredia, D.A. Photoactive Antimicrobial Coating Based on a PEDOT–Fullerene C60 Polymeric Dyad. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 23519–23532. [[CrossRef](#)]
251. Spesia, M.B.; Milanesio, M.E.; Durantini, E.N. Chapter 18—Fullerene Derivatives in Photodynamic Inactivation of Microorganisms. In *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*; Fikai, A., Grumezescu, A.M., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 413–433. ISBN 978-0-323-46152-8.
252. Anju, V.T.; Paramanatham, P.; S.B, S.L.; Sharan, A.; Syed, A.; Bahkali, N.A.; Alsaedi, M.H.; K., K.; Busi, S. Antimicrobial Photodynamic Activity of Toluidine Blue–Carbon Nanotube Conjugate against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*—Understanding the Mechanism of Action. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *27*, 305–316. [[CrossRef](#)]
253. Tondro, G.H.; Behzadpour, N.; Keykhaee, Z.; Akbari, N.; Sattarahmady, N. Carbon@polypyrrole Nanotubes as a Photosensitizer in Laser Phototherapy of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *180*, 481–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. Anju, V.T.; Paramanatham, P.; Siddhardha, B.; Lal, S.S.; Sharan, A.; Alyousef, A.A.; Arshad, M.; Syed, A. Malachite Green–Conjugated Multi-Walled Carbon Nanotubes Potentiate Antimicrobial Photodynamic Inactivation of Planktonic Cells and Biofilms of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 3861–3874. [[CrossRef](#)]
255. Parasuraman, P.; Anju, V.T.; Lal, S.S.; Sharan, A.; Busi, S.; Kaviyarasu, K.; Arshad, M.; Dawoud, T.M.S.; Syed, A. Synthesis and Antimicrobial Photodynamic Effect of Methylene Blue Conjugated Carbon Nanotubes on *E. Coli* and *S. Aureus*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 563–576. [[CrossRef](#)]
256. Vt, A.; Paramanatham, P.; Sb, S.L.; Sharan, A.; Alsaedi, M.H.; Dawoud, T.M.S.; Asad, S.; Busi, S. Antimicrobial Photodynamic Activity of Rose Bengal Conjugated Multi Walled Carbon Nanotubes against Planktonic Cells and Biofilm of *Escherichia Coli*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2018**, *24*, 300–310. [[CrossRef](#)]
257. Sah, U.; Sharma, K.; Chaudhri, N.; Sankar, M.; Gopinath, P. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Single-Walled Carbon Nanotube (SWCNT)–Porphyrin Conjugate for Visible Light Mediated Inactivation of *Staphylococcus Aureus*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *162*, 108–117. [[CrossRef](#)]
258. Szunerits, S.; Barras, A.; Boukherroub, R. Antibacterial Applications of Nanodiamonds. *Int. J. Environ. Res Public Health* **2016**, *13*, 413. [[CrossRef](#)]
259. Hurtado, C.R.; Hurtado, G.R.; de Cena, G.L.; Queiroz, R.C.; Silva, A.V.; Diniz, M.F.; dos Santos, V.R.; Trava-Airoldi, V.; Baptista, M.d.S.; Tsolekile, N.; et al. Diamond Nanoparticles–Porphyrin MTHPP Conjugate as Photosensitizing Platform: Cytotoxicity and Antibacterial Activity. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1393. [[CrossRef](#)]
260. Openda, Y.I.; Nyokong, T. Enhanced Photo-Ablation Effect of Positively Charged Phthalocyanines–Detonation Nanodiamonds Nanoplatfoms for the Suppression of *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* Planktonic Cells and Biofilms. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2021**, *411*, 113200. [[CrossRef](#)]
261. Openda, Y.I.; Nyokong, T. Detonation Nanodiamonds–Phthalocyanine Photosensitizers with Enhanced Photophysicochemical Properties and Effective Photoantibacterial Activity. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *32*, 102072. [[CrossRef](#)]
262. Openda, Y.I.; Ngoy, B.P.; Nyokong, T. Photodynamic Antimicrobial Action of Asymmetrical Porphyrins Functionalized Silver–Detonation Nanodiamonds Nanoplatfoms for the Suppression of *Staphylococcus Aureus* Planktonic Cells and Biofilms. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 97. [[CrossRef](#)]
263. Gayen, B.; Palchoudhury, S.; Chowdhury, J. Carbon Dots: A Mystic Star in the World of Nanoscience. *J. Nanomater.* **2019**, *2019*, e3451307. [[CrossRef](#)]
264. Knoblauch, R.; Geddes, C.D. Carbon Nanodots in Photodynamic Antimicrobial Therapy: A Review. *Materials* **2020**, *13*, 4004. [[CrossRef](#)]
265. Moniruzzaman, M.; Lakshmi, B.A.; Kim, S.; Kim, J. Preparation of Shape-Specific (Trilateral and Quadrilateral) Carbon Quantum Dots towards Multiple Color Emission. *Nanoscale* **2020**, *12*, 11947–11959. [[CrossRef](#)]

266. Dong, X.; Ge, L.; Abu Rabe, D.I.; Mohammed, O.O.; Wang, P.; Tang, Y.; Kathariou, S.; Yang, L.; Sun, Y.-P. Photoexcited State Properties and Antibacterial Activities of Carbon Dots Relevant to Mechanistic Features and Implications. *Carbon* **2020**, *170*, 137–145. [[CrossRef](#)]
267. Knoblauch, R.; Harvey, A.; Geddes, C.D. Metal-Enhanced Photosensitization of Singlet Oxygen ( $ME_1O_2$ ) from Brominated Carbon Nanodots on Silver Nanoparticle Substrates. *Plasmonics* **2021**, *16*, 1765–1772. [[CrossRef](#)]
268. Kováčová, M.; Špitalská, E.; Markovic, Z.; Špitálský, Z. Carbon Quantum Dots As Antibacterial Photosensitizers and Their Polymer Nanocomposite Applications. *Part. Part. Syst. Charact.* **2020**, *37*, 1900348. [[CrossRef](#)]
269. Marković, Z.M.; Kováčová, M.; Humpolíček, P.; Budimir, M.D.; Vajd'ák, J.; Kubát, P.; Mičušík, M.; Švajdlenková, H.; Danko, M.; Capáková, Z.; et al. Antibacterial Photodynamic Activity of Carbon Quantum Dots/Polydimethylsiloxane Nanocomposites against *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *26*, 342–349. [[CrossRef](#)]
270. Tejwan, N.; Saini, A.K.; Sharma, A.; Singh, T.A.; Kumar, N.; Das, J. Metal-Doped and Hybrid Carbon Dots: A Comprehensive Review on Their Synthesis and Biomedical Applications. *J. Control. Release* **2021**, *330*, 132–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
271. Zhang, J.; Lu, X.; Tang, D.; Wu, S.; Hou, X.; Liu, J.; Wu, P. Phosphorescent Carbon Dots for Highly Efficient Oxygen Photosensitization and as Photo-Oxidative Nanozymes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 40808–40814. [[CrossRef](#)]
272. Dong, Y.; Lin, J.; Chen, Y.; Fu, F.; Chi, Y.; Chen, G. Graphene Quantum Dots, Graphene Oxide, Carbon Quantum Dots and Graphite Nanocrystals in Coals. *Nanoscale* **2014**, *6*, 7410–7415. [[CrossRef](#)]
273. Tian, P.; Tang, L.; Teng, K.S.; Lau, S.P. Graphene Quantum Dots from Chemistry to Applications. *Mater. Today Chem.* **2018**, *10*, 221–258. [[CrossRef](#)]
274. Cui, F.; Ye, Y.; Ping, J.; Sun, X. Carbon Dots: Current Advances in Pathogenic Bacteria Monitoring and Prospect Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *156*, 112085. [[CrossRef](#)]
275. Anand, A.; Unnikrishnan, B.; Wei, S.-C.; Chou, C.P.; Zhang, L.-Z.; Huang, C.-C. Graphene Oxide and Carbon Dots as Broad-Spectrum Antimicrobial Agents—A Minireview. *Nanoscale Horiz.* **2019**, *4*, 117–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
276. Karahan, H.E.; Wiraja, C.; Xu, C.; Wei, J.; Wang, Y.; Wang, L.; Liu, F.; Chen, Y. Graphene Materials in Antimicrobial Nanomedicine: Current Status and Future Perspectives. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1701406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
277. Kuo, W.-S.; Shao, Y.-T.; Huang, K.-S.; Chou, T.-M.; Yang, C.-H. Antimicrobial Amino-Functionalized Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots for Eliminating Multidrug-Resistant Species in Dual-Modality Photodynamic Therapy and Bioimaging under Two-Photon Excitation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 14438–14446. [[CrossRef](#)]
278. Ristic, B.Z.; Milenkovic, M.M.; Dakic, I.R.; Todorovic-Markovic, B.M.; Milosavljevic, M.S.; Budimir, M.D.; Paunovic, V.G.; Dramicanin, M.D.; Markovic, Z.M.; Trajkovic, V.S. Photodynamic Antibacterial Effect of Graphene Quantum Dots. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4428–4435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
279. Sen, P.; Nwahara, N.; Nyokong, T. Photodynamic Antimicrobial Activity of Benzimidazole Substituted Phthalocyanine When Conjugated to Nitrogen Doped Graphene Quantum Dots against *Staphylococcus Aureus*. *Main Group Chem.* **2021**, *20*, 175–191. [[CrossRef](#)]
280. Yu, Y.; Mei, L.; Shi, Y.; Zhang, X.; Cheng, K.; Cao, F.; Zhang, L.; Xu, J.; Li, X.; Xu, Z. Ag-Conjugated Graphene Quantum Dots with Blue Light-Enhanced Singlet Oxygen Generation for Ternary-Mode Highly-Efficient Antimicrobial Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 1371–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
281. Ferro, S.; Ricchelli, F.; Mancini, G.; Tognon, G.; Jori, G. Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) by Liposome-Delivered Photosensitising Agents. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *83*, 98–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
282. Jeong, S.; Lee, J.; Im, B.N.; Park, H.; Na, K. Combined Photodynamic and Antibiotic Therapy for Skin Disorder via Lipase-Sensitive Liposomes with Enhanced Antimicrobial Performance. *Biomaterials* **2017**, *141*, 243–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
283. Miretti, M.; Juri, L.; Cosiansi, M.C.; Tempesti, T.C.; Baumgartner, M.T. Antimicrobial Effects of ZnPc Delivered into Liposomes on Multidrug Resistant (MDR)-*Mycobacterium Tuberculosis*. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 9726–9730. [[CrossRef](#)]
284. Plenagl, N.; Seitz, B.S.; Duse, L.; Pinnapireddy, S.R.; Jedelska, J.; Brüssel, J.; Bakowsky, U. Hypericin Inclusion Complexes Encapsulated in Liposomes for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Int. J. Pharm.* **2019**, *570*, 118666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
285. Sobotta, L.; Długaszewska, J.; Ziental, D.; Szczolko, W.; Koczorowski, T.; Goslinski, T.; Mielcarek, J. Optical Properties of a Series of Pyrrolyl-Substituted Porphyrazines and Their Photoinactivation Potential against *Enterococcus Faecalis* after Incorporation into Liposomes. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2019**, *368*, 104–109. [[CrossRef](#)]
286. Wieczorek, E.; Mlynarczyk, D.T.; Kucinska, M.; Długaszewska, J.; Piskorz, J.; Popena, L.; Szczolko, W.; Jurga, S.; Murias, M.; Mielcarek, J.; et al. Photophysical Properties and Photocytotoxicity of Free and Liposome-Entrapped Diazepinoporphyrazines on LNCaP Cells under Normoxic and Hypoxic Conditions. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
287. Babaie, S.; Bakhshayesh, A.R.D.; Ha, J.W.; Hamishehkar, H.; Kim, K.H. Invasome: A Novel Nanocarrier for Transdermal Drug Delivery. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
288. Opatha, S.A.T.; Titapiwatanakun, V.; Chutoprapat, R. Transfersomes: A Promising Nanoencapsulation Technique for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
289. Park, H.; Lee, J.; Jeong, S.; Im, B.N.; Kim, M.-K.; Yang, S.-G.; Na, K. Lipase-Sensitive Transfersomes Based on Photosensitizer/Polymerizable Lipid Conjugate for Selective Antimicrobial Photodynamic Therapy of Acne. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 3139–3147. [[CrossRef](#)]
290. Wang, Y.; Song, J.; Zhang, F.; Zeng, K.; Zhu, X. Antifungal Photodynamic Activity of Hexyl-Aminolevulinatate Ethosomes Against *Candida Albicans* Biofilm. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2052. [[CrossRef](#)]

291. Caruso, E.; Orlandi, V.T.; Malacarne, M.C.; Martegani, E.; Scanferla, C.; Pappalardo, D.; Vigliotta, G.; Izzo, L. Bodipy-Loaded Micelles Based on Polylactide as Surface Coating for Photodynamic Control of *Staphylococcus Aureus*. *Coatings* **2021**, *11*, 223. [[CrossRef](#)]
292. Castro, K.A.D.F.; Costa, L.D.; Prandini, J.A.; Biazzotto, J.C.; Tomé, A.C.; Hamblin, M.R.; da Graça, P.M.S. Neves, M.; Faustino, M.A.F.; da Silva, R.S. The Photosensitizing Efficacy of Micelles Containing a Porphyrinic Photosensitizer and KI against Resistant Melanoma Cells. *Chem.—A Eur. J.* **2021**, *27*, 1990–1994. [[CrossRef](#)]
293. Dantas Lopes dos Santos, D.; Besegato, J.F.; de Melo, P.B.G.; Oshiro Junior, J.A.; Chorilli, M.; Deng, D.; Bagnato, V.S.; Rastelli, A.N.d.S. Curcumin-Loaded Pluronic®F-127 Micelles as a Drug Delivery System for Curcumin-Mediated Photodynamic Therapy for Oral Application. *Photochem. Photobiol.* **2021**, *97*, 1072–1088. [[CrossRef](#)]
294. Schoenmaker, L.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J.A.; Verbeke, R.; Kersten, G.; Jiskoot, W.; Crommelin, D.J.A. mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *Int. J. Pharm.* **2021**, *601*, 120586. [[CrossRef](#)]
295. Do Bonfim, C.M.; Monteleoni, L.F.; Calmon, M.d.F.; Cândido, N.M.; Provazzi, P.J.S.; de Souza Lino, V.; Rabachini, T.; Sichero, L.; Villa, L.L.; Quintana, S.M.; et al. Antiviral Activity of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Vulvar Cell Lines Transducing Different Variants of HPV-16. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2020**, *48*, 515–524. [[CrossRef](#)]
296. Osorno, L.L.; Brandley, A.N.; Maldonado, D.E.; Yiantos, A.; Mosley, R.J.; Byrne, M.E. Review of Contemporary Self-Assembled Systems for the Controlled Delivery of Therapeutics in Medicine. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
297. Zhu, S.; Wang, X.; Yang, Y.; Bai, H.; Cui, Q.; Sun, H.; Li, L.; Wang, S. Conjugated Polymer with Aggregation-Directed Intramolecular Förster Resonance Energy Transfer Enabling Efficient Discrimination and Killing of Microbial Pathogens. *Chem. Mater.* **2018**, *30*, 3244–3253. [[CrossRef](#)]
298. Meng, Z.; Hou, W.; Zhou, H.; Zhou, L.; Chen, H.; Wu, C. Therapeutic Considerations and Conjugated Polymer-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39*, 1700614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
299. Wang, S.; Wu, W.; Manghnani, P.; Xu, S.; Wang, Y.; Goh, C.C.; Ng, L.G.; Liu, B. Polymerization-Enhanced Two-Photon Photosensitization for Precise Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **2019**, *13*, 3095–3105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
300. Wu, W.; Mao, D.; Xu, S.; Kenry; Hu, F.; Li, X.; Kong, D.; Liu, B. Polymerization-Enhanced Photosensitization. *Chem* **2018**, *4*, 1937–1951. [[CrossRef](#)]
301. Xu, Q.; He, P.; Wang, J.; Chen, H.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S.; Yoon, J. Antimicrobial Activity of a Conjugated Polymer with Cationic Backbone. *Dye. Pigment.* **2019**, *160*, 519–523. [[CrossRef](#)]
302. Zhang, G.; Zhang, D. New Photosensitizer Design Concept: Polymerization-Enhanced Photosensitization. *Chem* **2018**, *4*, 2013–2015. [[CrossRef](#)]
303. Zhou, T.; Hu, R.; Wang, L.; Qiu, Y.; Zhang, G.; Deng, Q.; Zhang, H.; Yin, P.; Situ, B.; Zhan, C.; et al. An AIE-Active Conjugated Polymer with High ROS-Generation Ability and Biocompatibility for Efficient Photodynamic Therapy of Bacterial Infections. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 9952–9956. [[CrossRef](#)]
304. Huang, L.; Zhiyentayev, T.; Xuan, Y.; Azhibek, D.; Kharkwal, G.B.; Hamblin, M.R. Photodynamic Inactivation of Bacteria Using Polyethylenimine–Chlorin(E6) Conjugates: Effect of Polymer Molecular Weight, Substitution Ratio of Chlorin(E6) and PH. *Lasers Surg. Med.* **2011**, *43*, 313–323. [[CrossRef](#)]
305. Gavara, R.; de Llanos, R.; Pérez-Laguna, V.; Arnau del Valle, C.; Miravet, J.F.; Rezusta, A.; Galindo, F. Broad-Spectrum Photo-Antimicrobial Polymers Based on Cationic Polystyrene and Rose Bengal. *Front. Med.* **2021**, *8*, 641646. [[CrossRef](#)]
306. Yang, Y.; Cai, Z.; Huang, Z.; Tang, X.; Zhang, X. Antimicrobial Cationic Polymers: From Structural Design to Functional Control. *Polym. J.* **2018**, *50*, 33–44. [[CrossRef](#)]
307. Ahmetali, E.; Sen, P.; Süer, N.C.; Aksu, B.; Nyokong, T.; Eren, T.; Şener, M.K. Enhanced Light-Driven Antimicrobial Activity of Cationic Poly(Oxanorbornene)s by Phthalocyanine Incorporation into Polymer as Pendants. *Macromol. Chem. Phys.* **2020**, *221*, 2000386. [[CrossRef](#)]
308. Li, T.; Yan, L. Functional Polymer Nanocarriers for Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2018**, *11*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
309. Sun, C.-Y.; Shen, S.; Xu, C.-F.; Li, H.-J.; Liu, Y.; Cao, Z.-T.; Yang, X.-Z.; Xia, J.-X.; Wang, J. Tumor Acidity-Sensitive Polymeric Vector for Active Targeted siRNA Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15217–15224. [[CrossRef](#)]
310. Zhou, J.; Li, T.; Zhang, C.; Xiao, J.; Cui, D.; Cheng, Y. Charge-Switchable Nanocapsules with Multistage PH-Responsive Behaviours for Enhanced Tumour-Targeted Chemo/Photodynamic Therapy Guided by NIR/MR Imaging. *Nanoscale* **2018**, *10*, 9707–9719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
311. Calixto, G.M.F.; Bernegossi, J.; De Freitas, L.M.; Fontana, C.R.; Chorilli, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. *Molecules* **2016**, *21*, 342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
312. Choudhary, S.; Gupta, L.; Rani, S.; Dave, K.; Gupta, U. Impact of Dendrimers on Solubility of Hydrophobic Drug Molecules. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 261. [[CrossRef](#)]
313. Svenson, S. Dendrimers as Versatile Platform in Drug Delivery Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 445–462. [[CrossRef](#)]
314. Tomalia, D.A.; Khanna, S.N. A Systematic Framework and Nanoperiodic Concept for Unifying Nanoscience: Hard/Soft Nanoelements, Superatoms, Meta-Atoms, New Emerging Properties, Periodic Property Patterns, and Predictive Mendeleev-like Nanoperiodic Tables. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2705–2774. [[CrossRef](#)]
315. Caminade, A.-M.; Turrin, C.-O.; Majoral, J.-P. Biological Properties of Water-Soluble Phosphorhydrazone Dendrimers. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 33–44. [[CrossRef](#)]

316. Staegemann, M.H.; Gräfe, S.; Gitter, B.; Achazi, K.; Quaas, E.; Haag, R.; Wiehe, A. Hyperbranched Polyglycerol Loaded with (Zinc-)Porphyrins: Photosensitizer Release Under Reductive and Acidic Conditions for Improved Photodynamic Therapy. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 222–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
317. Staegemann, M.H.; Gitter, B.; Dervedde, J.; Kuehne, C.; Haag, R.; Wiehe, A. Mannose-Functionalized Hyperbranched Polyglycerol Loaded with Zinc Porphyrin: Investigation of the Multivalency Effect in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Chem.—A Eur. J.* **2017**, *23*, 3918–3930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
318. Zielińska, A.; Carreiró, F.; Oliveira, A.M.; Neves, A.; Pires, B.; Venkatesh, D.N.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Silva, A.M.; et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* **2020**, *25*, 3731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
319. Kubát, P.; Henke, P.; Raya, R.K.; Štěpánek, M.; Mosinger, J. Polystyrene and Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanoparticles with Porphyrins: Structure, Size, and Photooxidation Properties. *Langmuir* **2020**, *36*, 302–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
320. Gualdesi, M.S.; Vara, J.; Aiassa, V.; Alvarez Igarzabal, C.I.; Ortiz, C.S. New Poly(Acrylamide) Nanoparticles in the Development of Third Generation Photosensitizers. *Dye. Pigment.* **2021**, *184*, 108856. [[CrossRef](#)]
321. Malá, Z.; Žárská, L.; Malina, L.; Langová, K.; Večeřová, R.; Kolář, M.; Henke, P.; Mosinger, J.; Kolářová, H. Photodynamic Effect of TPP Encapsulated in Polystyrene Nanoparticles toward Multi-Resistant Pathogenic Bacterial Strains: AFM Evaluation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6786. [[CrossRef](#)]
322. Ahmadi, H.; Haddadi-Asl, V.; Ghafari, H.-A.; Ghorbanzadeh, R.; Mazlum, Y.; Bahador, A. Shear Bond Strength, Adhesive Remnant Index, and Anti-Biofilm Effects of a Photoexcited Modified Orthodontic Adhesive Containing Curcumin Doped Poly Lactic-Co-Glycolic Acid Nanoparticles: An Ex-Vivo Biofilm Model of *S. Mutans* on the Enamel Slab Bonded Brackets. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *30*, 101674. [[CrossRef](#)]
323. Liang, Y.; Zhang, H.; Yuan, H.; Lu, W.; Li, Z.; Wang, L.; Gao, L.-H. Conjugated Polymer and Triphenylamine Derivative Codoped Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Antimicrobial Therapy. *ACS Appl. Bio. Mater.* **2020**, *3*, 3494–3499. [[CrossRef](#)]
324. Zhang, H.; Liang, Y.; Zhao, H.; Qi, R.; Chen, Z.; Yuan, H.; Liang, H.; Wang, L. Dual-Mode Antibacterial Conjugated Polymer Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy. *Macromol. Biosci.* **2020**, *20*, e1900301. [[CrossRef](#)]
325. Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review. *J. Adv. Res.* **2015**, *6*, 105–121. [[CrossRef](#)]
326. Kirar, S.; Thakur, N.S.; Laha, J.K.; Banerjee, U.C. Porphyrin Functionalized Gelatin Nanoparticle-Based Biodegradable Phototherapeutics: Potential Tools for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 4202–4212. [[CrossRef](#)]
327. Barbosa, P.M.; Campanholi, K.d.S.S.; Vilsinski, B.H.; Ferreira, S.B.d.S.; Gonçalves, R.S.; de Castro-Hoshino, L.V.; de Oliveira, A.C.V.; Sato, F.; Baesso, M.L.; Bruschi, M.L.; et al. Aluminum Phthalocyanine Hydroxide-Loaded Thermoresponsive Biomedical Hydrogel: A Design for Targeted Photosensitizing Drug Delivery. *J. Mol. Liq.* **2021**, *341*, 117421. [[CrossRef](#)]
328. Zheng, Y.; Yu, E.; Weng, Q.; Zhou, L.; Li, Q. Optimization of Hydrogel Containing Toluidine Blue O for Photodynamic Therapy in Treating Acne. *Lasers Med. Sci.* **2019**, *34*, 1535–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
329. Feng, Y.; Xiao, K.; He, Y.; Du, B.; Hong, J.; Yin, H.; Lu, D.; Luo, F.; Li, Z.; Li, J.; et al. Tough and Biodegradable Polyurethane-Curcumin Compositized Hydrogel with Antioxidant, Antibacterial and Antitumor Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *121*, 111820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
330. de Souza, C.M.; Garcia, M.T.; de Barros, P.P.; Pedroso, L.L.C.; Ward, R.A.d.C.; Strixino, J.F.; Melo, V.M.M.; Junqueira, J.C. Chitosan Enhances the Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Photoditazine® against *Streptococcus Mutans*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *32*, 102001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
331. Yilmaz Atay, H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. In *Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications*; Jana, S., Jana, S., Eds.; Springer: Singapore, 2019; pp. 457–489. ISBN 9789811502637.
332. Pourhajbagher, M.; Rokn, A.R.; Rostami-Rad, M.; Barikani, H.R.; Bahador, A. Monitoring of Virulence Factors and Metabolic Activity in *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Cells Surviving Antimicrobial Photodynamic Therapy via Nano-Chitosan Encapsulated Indocyanine Green. *Front. Phys.* **2018**, *6*, 124. [[CrossRef](#)]
333. Rad, M.R.; Pourhajbagher, M.; Rokn, A.R.; Barikani, H.R.; Bahador, A. Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green Doped with Chitosan Nanoparticles on Biofilm Formation-Related Gene Expression of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. *Front. Dent.* **2019**, *16*, 187–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
334. Shrestha, A.; Kishen, A. Polycationic Chitosan-Conjugated Photosensitizer for Antibacterial Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 577–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
335. Zhang, R.; Li, Y.; Zhou, M.; Wang, C.; Feng, P.; Miao, W.; Huang, H. Photodynamic Chitosan Nano-Assembly as a Potent Alternative Candidate for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 26711–26721. [[CrossRef](#)]
336. Rizzi, V.; Fini, P.; Fanelli, F.; Placido, T.; Semeraro, P.; Sibillano, T.; Fraix, A.; Sortino, S.; Agostiano, A.; Giannini, C.; et al. Molecular Interactions, Characterization and Photoactivity of Chlorophyll a/Chitosan/2-HP- $\beta$ -Cyclodextrin Composite Films as Functional and Active Surfaces for ROS Production. *Food Hydrocoll.* **2016**, *58*, 98–112. [[CrossRef](#)]
337. Sharma, M.; Dube, A.; Majumder, S.K. Antibacterial Photodynamic Activity of Photosensitizer-Embedded Alginate-Pectin-Carboxymethyl Cellulose Composite Biopolymer Films. *Lasers Med. Sci.* **2021**, *36*, 763–772. [[CrossRef](#)]
338. Hasanin, M.S.; Abdelraof, M.; Fikry, M.; Shaker, Y.M.; Sweed, A.M.K.; Senge, M.O. Development of Antimicrobial Laser-Induced Photodynamic Therapy Based on Ethylcellulose/Chitosan Nanocomposite with 5,10,15,20-Tetrakis(m-Hydroxyphenyl)Porphyrin. *Molecules* **2021**, *26*, 3551. [[CrossRef](#)]

339. Mai, B.; Jia, M.; Liu, S.; Sheng, Z.; Li, M.; Gao, Y.; Wang, X.; Liu, Q.; Wang, P. Smart Hydrogel-Based DVDMS/BFGF Nanohybrids for Antibacterial Phototherapy with Multiple Damaging Sites and Accelerated Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 10156–10169. [[CrossRef](#)]
340. Müller, A.; Preuß, A.; Bornhütter, T.; Thomas, I.; Prager, A.; Schulze, A.; Röder, B. Electron Beam Functionalized Photodynamic Polyethersulfone Membranes—Photophysical Characterization and Antimicrobial Activity. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 1346–1354. [[CrossRef](#)]
341. Martínez, S.R.; Palacios, Y.B.; Heredia, D.A.; Aiassa, V.; Bartolilla, A.; Durantini, A.M. Self-Sterilizing 3D-Printed Polylactic Acid Surfaces Coated with a BODIPY Photosensitizer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 11597–11608. [[CrossRef](#)]
342. Santos, M.R.E.; Mendonça, P.V.; Branco, R.; Sousa, R.; Dias, C.; Serra, A.C.; Fernandes, J.R.; Magalhães, F.D.; Morais, P.V.; Coelho, J.F.J. Light-Activated Antimicrobial Surfaces Using Industrial Varnish Formulations to Mitigate the Incidence of Nosocomial Infections. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 7567–7579. [[CrossRef](#)]
343. Sautrot-Ba, P.; Contreras, A.; Andaloussi, S.A.; Coradin, T.; Héлары, C.; Razza, N.; Sangermano, M.; Mazeran, P.-E.; Malval, J.-P.; Versace, D.-L. Eosin-Mediated Synthesis of Polymer Coatings Combining Photodynamic Inactivation and Antimicrobial Properties. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 7572–7582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
344. Kováčová, M.; Kleinová, A.; Vajd'ák, J.; Humpolíček, P.; Kubát, P.; Bodík, M.; Marković, Z.; Špitálský, Z. Photodynamic-Active Smart Biocompatible Material for an Antibacterial Surface Coating. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *211*, 112012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
345. Wylie, M.P.; Irwin, N.J.; Howard, D.; Heydon, K.; McCoy, C.P. Hot-Melt Extrusion of Photodynamic Antimicrobial Polymers for Prevention of Microbial Contamination. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2021**, *214*, 112098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
346. Moor, K.J.; Osuji, C.O.; Kim, J.-H. Dual-Functionality Fullerene and Silver Nanoparticle Antimicrobial Composites *via* Block Copolymer Templates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 33583–33591. [[CrossRef](#)]
347. Mafukidze, D.M.; Sindelo, A.; Nyokong, T. Spectroscopic Characterization and Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy of Phthalocyanine-Silver Triangular Nanoprism Conjugates When Supported on Asymmetric Polymer Membranes. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *219*, 333–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
348. Sun, J.; Fan, Y.; Zhang, P.; Zhang, X.; Zhou, Q.; Zhao, J.; Ren, L. Self-Enriched Mesoporous Silica Nanoparticle Composite Membrane with Remarkable Photodynamic Antimicrobial Performances. *J. Colloid Interface Sci.* **2020**, *559*, 197–205. [[CrossRef](#)]
349. Heredia, D.A.; Martínez, S.R.; Durantini, A.M.; Pérez, M.E.; Mangione, M.I.; Durantini, J.E.; Gervaldo, M.A.; Otero, L.A.; Durantini, E.N. Antimicrobial Photodynamic Polymeric Films Bearing Biscarbazol Triphenylamine End-Capped Dendrimeric Zn(II) Porphyrin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 27574–27587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
350. Peddinti, B.S.T.; Scholle, F.; Ghiladi, R.A.; Spontak, R.J. Photodynamic Polymers as Comprehensive Anti-Infective Materials: Staying Ahead of a Growing Global Threat. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 25955–25959. [[CrossRef](#)]
351. Baigorria, E.; Milanesio, M.E.; Durantini, E.N. Synthesis, Spectroscopic Properties and Photodynamic Activity of Zn(II) Phthalocyanine-Polymer Conjugates as Antimicrobial Agents. *Eur. Polym. J.* **2020**, *134*, 109816. [[CrossRef](#)]
352. Ambrósio, J.A.R.; Pinto, B.C.D.S.; da Silva, B.G.M.; Passos, J.C.d.S.; Beltrame Junior, M.; Costa, M.S.; Simioni, A.R. BSA Nanoparticles Loaded-Methylene Blue for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT): Effect on Both Growth and Biofilm Formation by *Candida Albicans*. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2020**, *31*, 2182–2198. [[CrossRef](#)]
353. Silva, E.P.O.; Ribeiro, N.M.; Cardoso, M.A.G.; Pacheco-Soares, C.; Jr, M.B. Photodynamic Therapy Using Silicon Phthalocyanine Conjugated with Bovine Serum Albumin as a Drug Delivery System. *Laser Phys.* **2021**, *31*, 075601. [[CrossRef](#)]
354. Cheng, R.; Meng, F.; Deng, C.; Klok, H.-A.; Zhong, Z. Dual and Multi-Stimuli Responsive Polymeric Nanoparticles for Programmed Site-Specific Drug Delivery. *Biomaterials* **2013**, *34*, 3647–3657. [[CrossRef](#)]
355. Dolanský, J.; Henke, P.; Malá, Z.; Žárská, L.; Kubát, P.; Mosinger, J. Antibacterial Nitric Oxide- and Singlet Oxygen-Releasing Polystyrene Nanoparticles Responsive to Light and Temperature Triggers. *Nanoscale* **2018**, *10*, 2639–2648. [[CrossRef](#)]
356. Ren, B.; Li, K.; Liu, Z.; Liu, G.; Wang, H. White Light-Triggered Zwitterionic Polymer Nanoparticles Based on an AIE-Active Photosensitizer for Photodynamic Antimicrobial Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 10754–10763. [[CrossRef](#)]
357. Wang, H.; He, J.; Zhang, M.; Tao, Y.; Li, F.; Tam, K.C.; Ni, P. Biocompatible and Acid-Cleavable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)-Acetal-Poly(Ethylene Glycol)-Acetal-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Triblock Copolymers: Synthesis, Characterization and PH-Triggered Doxorubicin Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 6596–6607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
358. Zhou, Q.; Zhang, L.; Yang, T.; Wu, H. Stimuli-Responsive Polymeric Micelles for Drug Delivery and Cancer Therapy. *IJN* **2018**, *13*, 2921–2942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
359. Mai, Y.; Eisenberg, A. Self-Assembly of Block Copolymers. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5969–5985. [[CrossRef](#)]
360. Shen, H.; Eisenberg, A. Morphological Phase Diagram for a Ternary System of Block Copolymer PS310-b-PAA52/Dioxane/H<sub>2</sub>O. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 9473–9487. [[CrossRef](#)]
361. Zhang, L.; Eisenberg, A. Multiple Morphologies of “Crew-Cut” Aggregates of Polystyrene-b-Poly(Acrylic Acid) Block Copolymers. *Science* **1995**, *268*, 1728–1731. [[CrossRef](#)]
362. Lombardo, D.; Kiselev, M.A.; Caccamo, M.T. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *J. Nanomater.* **2019**, *2019*, e3702518. [[CrossRef](#)]
363. Won, Y.-Y.; Brannan, A.K.; Davis, H.T.; Bates, F.S. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) of Micelles and Vesicles Formed in Water by Poly(Ethylene Oxide)-Based Block Copolymers. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3354–3364. [[CrossRef](#)]

364. Haas, S.; Chen, Y.; Fuchs, C.; Handschuh, S.; Steuber, M.; Schönherr, H. Amphiphilic Block Copolymer Vesicles for Active Wound Dressings: Synthesis of Model Systems and Studies of Encapsulation and Release. *Macromol. Symp.* **2013**, *328*, 73–79. [[CrossRef](#)]
365. Haas, S.; Hain, N.; Raoufi, M.; Handschuh-Wang, S.; Wang, T.; Jiang, X.; Schönherr, H. Enzyme Degradable Polymersomes from Hyaluronic Acid-Block-Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Copolymers for the Detection of Enzymes of Pathogenic Bacteria. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 832–841. [[CrossRef](#)]
366. Handschuh-Wang, S.; Wesner, D.; Wang, T.; Lu, P.; Tücking, K.-S.; Haas, S.; Druzhinin, S.I.; Jiang, X.; Schönherr, H. Determination of the Wall Thickness of Block Copolymer Vesicles by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218*, 1600454. [[CrossRef](#)]
367. Tücking, K.-S.; Handschuh-Wang, S.; Schönherr, H.; Tücking, K.-S.; Handschuh-Wang, S.; Schönherr, H. Bacterial Enzyme Responsive Polymersomes: A Closer Look at the Degradation Mechanism of PEG-Block-PLA Vesicles. *Aust. J. Chem.* **2014**, *67*, 578–584. [[CrossRef](#)]
368. Tang, Q.; Hu, P.; Peng, H.; Zhang, N.; Zheng, Q.; He, Y. Near-Infrared Laser-Triggered, Self-Immolative Smart Polymersomes for in Vivo Cancer Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 137–149. [[CrossRef](#)]
369. Knop, K.; Mingotaud, A.-F.; El-Akra, N.; Violleau, F.; Souchart, J.-P. Monomeric Pheophorbide(a)-Containing Poly(Ethyleneglycol-b- $\epsilon$ -Caprolactone) Micelles for Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 396–404. [[CrossRef](#)]
370. Zhang, G.-D.; Harada, A.; Nishiyama, N.; Jiang, D.-L.; Koyama, H.; Aida, T.; Kataoka, K. Polyion Complex Micelles Entrapping Cationic Dendrimer Porphyrin: Effective Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Cancer. *J. Control. Release* **2003**, *93*, 141–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
371. Xiao-ying, Z.; Pei-ying, Z. Polymersomes in Nanomedicine—A Review. *Curr. Nanosci.* **2017**, *13*, 124–129.
372. Lanzilotto, A.; Kyropoulou, M.; Constable, E.C.; Housecroft, C.E.; Meier, W.P.; Palivan, C.G. Porphyrin-Polymer Nanocompartments: Singlet Oxygen Generation and Antimicrobial Activity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 109–122. [[CrossRef](#)]
373. Li, Z.; Fan, F.; Ma, J.; Yin, W.; Zhu, D.; Zhang, L.; Wang, Z. Oxygen- and Bubble-Generating Polymersomes for Tumor-Targeted and Enhanced Photothermal–Photodynamic Combination Therapy. *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 5841–5853. [[CrossRef](#)]
374. Avci, P.; Erdem, S.S.; Hamblin, M.R. Photodynamic Therapy: One Step Ahead with Self-Assembled Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1937–1952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
375. Gibot, L.; Demazeau, M.; Pimienta, V.; Mingotaud, A.-F.; Vicendo, P.; Collin, F.; Martins-Froment, N.; Dejean, S.; Nottelet, B.; Roux, C.; et al. Role of Polymer Micelles in the Delivery of Photodynamic Therapy Agent to Liposomes and Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
376. Karges, J.; Tharaud, M.; Gasser, G. Polymeric Encapsulation of a Ru(II)-Based Photosensitizer for Folate-Targeted Photodynamic Therapy of Drug Resistant Cancers. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 4612–4622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
377. Kashef, N.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M.R. Advances in Antimicrobial Photodynamic Inactivation at the Nanoscale. *Nanophotonics* **2017**, *6*, 853–879. [[CrossRef](#)]
378. Vilsinski, B.H.; Gerola, A.P.; Enumo, J.A.; Campanholi, K.d.S.S.; Pereira, P.C.d.S.; Braga, G.; Hioka, N.; Kimura, E.; Tessaro, A.L.; Caetano, W. Formulation of Aluminum Chloride Phthalocyanine in Pluronic<sup>(TM)</sup> P-123 and F-127 Block Copolymer Micelles: Photophysical Properties and Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 518–525. [[CrossRef](#)]
379. Tsai, T.; Yang, Y.-T.; Wang, T.-H.; Chien, H.-F.; Chen, C.-T. Improved Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Bacteria Using Hematoporphyrin Encapsulated in Liposomes and Micelles. *Lasers Surg. Med.* **2009**, *41*, 316–322. [[CrossRef](#)]
380. Teng, F.; Deng, P.; Song, Z.; Zhou, F.; Feng, R. Enhanced Effect in Combination of Curcumin- and Ketoconazole-Loaded Methoxy Poly (Ethylene Glycol)-Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Micelles. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *88*, 43–51. [[CrossRef](#)]
381. Yi, X.; Hu, J.-J.; Dai, J.; Lou, X.; Zhao, Z.; Xia, F.; Tang, B.Z. Self-Guiding Polymeric Prodrug Micelles with Two Aggregation-Induced Emission Photosensitizers for Enhanced Chemo-Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **2021**, *15*, 3026–3037. [[CrossRef](#)]
382. Demir, B.; Barlas, F.B.; Gumus, Z.P.; Unak, P.; Timur, S. Theranostic Niosomes as a Promising Tool for Combined Therapy and Diagnosis: “All-in-One” Approach. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 2827–2835. [[CrossRef](#)]
383. Fadel, M.A.; Tawfik, A.A. New Topical Photodynamic Therapy for Treatment of Hidradenitis Suppurativa Using Methylene Blue Niosomal Gel: A Single-Blind, Randomized, Comparative Study. *Clin. Exp. Dermatol.* **2015**, *40*, 116–122. [[CrossRef](#)]
384. Belali, S.; Karimi, A.R.; Hadizadeh, M. Novel Nanostructured Smart, Photodynamic Hydrogels Based on Poly(N-Isopropylacrylamide) Bearing Porphyrin Units in Their Crosslink Chains: A Potential Sensitizer System in Cancer Therapy. *Polymer* **2017**, *109*, 93–105. [[CrossRef](#)]
385. Preis, E.; Anders, T.; Širc, J.; Hobzova, R.; Cocarta, A.-I.; Bakowsky, U.; Jedelská, J. Biocompatible Indocyanine Green Loaded PLA Nanofibers for *In Situ* Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *115*, 111068. [[CrossRef](#)]
386. Stoll, K.R.; Scholle, F.; Zhu, J.; Zhang, X.; Ghiladi, R.A. BODIPY-Embedded Electrospun Materials in Antimicrobial Photodynamic Inactivation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1923–1932. [[CrossRef](#)]
387. Chen, W.; Chen, J.; Li, L.; Wang, X.; Wei, Q.; Ghiladi, R.A.; Wang, Q. Wool/Acrylic Blended Fabrics as Next-Generation Photodynamic Antimicrobial Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 29557–29568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
388. Contreras, A.; Raxworthy, M.J.; Wood, S.; Schiffman, J.D.; Tronci, G. Photodynamically Active Electrospun Fibers for Antibiotic-Free Infection Control. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 4258–4270. [[CrossRef](#)]
389. Czapka, T.; Winkler, A.; Maliszewska, I.; Kacprzyk, R. Fabrication of Photoactive Electrospun Cellulose Acetate Nanofibers for Antibacterial Applications. *Energies* **2021**, *14*, 2598. [[CrossRef](#)]

390. Managa, M.; Amuhaya, E.K.; Nyokong, T. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy Activity of (5,10,15,20-Tetrakis(4-(4-Carboxyphenylcarboximidoyl)Phenyl)Porphyrinato) Chloro Gallium(III). *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *151*, 867–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
391. Sindelo, A.; Nyokong, T. Magnetic Nanoparticle—Indium Phthalocyanine Conjugate Embedded in Electrospun Fiber for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy and Photodegradation of Methyl Red. *Heliyon* **2019**, *5*, e02352. [[CrossRef](#)]
392. Barra, F.; Roscetto, E.; Soriano, A.A.; Vollaro, A.; Postiglione, I.; Pierantoni, G.M.; Palumbo, G.; Catania, M.R. Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination to Fight Biofilms and Resistant Surface Bacterial Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 20417–20430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
393. Tavares, L.J.; de Avila, E.D.; Klein, M.I.; Panariello, B.H.D.; Spolidório, D.M.P.; Pavarina, A.C. Antimicrobial Photodynamic Therapy Alone or in Combination with Antibiotic Local Administration against Biofilms of *Fusobacterium Nucleatum* and *Porphyromonas Gingivalis*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2018**, *188*, 135–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
394. Li, Z.; Pan, W.; Shi, E.; Bai, L.; Liu, H.; Li, C.; Wang, Y.; Deng, J.; Wang, Y. A Multifunctional Nanosystem Based on Bacterial Cell-Penetrating Photosensitizer for Fighting Periodontitis *via* Combining Photodynamic and Antibiotic Therapies. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7*, 772–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
395. Pérez-Laguna, V.; García-Luque, I.; Ballesta, S.; Pérez-Artiaga, L.; Lampaya-Pérez, V.; Rezusta, A.; Gilaberte, Y. Photodynamic Therapy Using Methylene Blue, Combined or Not with Gentamicin, against *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *31*, 101810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
396. Feng, Y.; Palanisami, A.; Ashraf, S.; Bhayana, B.; Hasan, T. Photodynamic Inactivation of Bacterial Carbapenemases Restores Bacterial Carbapenem Susceptibility and Enhances Carbapenem Antibiotic Effectiveness. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *30*, 101693. [[CrossRef](#)]
397. Núñez, C.; Palavecino, A.; González, I.A.; Dreyse, P.; Palavecino, C.E. Effective Photodynamic Therapy with Ir(III) for Virulent Clinical Isolates of Extended-Spectrum Beta-Lactamase *Klebsiella Pneumoniae*. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
398. de Freitas, L.M.; Lorenzón, E.N.; Cilli, E.M.; de Oliveira, K.T.; Fontana, C.R.; Mang, T.S. Photodynamic and Peptide-Based Strategy to Inhibit Gram-Positive Bacterial Biofilm Formation. *Biofouling* **2019**, *35*, 742–757. [[CrossRef](#)]
399. Cantelli, A.; Piro, F.; Pecchini, P.; Di Giosia, M.; Danielli, A.; Calvaresi, M. Concanavalin A-Rose Bengal Bioconjugate for Targeted Gram-Negative Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *206*, 111852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
400. Leanse, L.G.; Dong, P.-T.; Goh, X.S.; Lu, M.; Cheng, J.-X.; Hooper, D.C.; Dai, T. Quinine Enhances Photo-Inactivation of Gram-Negative Bacteria. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221*, 618–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
401. Hu, Y.; Huang, X.; Lu, S.; Hamblin, M.R.; Mylonakis, E.; Zhang, J.; Xi, L. Photodynamic Therapy Combined with Terbinafine Against Chromoblastomycosis and the Effect of PDT on *Fonsecaea Monophora* In Vitro. *Mycopathologia* **2015**, *179*, 103–109. [[CrossRef](#)]
402. Lan, Y.; Lu, S.; Zheng, B.; Tang, Z.; Li, J.; Zhang, J. Combinatory Effect of ALA-PDT and Itraconazole Treatment for *Trichosporon Asahii*. *Lasers Surg. Med.* **2020**, *53*, 722–730. [[CrossRef](#)]
403. Ayaz, F.; Gonul, İ.; Demirbag, B.; Ocakoglu, K. Differential Immunomodulatory Activities of Schiff Base Complexes Depending on Their Metal Conjugation. *Inflammation* **2019**, *42*, 1878–1885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
404. Sadraei, M.; Bahou, C.; da Cruz, E.F.; Janini, L.M.R.; Sobhie Diaz, R.; Boyle, R.W.; Chudasama, V.; Eduardo Gontijo Guimarães, F. Photoimmunotherapy Using Cationic and Anionic Photosensitizer-Antibody Conjugates against HIV Env-Expressing Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
405. Alves, F.; Pavarina, A.C.; Mima, E.G.d.O.; McHale, A.P.; Callan, J.F. Antimicrobial Sonodynamic and Photodynamic Therapies against *Candida Albicans*. *Biofouling* **2018**, *34*, 357–367. [[CrossRef](#)]
406. Xu, F.; Hu, M.; Liu, C.; Choi, S.K. Yolk-Structured Multifunctional Up-Conversion Nanoparticles for Synergistic Photodynamic–Sonodynamic Antibacterial Resistance Therapy. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 678–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
407. de Melo, W.d.C.M.A.; Lee, A.N.; Perussi, J.R.; Hamblin, M.R. Electroporation Enhances Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by the Hydrophobic Photosensitizer, Hypericin. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 647–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
408. He, X.; Yang, Y.; Guo, Y.; Lu, S.; Du, Y.; Li, J.-J.; Zhang, X.; Leung, N.L.C.; Zhao, Z.; Niu, G.; et al. Phage-Guided Targeting, Discriminative Imaging, and Synergistic Killing of Bacteria by AIE Bioconjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 3959–3969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
409. Dong, S.; Shi, H.; Zhang, X.; Chen, X.; Cao, D.; Mao, C.; Gao, X.; Wang, L. Difunctional Bacteriophage Conjugated with Photosensitizers for *Candida Albicans*-Targeting Photodynamic Inactivation. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 2199–2216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
410. Suci, P.A.; Varpness, Z.; Gillitzer, E.; Douglas, T.; Young, M. Targeting and Photodynamic Killing of a Microbial Pathogen Using Protein Cage Architectures Functionalized with a Photosensitizer. *Langmuir* **2007**, *23*, 12280–12286. [[CrossRef](#)]
411. Tosato, M.G.; Schilardi, P.; Lorenzo de Mele, M.F.; Thomas, A.H.; Lorente, C.; Miñán, A. Synergistic Effect of Carboxypterin and Methylene Blue Applied to Antimicrobial Photodynamic Therapy against Mature Biofilm of *Klebsiella Pneumoniae*. *Heliyon* **2020**, *6*, e03522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
412. Openda, Y.I.; Sen, P.; Managa, M.; Nyokong, T. Acetophenone Substituted Phthalocyanines and Their Graphene Quantum Dots Conjugates as Photosensitizers for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy against *Staphylococcus Aureus*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *29*, 101607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

413. Sharma, R.; Viana, S.M.; Ng, D.K.P.; Kolli, B.K.; Chang, K.P.; de Oliveira, C.I. Photodynamic Inactivation of *Leishmania Braziliensis* Doubly Sensitized with Uroporphyrin and Diamino-Phthalocyanine Activates Effector Functions of Macrophages In Vitro. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
414. Huang, X.; Chen, G.; Pan, J.; Chen, X.; Huang, N.; Wang, X.; Liu, J. Effective PDT/PTT Dual-Modal Phototherapeutic Killing of Pathogenic Bacteria by Using Ruthenium Nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 6258–6270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
415. Romero, M.P.; Marangoni, V.S.; de Faria, C.G.; Leite, I.S.; Silva, C.; de Carvalho Castro e Silva, C.; Maroneze, C.M.; Pereira-da-Silva, M.A.; Bagnato, V.S.; Inada, N.M. Graphene Oxide Mediated Broad-Spectrum Antibacterial Based on Bimodal Action of Photodynamic and Photothermal Effects. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2995. [[CrossRef](#)]
416. Yuan, Z.; Tao, B.; He, Y.; Mu, C.; Liu, G.; Zhang, J.; Liao, Q.; Liu, P.; Cai, K. Remote Eradication of Biofilm on Titanium Implant via Near-Infrared Light Triggered Photothermal/Photodynamic Therapy Strategy. *Biomaterials* **2019**, *223*, 119479. [[CrossRef](#)]
417. Dolanský, J.; Henke, P.; Kubát, P.; Fraix, A.; Sortino, S.; Mosinger, J. Polystyrene Nanofiber Materials for Visible-Light-Driven Dual Antibacterial Action via Simultaneous Photogeneration of NO and O<sub>2</sub>(1)Δg. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 22980–22989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
418. Zhao, Z.; Li, H.; Tao, X.; Xie, Y.; Yang, L.; Mao, Z.; Xia, W. Light-Triggered Nitric Oxide Release by a Photosensitizer to Combat Bacterial Biofilm Infections. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 5453–5460. [[CrossRef](#)]
419. Miñán, A.; Lorente, C.; Ipiña, A.; Thomas, A.H.; Fernández Lorenzo de Mele, M.; Schilardi, P.L. Photodynamic Inactivation Induced by Carboxypterin: A Novel Non-Toxic Bactericidal Strategy against Planktonic Cells and Biofilms of *Staphylococcus Aureus*. *Biofouling* **2015**, *31*, 459–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
420. Hamblin, M.R. Potentiation of Antimicrobial Photodynamic Inactivation by Inorganic Salts. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2017**, *15*, 1059–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
421. Huang, L.; St. Denis, T.G.; Xuan, Y.; Huang, Y.-Y.; Tanaka, M.; Zadlo, A.; Sarna, T.; Hamblin, M.R. Paradoxical Potentiation of Methylene Blue-Mediated Antimicrobial Photodynamic Inactivation by Sodium Azide: Role of Ambient Oxygen and Azide Radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 2062–2071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
422. Kasimova, K.R.; Sadasivam, M.; Landi, G.; Sarna, T.; Hamblin, M.R. Potentiation of Photoinactivation of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Mediated by Six Phenothiazinium Dyes by Addition of Azide Ion. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1541–1548. [[CrossRef](#)]
423. Vecchio, D.; Gupta, A.; Huang, L.; Landi, G.; Avci, P.; Rodas, A.; Hamblin, M.R. Bacterial Photodynamic Inactivation Mediated by Methylene Blue and Red Light Is Enhanced by Synergistic Effect of Potassium Iodide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 5203–5212. [[CrossRef](#)]
424. Vieira, C.; Gomes, A.T.P.C.; Mesquita, M.Q.; Moura, N.M.M.; Neves, M.G.P.M.S.; Faustino, M.A.F.; Almeida, A. An Insight Into the Potentiation Effect of Potassium Iodide on APDT Efficacy. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2665. [[CrossRef](#)]
425. Reynoso, E.; Quiroga, E.D.; Agazzi, M.L.; Ballatore, M.B.; Bertolotti, S.G.; Durantini, E.N. Photodynamic Inactivation of Microorganisms Sensitized by Cationic BODIPY Derivatives Potentiated by Potassium Iodide. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16*, 1524–1536. [[CrossRef](#)]
426. Pérez, M.E.; Durantini, J.E.; Reynoso, E.; Alvarez, M.G.; Milanesio, M.E.; Durantini, E.N. Porphyrin–Schiff Base Conjugates Bearing Basic Amino Groups as Antimicrobial Phototherapeutic Agents. *Molecules* **2021**, *26*, 5877. [[CrossRef](#)]
427. Hamblin, M.R.; Abrahamse, H. Inorganic Salts and Antimicrobial Photodynamic Therapy: Mechanistic Conundrums? *Molecules* **2018**, *23*, 3190. [[CrossRef](#)]
428. Gsponer, N.S.; Spesia, M.B.; Durantini, E.N. Effects of Divalent Cations, EDTA and Chitosan on the Uptake and Photoinactivation of *Escherichia Coli* Mediated by Cationic and Anionic Porphyrins. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 67–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
429. Pérez-Laguna, V.; Gilaberte, Y.; Millán-Lou, M.I.; Agut, M.; Nonell, S.; Rezusta, A.; Hamblin, M.R. A Combination of Photodynamic Therapy and Antimicrobial Compounds to Treat Skin and Mucosal Infections: A Systematic Review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1020–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
430. Cahan, R.; Swissa, N.; Gellerman, G.; Nitzan, Y. Photosensitizer–Antibiotic Conjugates: A Novel Class of Antibacterial Molecules. *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 418–425. [[CrossRef](#)]
431. Lu, Z.; Dai, T.; Huang, L.; Kurup, D.B.; Tegos, G.P.; Jahnke, A.; Wharton, T.; Hamblin, M.R. Photodynamic Therapy with a Cationic Functionalized Fullerene Rescues Mice from Fatal Wound Infections. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1525–1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
432. Collins, T.L.; Markus, E.A.; Hassett, D.J.; Robinson, J.B. The Effect of a Cationic Porphyrin on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. *Curr. Microbiol.* **2010**, *61*, 411–416. [[CrossRef](#)]
433. Almeida, J.; Tomé, J.P.C.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, A.C.; Cavaleiro, J.A.S.; Cunha, Â.; Costa, L.; Faustino, M.A.F.; Almeida, A. Photodynamic Inactivation of Multidrug-Resistant Bacteria in Hospital Wastewaters: Influence of Residual Antibiotics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
434. Di Poto, A.; Sbarra, M.S.; Provenza, G.; Visai, L.; Speziale, P. The Effect of Photodynamic Treatment Combined with Antibiotic Action or Host Defence Mechanisms on *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3158–3166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
435. Tanaka, M.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, L.; Morimoto, Y.; Kinoshita, M.; Yoshihara, Y.; Shinomiya, N.; Seki, S.; Nemoto, K.; et al. Linezolid and Vancomycin Decrease the Therapeutic Effect of Methylene Blue-Photodynamic Therapy in a Mouse Model of MRSA Bacterial Arthritis. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 679–682. [[CrossRef](#)]
436. Jiang, Q.; Fangjie, E.; Tian, J.; Yang, J.; Zhang, J.; Cheng, Y. Light-Excited Antibiotics for Potentiating Bacterial Killing via Reactive Oxygen Species Generation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 16150–16158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

437. Morschhäuser, J. The Development of Fluconazole Resistance in *Candida Albicans*—An Example of Microevolution of a Fungal Pathogen. *J. Microbiol.* **2016**, *54*, 192–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
438. Quiroga, E.D.; Mora, S.J.; Alvarez, M.G.; Durantini, E.N. Photodynamic Inactivation of *Candida Albicans* by a Tetracationic Tentacle Porphyrin and Its Analogue without Intrinsic Charges in Presence of Fluconazole. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2016**, *13*, 334–340. [[CrossRef](#)]
439. Hu, Y.; Qi, X.; Sun, H.; Lu, Y.; Hu, Y.; Chen, X.; Liu, K.; Yang, Y.; Mao, Z.; Wu, Z.; et al. Photodynamic Therapy Combined with Antifungal Drugs against Chromoblastomycosis and the Effect of ALA-PDT on *Fonsecaea* In Vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
440. Chen, H.; Li, S.; Wu, M.; Kenry; Huang, Z.; Lee, C.; Liu, B. Membrane-Anchoring Photosensitizer with Aggregation-Induced Emission Characteristics for Combating Multidrug-Resistant Bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 632–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
441. Le Gall, T.; Berchel, M.; Le Hir, S.; Fraix, A.; Salaün, J.Y.; Férec, C.; Lehn, P.; Jaffrès, P.-A.; Montier, T. Arsonium-Containing Lipophosphoramides, Poly-Functional Nano-Carriers for Simultaneous Antibacterial Action and Eukaryotic Cell Transfection. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 1513–1524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
442. Lin, S.; Liu, C.; Han, X.; Zhong, H.; Cheng, C. Viral Nanoparticle System: An Effective Platform for Photodynamic Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1728. [[CrossRef](#)]
443. Hosseini, N.; Pourhajbagher, M.; Chiniforush, N.; Hosseinkhan, N.; Rezaie, P.; Bahador, A. Modulation of Toxin-Antitoxin System Rnl AB Type II in Phage-Resistant *Gammaproteobacteria* Surviving Photodynamic Treatment. *J. Lasers Med. Sci.* **2018**, *10*, 21–28. [[CrossRef](#)]
444. Luong, T.; Salabarria, A.-C.; Roach, D.R. Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going? *Clin. Ther.* **2020**, *42*, 1659–1680. [[CrossRef](#)]
445. Liu, Z.; Li, J.; Chen, W.; Liu, L.; Yu, F. Light and Sound to Trigger the Pandora's Box against Breast Cancer: A Combination Strategy of Sonodynamic, Photodynamic and Photothermal Therapies. *Biomaterials* **2020**, *232*, 119685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
446. Mai, B.; Wang, X.; Liu, Q.; Zhang, K.; Wang, P. The Application of DVDMS as a Sensitizing Agent for Sono-/Photo-Therapy. *Front. Pharm.* **2020**, *11*, 19. [[CrossRef](#)]
447. Fraix, A.; Sortino, S. Combination of PDT Photosensitizers with NO Photodonors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17*, 1709–1727. [[CrossRef](#)]
448. Parisi, C.; Failla, M.; Fraix, A.; Rescifina, A.; Rolando, B.; Lazzarato, L.; Cardile, V.; Graziano, A.C.E.; Fruttero, R.; Gasco, A.; et al. A Molecular Hybrid Producing Simultaneously Singlet Oxygen and Nitric Oxide by Single Photon Excitation with Green Light. *Bioorganic Chem.* **2019**, *85*, 18–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
449. Maya, R.; Ladeira, L.L.C.; Maya, J.E.P.; Mail, L.M.G.; Bussadori, S.K.; Paschoal, M.A.B. The Combination of Antimicrobial Photodynamic Therapy and Photobiomodulation Therapy for the Treatment of Palatal Ulcers: A Case Report. *J. Lasers Med. Sci.* **2020**, *11*, 228–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
450. Alqerban, A. Efficacy of Antimicrobial Photodynamic and Photobiomodulation Therapy against *Treponema Denticola*, *Fusobacterium Nucleatum* and Human Beta Defensin-2 Levels in Patients with Gingivitis Undergoing Fixed Orthodontic Treatment: A Clinic-Laboratory Study. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *29*, 101659. [[CrossRef](#)]
451. Fekrazad, R. Photobiomodulation and Antiviral Photodynamic Therapy as a Possible Novel Approach in COVID-19 Management. *Photobiomodulation Photomed. Laser Surg.* **2020**, *38*, 255–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
452. Lago, A.D.N.; Fortes, A.B.C.; Furtado, G.S.; Menezes, C.F.S.; Gonçalves, L.M. Association of Antimicrobial Photodynamic Therapy and Photobiomodulation for *Herpes Simplex Labialis* Resolution: Case Series. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *32*, 102070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
453. Teixeira, I.S.; Leal, F.S.; Tateno, R.Y.; Palma, L.F.; Campos, L. Photobiomodulation Therapy and Antimicrobial Photodynamic Therapy for Orofacial Lesions in Patients with COVID-19: A Case Series. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2021**, *34*, 102281. [[CrossRef](#)]
454. Ma, X.; Pan, H.; Wu, G.; Yang, Z.; Yi, J. Ultrasound May Be Exploited for the Treatment of Microbial Diseases. *Med. Hypotheses* **2009**, *73*, 18–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
455. Serpe, L.; Giuntini, F. Sonodynamic Antimicrobial Chemotherapy: First Steps towards a Sound Approach for Microbe Inactivation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *150*, 44–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
456. Costley, D.; Ewan, C.M.; Fowley, C.; McHale, A.P.; Atchison, J.; Nomikou, N.; Callan, J.F. Treating Cancer with Sonodynamic Therapy: A Review. *Int. J. Hyperth.* **2015**, *31*, 107–117. [[CrossRef](#)]
457. Alves, F.; Gomes Guimarães, G.; Mayumi Inada, N.; Pratavieira, S.; Salvador Bagnato, V.; Kurachi, C. Strategies to Improve the Antimicrobial Efficacy of Photodynamic, Sonodynamic, and Sonophotodynamic Therapies. *Lasers Surg. Med.* **2021**, *Ism.23383*. [[CrossRef](#)]
458. Erriu, M.; Blus, C.; Szmukler-Moncler, S.; Buogo, S.; Levi, R.; Barbato, G.; Madonnaripa, D.; Denotti, G.; Piras, V.; Orrù, G. Microbial Biofilm Modulation by Ultrasound: Current Concepts and Controversies. *Ultrason. Sonochemistry* **2014**, *21*, 15–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
459. Harris, F.; Dennison, S.R.; Phoenix, D.A. Using Sound for Microbial Eradication—Light at the End of the Tunnel? *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *356*, 20–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

460. Pourhajibagher, M.; reza Rokn, A.; reza Barikani, H.; Bahador, A. Photo-Sonodynamic Antimicrobial Chemotherapy via Chitosan Nanoparticles-Indocyanine Green against Polymicrobial Periopathogenic Biofilms: *Ex Vivo* Study on Dental Implants. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2020**, *31*, 101834. [[CrossRef](#)]
461. Pourhajibagher, M.; Bahador, A. Attenuation of Aggregatibacter Actinomycetemcomitans Virulence Using Curcumin-Decorated Nanophytosomes-Mediated Photo-Sonoantimicrobial Chemotherapy. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
462. Traitcheva, N.; Berg, H. Electroporation and Alternating Current Cause Membrane Permeation of Photodynamic Cytotoxins Yielding Necrosis and Apoptosis of Cancer Cells. *Bioelectrochemistry* **2010**, *79*, 257–260. [[CrossRef](#)]
463. Weżgowiec, J.; Kulbacka, J.; Saczko, J.; Rossowska, J.; Chodaczek, G.; Kotulska, M. Biological Effects in Photodynamic Treatment Combined with Electroporation in Wild and Drug Resistant Breast Cancer Cells. *Bioelectrochemistry* **2018**, *123*, 9–18. [[CrossRef](#)]
464. Reinhard, A.; Sandborn, W.J.; Melhem, H.; Bolotine, L.; Chamailard, M.; Peyrin-Biroulet, L. Photodynamic Therapy as a New Treatment Modality for Inflammatory and Infectious Conditions. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2015**, *11*, 637–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
465. McFarland, S.A.; Mandel, A.; Dumoulin-White, R.; Gasser, G. Metal-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy: The Future of Multimodal Oncology? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *56*, 23–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
466. Prasad, P.; Gupta, A.; Sasmal, P.K. Aggregation-Induced Emission Active Metal Complexes: A Promising Strategy to Tackle Bacterial Infections. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 174–186. [[CrossRef](#)]
467. Gao, S.; Yan, X.; Xie, G.; Zhu, M.; Ju, X.; Stang, P.J.; Tian, Y.; Niu, Z. Membrane Intercalation-Enhanced Photodynamic Inactivation of Bacteria by a Metallacycle and TAT-Decorated Virus Coat Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 23437–23443. [[CrossRef](#)]
468. Jerjes, W.; Theodossiou, T.A.; Hirschberg, H.; Høgset, A.; Weyergang, A.; Selbo, P.K.; Hamdoon, Z.; Hopper, C.; Berg, K. Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 528. [[CrossRef](#)]
469. Zhang, X.; de Boer, L.; Heiliegers, L.; Man-Bovenkerk, S.; Selbo, P.K.; Drijfhout, J.W.; Høgset, A.; Zaat, S.A.J. Photochemical Internalization Enhances Cytosolic Release of Antibiotic and Increases Its Efficacy against Staphylococcal Infection. *J. Control. Release* **2018**, *283*, 214–222. [[CrossRef](#)]
470. Hilgers, F.; Bitzenhofer, N.L.; Ackermann, Y.; Burmeister, A.; Grünberger, A.; Jaeger, K.-E.; Drepper, T. Genetically Encoded Photosensitizers as Light-Triggered Antimicrobial Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
471. Gorbachev, D.A.; Staroverov, D.B.; Lukyanov, K.A.; Sarkisyan, K.S. Genetically Encoded Red Photosensitizers with Enhanced Phototoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
472. Endres, S.; Wingen, M.; Torra, J.; Ruiz-González, R.; Polen, T.; Bosio, G.; Bitzenhofer, N.L.; Hilgers, F.; Gensch, T.; Nonell, S.; et al. An Optogenetic Toolbox of LOV-Based Photosensitizers for Light-Driven Killing of Bacteria. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
473. Liao, Y. Design and Applications of Metastable-State Photoacids. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1956–1964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
474. Luo, Y.; Wang, C.; Peng, P.; Hossain, M.; Jiang, T.; Fu, W.; Liao, Y.; Su, M. Visible Light Mediated Killing of Multidrug-Resistant Bacteria Using Photoacids. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 997–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
475. Huang, T.-C.; Chen, C.-J.; Ding, S.-J.; Chen, C.-C. Antimicrobial Efficacy of Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy on Titanium Alloy Surfaces In Vitro. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *25*, 7–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
476. Yang, Y.; Goetzfried, M.A.; Hidaka, K.; You, M.; Tan, W.; Sugiyama, H.; Endo, M. Direct Visualization of Walking Motions of Photocontrolled Nanomachine on the DNA Nanostructure. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 6672–6676. [[CrossRef](#)]
477. Zhuang, X.; Ma, X.; Xue, X.; Jiang, Q.; Song, L.; Dai, L.; Zhang, C.; Jin, S.; Yang, K.; Ding, B.; et al. A Photosensitizer-Loaded DNA Origami Nanosystem for Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **2016**, *10*, 3486–3495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
478. Donnelly, R.F.; McCarron, P.A.; Tunney, M.M. Antifungal Photodynamic Therapy. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
479. Pereira Rosa, L. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. *J. Med. Microb. Diagn.* **2014**, *3*, 1. [[CrossRef](#)]
480. Kim, M.M.; Darafsheh, A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 280–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
481. Heinemann, F.; Karges, J.; Gasser, G. Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2727–2736. [[CrossRef](#)]
482. Boca, S.C.; Four, M.; Bonne, A.; van der Sanden, B.; Astilean, S.; Baldeck, P.L.; Lemerrier, G. An Ethylene-Glycol Decorated Ruthenium(II) Complex for Two-Photon Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* **2009**, *30*, 4590–4592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
483. Blum, N.T.; Zhang, Y.; Qu, J.; Lin, J.; Huang, P. Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 594491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
484. Liu, S.; Yuan, H.; Bai, H.; Zhang, P.; Lv, F.; Liu, L.; Dai, Z.; Bao, J.; Wang, S. Electrochemiluminescence for Electric-Driven Antibacterial Therapeutics. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2284–2291. [[CrossRef](#)]
485. Kamkaew, A.; Chen, F.; Zhan, Y.; Majewski, R.L.; Cai, W. Scintillating Nanoparticles as Energy Mediators for Enhanced Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **2016**, *10*, 3918–3935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
486. Kamanli, A.F.; Çetinel, G. Comparison of Pulse and Super Pulse Radiation Modes' Singlet Oxygen Production Effect in Antimicrobial Photodynamic Therapy (AmPDT). *Photodiagn. Photodyn Ther.* **2020**, *30*, 101706. [[CrossRef](#)]

487. Hou, X.; Tao, Y.; Li, X.; Pang, Y.; Yang, C.; Jiang, G.; Liu, Y. CD44-Targeting Oxygen Self-Sufficient Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy Against Malignant Melanoma. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 10401–10416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
488. Liang, M.; Yan, X. Nanozymes: From New Concepts, Mechanisms, and Standards to Applications. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 2190–2200. [[CrossRef](#)]
489. Liu, X.; Liu, J.; Chen, S.; Xie, Y.; Fan, Q.; Zhou, J.; Bao, J.; Wei, T.; Dai, Z. Dual-Path Modulation of Hydrogen Peroxide to Ameliorate Hypoxia for Enhancing Photodynamic/Starvation Synergistic Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 9933–9942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
490. Wang, D.; Wu, H.; Phua, S.Z.F.; Yang, G.; Qi Lim, W.; Gu, L.; Qian, C.; Wang, H.; Guo, Z.; Chen, H.; et al. Self-Assembled Single-Atom Nanozyme for Enhanced Photodynamic Therapy Treatment of Tumor. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
491. Nonell, S.; Ferreras, L.R.; Cañete, A.; Lemp, E.; Günther, G.; Pizarro, N.; Zanoocco, A.L. Photophysics and Photochemistry of Naphthoxazinone Derivatives. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5371–5378. [[CrossRef](#)]
492. Lamarque, G.C.C.; Méndez, D.A.C.; Gutierrez, E.; Dionisio, E.J.; Machado, M.A.A.M.; Oliveira, T.M.; Rios, D.; Cruvinel, T. Could Chlorhexidine Be an Adequate Positive Control for Antimicrobial Photodynamic Therapy in-in Vitro Studies? *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *25*, 58–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
493. Pourhajibagher, M.; Bahador, A. Computational Biology Analysis of COVID-19 Receptor-Binding Domains: A Target Site for Indocyanine Green Through Antimicrobial Photodynamic Therapy. *J. Lasers Med. Sci.* **2020**, *11*, 433–441. [[CrossRef](#)]

### 3. Avantages et limites principales de la PDT

Pour agir préférentiellement sur une zone définie, l'administration de la lumière (et du PS) doit être localisée. Ce critère présente des avantages mais également des inconvénients. Des limitations quant à l'utilisation générale de la PDT sont évoquées dans cette partie.

#### 3.1. Phototoxicité

La toxicité des PS peut être évaluée selon plusieurs indices dans l'objectif de définir la fenêtre thérapeutique à laquelle ils peuvent être utilisés. Par exemple, pour une application anti-infectieuse, certains PS sont antimicrobiens, indépendamment de la lumière. Les activités de ces molécules, avec et sans lumière, ne sont pas obtenues avec les mêmes gammes de concentration. C'est le cas des dérivés du bleu de méthylène (MB), qui ont une « Concentration Minimale Inhibitrice » (CMI), indépendamment de la lumière, 50 fois plus importantes que leur « Concentration Minimale Photoinhibitrice »<sup>4</sup> (CMP) [64,65]. Le MB est notamment appliqué en systémique lors d'essais cliniques en tant qu'agent antipaludique (non lumière dépendant) en Afrique subsaharienne à des doses uniques élevées (2000  $\mu\text{mol/L}$  (10 mg/kg)) [66]. De façon générale, reconsidérer les doses administrées en prenant en compte l'effet de l'illumination permettrait, de réduire les doses prescrites et pourrait prévenir d'éventuels effets cytotoxiques dus aux phénomènes de bioaccumulation<sup>5</sup>.

Par ailleurs, malgré une illumination locale, la phototoxicité peut s'étendre au-delà de la zone traitée et peut endommager les tissus environnants [63]. Limiter l'action des ROS et  $^1\text{O}_2$  à la zone traitée est difficile à contrôler car ces espèces ne permettent pas de cibler exclusivement une composante moléculaire/structurale d'un organisme vivant (Cf Section Introduction, partie I, 2.3). De plus, les paramètres physico-chimiques du milieu environnant peuvent impacter leur diffusion et leur affinité pour une espèce/molécule donnée [14]. Ainsi, l'optimisation de vecteurs délivrant le PS et la mise en place de stratégies combinatoires ont pour but de limiter cette toxicité liée aux effets doses [10]. Par ailleurs, d'autres paramètres,

---

<sup>4</sup> CMI et CMP : concentration à laquelle l'agent antibactérien à inhiber 100 % de la croissance bactérienne indépendamment de la lumière (CMI) ou combiné à la lumière (CMP)

<sup>5</sup> Bioaccumulation : phénomène d'accumulation d'une molécule dans un tissu/organe

tels que la voie d'administration et la délivrance localisée de la lumière sont primordiaux pour concentrer au maximum l'effet phototoxique du PS sur la zone à traiter [67].

### 3.2. Voies d'administration du PS

Selon l'application étudiée, les PS peuvent être administrés par différentes voies ; la principale repose sur l'injection intraveineuse. La diffusion et l'accumulation du PS utilisé dans une zone d'intérêt dépendent des différences physiologiques (et immunologiques) existantes entre les cellules normales et les cellules ciblées [68]. D'autres modes d'administration ont pu être utilisés, telles que l'injection intra-articulaire dans le cas de l'arthrite rhumatoïde par exemple [69]. Pour les applications antimicrobiennes, l'injection intraveineuse n'est pas la voie d'administration la plus adaptée, car la plupart des infections traitées sont des infections localisées (de surface), donc non systémiques [70]. De plus, parmi les essais cliniques réalisés en PDT antimicrobienne, deux types d'applications prédominent : les infections cutanées et buccales [10]. Ces approches ont permis le développement de modes d'administrations topiques qui sont compatibles avec une application sur la peau ou les muqueuses (crèmes, gels, solutions liquides).

### 3.3. Voies d'administration de la lumière

Le plus souvent, pour traiter les lésions superficielles, l'utilisation de faisceaux externes est recommandée (profondeur effective de pénétration de la lumière <10 mm); en revanche, pour cibler les tissus profonds et/ou difficiles d'accès, la délivrance de la lumière peut être réalisée par des outils spécifiques [71]. Ces derniers sont étudiés, pour la plupart, dans le traitement des tumeurs de la tête et du cou, du pancréas, de la prostate et du cerveau. Les fibres laser peuvent y être administrées via des aiguilles ou placées dans des cathéters [72]. Malgré ces innovations, apporter le système d'illumination dans une zone interstitielle peut être invasif, douloureux et peut générer des effets indésirables. Ces derniers comprennent des irritations liées aux frottements lors de l'administration, ou des infections, à la suite d'une éventuelle contamination du dispositif. A l'inverse, utiliser des modèles extracorporels limitent ces effets secondaires. En revanche, des effets de photosensibilisation peuvent être observés [73].

### 3.4. Etudes pré-cliniques

Le principal modèle *in vivo* utilisé pour des applications de PDT est le modèle murin. Bien que plusieurs PS aient déjà atteints le stade clinique, la grande majorité des essais se sont limités à l'échelle préclinique. L'étude des cancers comprend le plus grand groupe de modèles animaux, dont les tumeurs développées peuvent être : (i) syngéniques<sup>6</sup> (sous-cutanées ou orthotopiques<sup>7</sup>) (ii) issus de xénogreffes de tumeurs humaines, (iii) autochtones<sup>8</sup> ou (iv) issues de souris génétiquement modifiées (GEMM) (**Table 2**). Les modèles infectieux sont le deuxième plus grand groupe de modèles animaux. Globalement, l'utilisation de modèles de taille plus importante a été rapportée pour des applications de PDT en ophtalmologie, athérosclérose, fibrillation auriculaire et en dermatologie [74].

### 3.5. Critères cliniques

L'intérêt de la PDT en clinique est en progression dans certains domaines, mais son acceptation dans le milieu médical demeure, de façon générale, mitigée. Pourtant, son efficacité et sa facilité d'utilisation sont des avantages. De plus, l'évaluation des coûts estimés pour utiliser une PDT dans une application donnée doit également être pris en compte par rapport aux traitements conventionnels disponibles sur le marché [67]. L'optimisation des protocoles et la standardisation des techniques est cependant nécessaire pour développer l'utilisation de la PDT en clinique. En effet, la comparaison de son efficacité avec celles d'autres traitements conventionnels n'est pas toujours bien évaluée. Par exemple, dans certains essais cliniques, son utilisation est comparée à des traitements de derniers recours (ablations, chirurgies locales) [18]. De plus, face à la complexité de certaines pathologies, la PDT pourrait non pas se substituer mais compléter certains traitements conventionnels. Son intérêt combinatoire a été évoqué dans la littérature [10,75,76], et fera l'objet d'une étude dans le présent manuscrit (Cf Section Résultats, partie II).

---

<sup>6</sup> Syngénique : qui est génétiquement identique (de même lignée)

<sup>7</sup> Orthotopique : qui est situé à son emplacement anatomique habituel

<sup>8</sup> Autochtone : liée à l'application d'une substance cancérogène

**Table 2. Exemple de différents essais précliniques de PDT** | Liste des différentes pathologies traitées par PDT regroupées par domaine (cancer, infections et les autres). (D'après [74])

Pathologie	Modèle animal	PS
<b>Cancers</b>		
Ovarien, (Esophage, CEIEC, Foie, Prostate, Sein, Poupon	Souris nude, SCID, Ncr-nu-nu, BALB-c (modèle greffe)	Photofrin, Vertéporfine, HPPH, Chlore(e6), Phtalocyanine, TCOOKAD, Photochlore, Pyropheoporphyrine MV6401, DBP liposomale, 5-ALA
Sarcome mammaire, denocarcinome du colon, Poupon, Melanome, Lymphome, Prostate, gliome, cerveau, sein, vessie	Souris BALB/c, C3H, C57BL/6 et Rats Copenhague, Sprague-Dawley, BD-IX, Fischer F344 (modèle syngénique)	mIHPc, Haematoporphyrine, Radachlorine, Acridine orange, HPPH, Hypericin, Vertéporfin, Phtalocyanine, ALA,
Bouche/dysplasie, tumeurs mammaires et cutanées	Souris CBA et FVB/N, Rats Wistar, Sprague-Dawley, Hamster doré (modèle autochtone)	Haematoporphyrine, ALA, Hématoporphyrine
<b>Infections</b>		
Infections des plaies ( <i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> (MRSA), <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , bactéries anaérobies)	Souris BALB-c et CD-1, Cochon d'inde, Rats Wistar (modèle infecté)	Poly-L-lysine-chlorin(e6), PEL-chlorin(e6), Bleu de toluidine O, Haemün/deuteroporphyrine
Candidiase buccale ( <i>C. albicans</i> )	Souris nude (modèle infecté)	Bleu de méthylène
Leishmaniose ( <i>L. amazonensis</i> )	Hamster doré (modèle infecté)	Bleu de méthylène
Tuberculose ( <i>Mycobacterium bovis</i> BCG)	Souris BALB-c (modèle infecté)	Vertéporfine
Otite ( <i>S. pneumoniae</i> ou <i>H. influenzae</i> )	Cerbillon de Mongolie (modèle infecté)	Haematoporphyrine
Parodontite (Bactéries à Gram négatif anaérobies)	Rats Wistar (modèle infecté)	Bleu de toluidine O
Ostéomyélite ( <i>S. aureus</i> )	Rats Sprague-Dawley (modèle infecté)	ALA
Arthrite infectieuse ( <i>S. aureus</i> (MRSA))	Souris C57BL/6 (modèle infecté)	Bleu de méthylène
<b>Autres</b>		
Néovascularisation choroïdienne	Lapin / Singe	Vertéporfine
Athérosclérose	Lapin / Cochon du Yucatan	Etiopurpurin MV0611, Photofrin
Fibrillation atriale	Chien / Rat	Talaporfin sodium
Cicatrisation des plaies vasculaires	Rat	Bleu de méthylène
Cicatrisation	Rat / Lapin	ALA
Photovieillissement	Souris	ALA

### 3.5.1. Biodistribution

L'avantage de la majorité des agents photosensibles est qu'ils sont, par définition, fluorescents. Cette propriété, combinée à la production de ROS et  $^1\text{O}_2$ , permet d'appliquer une approche théranostique<sup>9</sup>. En effet, pour une approche anticancer comme antimicrobienne, il est intéressant de visualiser et traiter la prolifération du cancer ou de l'infection dans un même temps. De plus, cette approche génèrerait des informations intéressantes comme les paramètres pharmacocinétiques (biodistribution, élimination...) et la progression de la maladie dans l'organisme (par traçage de fluorescence). Cela renforcerait la détection précoce et la mise en place du traitement avec une intervention minimale [77,78]. Par ailleurs, les phénomènes de bioaccumulation à l'origine d'effets secondaires pourraient être clairement identifiés. Un suivi en temps réel offrirait des possibilités de thérapies individualisées plus raisonnées et plus facile à contrôler [79].

### 3.5.2. Innocuité

Les effets indésirables associés à la PDT comprennent la photosensibilisation, l'érythème, l'œdème, la fièvre, l'épanchement pleural, la constipation, l'anémie et l'insuffisance respiratoire [80]. Le principal effet secondaire de la PDT est la douleur, qui survient généralement au début de l'irradiation, puis diminue progressivement au fil du temps. Elle peut être diminuée par utilisation d'une combinaison d'opiacés, d'opioïdes et d'Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) [39]. La photosensibilisation est une autre complication courante, qui peut durer plusieurs mois ; dans la majorité des cas, cet effet est léger à modéré, et ne nécessite aucun traitement. La maîtrise de la dosimétrie<sup>10</sup> et l'optimisation des protocoles de la PDT pourraient éviter ces effets secondaires [81]. Par ailleurs, certaines études de cas (« case-report ») rapportent un effet bénéfique et/ou indésirable sur un faible nombre d'individus et mettent en avant une certaine variabilité inter-patients dans la tolérance et l'efficacité des traitements par PDT [57,82]. Ainsi, au-delà des paramètres

---

<sup>9</sup> Théranostique : combine à la fois le thérapeutique et le diagnostic

<sup>10</sup> Dosimétrie : mesure de la dose lumineuse absorbée par un tissu/organe/organisme

biologiques/chimiques cités précédemment, le profil clinique (pathologie, âge, diagnostics et traitements antérieurs) des patients traités est aussi un élément à prendre en compte.

L'ensemble de ces critères témoigne du manque de recul sur la mise au point d'une stratégie par PDT pour un certain nombre d'application. Cependant, cette stratégie ferait preuve de sens dans les domaines de la cancérologie et de l'infectiologie où les agents thérapeutiques actuels sont confrontés aux problèmes de résistance. Actuellement, relativement peu d'études témoignent de son potentiel pour le traitement des infections bronchopulmonaires [73,83].

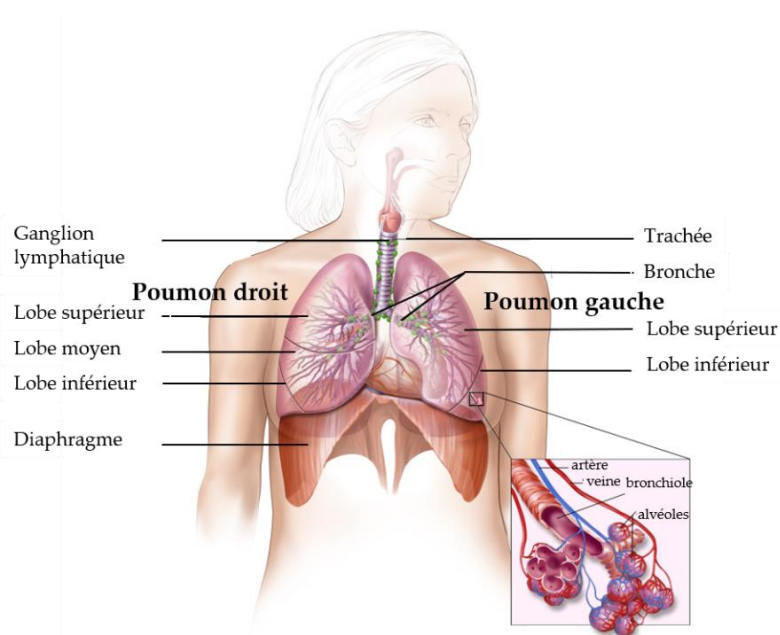
## II. Les infections bronchopulmonaires : la mucoviscidose prise comme maladie cible et modèle d'étude

---

Les infections respiratoires sont retrouvées sous deux formes : les infections aiguës et les infections chroniques. Le contexte pathologique choisi pour cette étude sont les infections bronchopulmonaires chroniques retrouvées chez les patients CF.

### 1. Généralités

Les voies respiratoires correspondent à un ensemble d'organes dont le rôle est d'assurer la circulation de l'air entre l'extérieur et l'intérieur du corps via le processus de respiration. Elles assurent l'apport en oxygène par inhalation, où l'air inspiré par le nez va ensuite transiter vers le pharynx et le larynx, jusque dans la trachée, et atteindre finalement les poumons (**Figure 7**).



**Figure 7. Anatomie des voies respiratoires, de la trachée aux alvéoles** (D'après <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq>)

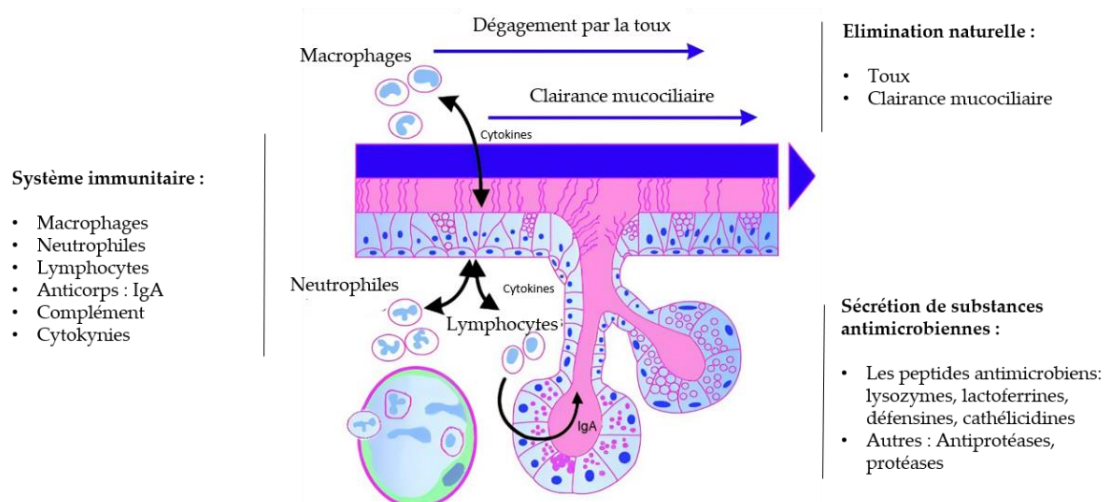
Par expiration, l'air, composé principalement de dioxyde de carbone, va ensuite remonter en chemin inverse les voies respiratoires et être rejeté par la bouche. Toute personne inspire et expire plus de 20 000 fois par jour. En plus des échanges gazeux, les autres fonctions des voies

respiratoires sont le réchauffement et l'humidification de l'air inhalé ainsi que la filtration des substances nocives et des agents pathogènes.

### 1.1. Fonctions respiratoires chez un individu sain

Afin d'éliminer les agents inhalés potentiellement dangereux (microorganismes, polluants, allergènes), la clairance mucociliaire balaye les substances toxiques situées à la surface des cellules épithéliales via la présence des cellules ciliées (**Figure 8**).

La première ligne de défense immunitaire, appelée immunité innée, fait intervenir des facteurs humoraux, tels que les anticorps IgA sécrétés. Ces derniers jouent un rôle important dans la protection et la régulation homéostatique des épithéliums muqueux respiratoires, séparant l'environnement extérieur de l'intérieur du corps. Leur sécrétions limitent la diffusion de nombreux microorganismes opportunistes à travers ces barrières muqueuses minces et vulnérables [84]. De plus, la sécrétion de peptides antimicrobiens tels que les cathélicidines, les défensines, les protéines de type lactoferrines et les lysozymes contribuent également naturellement à l'élimination de ces microorganismes (**Figure 8**). Les cellules dendritiques (CD) vont reconnaître les antigènes bactériens et piéger les bactéries afin de les transporter vers les ganglions lymphatiques. Les bactéries seront alors reconnues par les lymphocytes T et B afin de déclencher la réponse immunitaire adaptative.

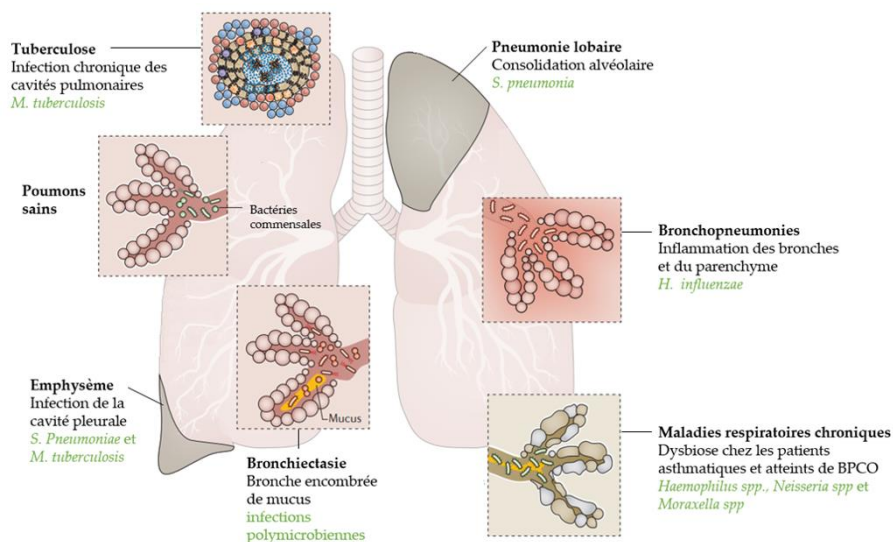


**Figure 8. Schématisation des mécanismes de défense de l'hôte au niveau pulmonaire** | Interventions des mécanismes physiques, du système immunitaire et des agents antimicrobiens naturels. IgA : immunoglobuline A. (D'après : <https://www.jci.org/articles/view/6277/figure/1>).

La plupart des pathogènes pulmonaires atteignent les poumons par la diffusion de gouttelettes dans l'air, par leur micro-aspiration dans l'oropharynx ou par diffusion via le système sanguin [79]. Dans la majorité des cas, ils sont éliminés grâce à la clairance mucociliaire en synergie avec l'activation de systèmes de défense des voies supérieures. Cependant, certains microorganismes peuvent pénétrer les surfaces distales d'échange gazeux et ainsi coloniser les épithéliums pulmonaires [80].

## 1.2. Infections respiratoires basses

Les infections respiratoires basses (IRB) sont actuellement des causes de morbidité et de mortalité aussi bien chez l'adulte que l'enfant. Elles affectent diverses zones de la trachée aux alvéoles pulmonaires en passant par les bronches et les bronchioles. Les principales pathologies sont les pneumonies, les bronchopneumonies (bronchite aiguë) ou les maladies respiratoires chroniques (BPCO) (**Figure 9**).



**Figure 9. Les différentes IRB chez l'Homme** | Répartitions des IRB au sein des poumons avec leurs conséquences et les infections bactériennes associées. (D'après [85]).

Leur traitement est basé sur le degré de sévérité de l'infection, lui-même défini par la symptomatologie et l'étiologie. Cette dernière peut être virale (*Haemophilus influenzae*) ou bactérienne (*Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* (noté *S. aureus* ou *S. a*) et *Pseudomonas aeruginosa* (noté *P. aeruginosa* ou *P. a*) ou parfois même fongique (*C. albicans*) [86]. Certaines IRB peuvent être également une résultante d'un dysfonctionnement

des fonctions respiratoires lié à des pathologies d'origines génétiques, telles que l'asthme ou encore la Mucoviscidose.

## 2. La Mucoviscidose

La Mucoviscidose est une pathologie d'origine génétique donnant lieu à de nombreuses manifestations cliniques. De ce fait, elle peut servir de modèle d'étude pour la mise au point de divers traitements, notamment au niveau pulmonaire.

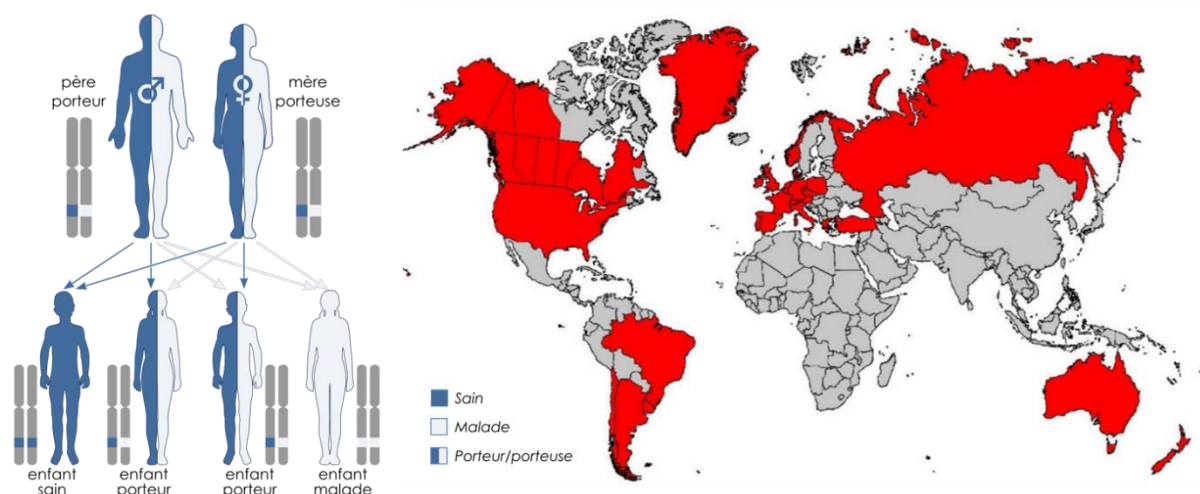
### 2.1. Généralités

#### 2.1.1. Historique et épidémiologie

La Mucoviscidose, aussi appelée la maladie des mucus visqueux, est une maladie génétique multiviscérale qui affecte les épithéliums glandulaires de nombreux organes. Au Moyen-Age, la pathologie était identifiée lorsque la mère embrassait le front de l'enfant et détectait un goût salé. Une des premières descriptions médicales a été l'observation de lésions pancréatiques, ce qui mena, au XXème siècle, à l'appellation de la maladie « fibrose kystique du pancréas ». La terminologie « cystic fibrosis » reste la plus couramment utilisée.

Cette pathologie représente aujourd'hui la maladie génétique la plus fréquente parmi les populations caucasiennes, affectant 1/4600 naissances. Son mode de transmission est autosomale récessif, donc non lié au chromosome sexuel. Ainsi, si deux parents sont porteurs hétérozygotes d'une mutation pathogène du gène *CFTR*, leur risque d'avoir un enfant homozygote malade est de 25 % (**Figure 10**). La fréquence des porteurs sains de la maladie est d'environ 1/252, soit 4 % de la population générale occidentale. Bien que cette pathologie rare soit létale, la qualité et l'espérance de vie des patients ont été considérablement améliorées ces 50 dernières années ; en France notamment, l'espérance de vie à la naissance était de 7 ans en 1965 et dépasse 50 ans depuis 2014.

### Transmission autosomique récessive



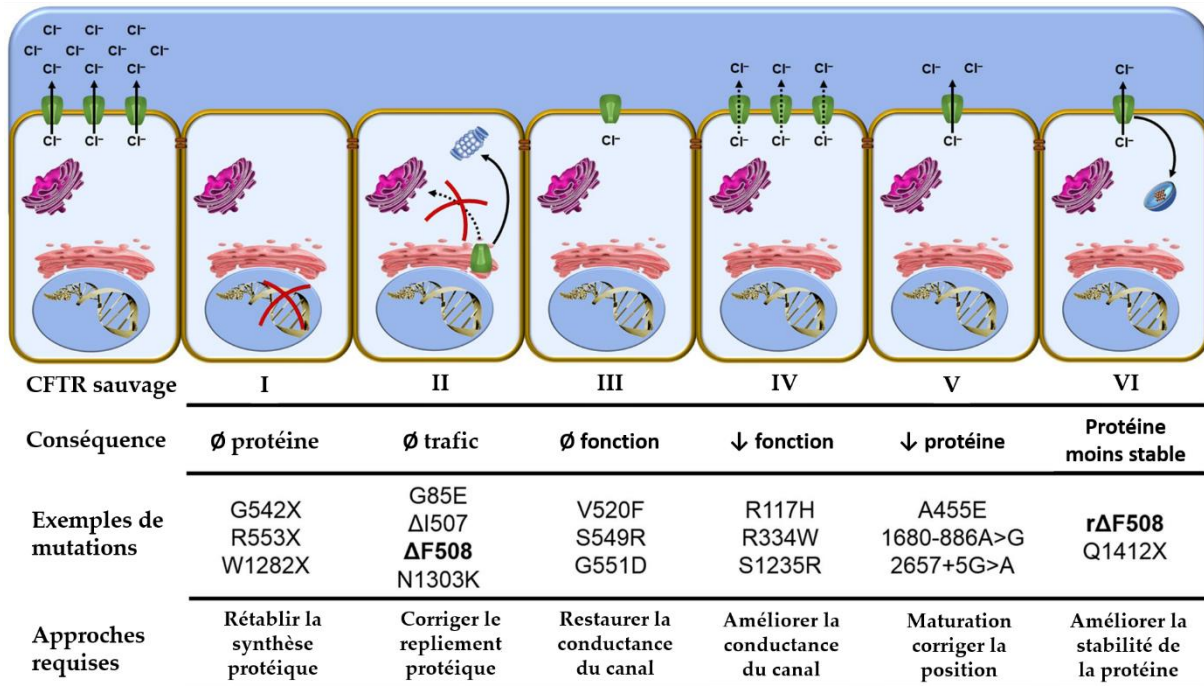
**Figure 10. Epidémiologie et mode de transmission** | A gauche : Schématisation du mode de transmission autosomique récessif de la mucoviscidose ([https://fr.wikipedia.org/wiki/Mucoviscidose#/media/Fichier:Autosomal\\_recessive\\_-\\_fr.svg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Mucoviscidose#/media/Fichier:Autosomal_recessive_-_fr.svg)). A droite : Répartition géographique des nouveaux nés atteints de mucoviscidose dans le monde analysée lors d'un recensement en 2020 [87].

### 2.1.2. Etiologie

L'origine génétique de la Mucoviscidose est caractérisée par la présence de mutations au sein du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), présent sur le chromosome 7. Chez un individu sain, la protéine CFTR, en synergie avec d'autres protéines-canal, a pour rôle de réguler les efflux ioniques entre les cellules.

Actuellement, plus de 2000 mutations identifiées contribuent à l'hétérogénéité des profils physiopathologiques de la maladie. De façon générale, les mutations sont catégorisées en 6 classes selon leur impact sur la fonctionnalité/structure/mobilisation de la protéine CFTR (**Figure 11**) [88]. Les mutations de classe I sont souvent celles à l'origine des phénotypes les plus sévères. Elles ont pour conséquence de produire un décalage du cadre de lecture suite à l'apparition d'un codon stop prématuré, ce qui mène à l'absence de synthèse protéique de CFTR. Les mutations de classe II, quant à elles, induisent la délétion d'un acide aminé conduisant à la formation d'une protéine mal conformée. De ce fait, la quantité de protéine fonctionnelle adressée au pôle apical des cellules épithéliales est insuffisante. La mutation majeure de cette catégorie est la F508del et demeure la plus répandue dans le monde. Les mutations de classe III vont engendrer un défaut d'ouverture du canal CFTR, ce qui a pour conséquence de diminuer les échanges ioniques. Les mutations de classe IV perturbent le

mouvement des ions ainsi que leur sélectivité. Les mutations de classe V sont situées principalement dans la région promotrice du gène entraînant une diminution de l'expression du transcrit et, de ce fait, une synthèse protéique moins importante. Enfin, les mutations de classe VI conduisent à la formation d'une protéine CFTR tronquée et par conséquent instable à la membrane.



**Figure 11.** Catégorisation des différentes classes de mutations (de I à VI) du gène *CFTR* | Pour chaque classe, les informations suivantes sont décrites : (i) l'impact des mutations sur la protéine CFTR, (ii) les principales mutations et (iii) les approches thérapeutiques requises pour compenser le défaut de la protéine CFTR (D'après [89]).

Le dysfonctionnement de la protéine CFTR créé des déséquilibres physiologiques dans l'environnement pulmonaire, ce qui mène, *in fine*, à la colonisation chronique par divers pathogènes.

## 2.2. Environnement pulmonaire

Le déséquilibre ionique provoqué par la protéine CFTR dysfonctionnelle a un impact majeur sur certains paramètres physico-chimiques du liquide interstitiel pulmonaire (nommé « Airway Surface Liquid », ASL). Chez un patient CF, l'efflux anormal d'ions se traduit par une augmentation de Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, ce qui, en combinaison avec un efflux d'ions bicarbonates important, favorise l'acidification de l'ASL (**Table 3**). Par ailleurs, la clairance mucociliaire chez un individu CF est fortement diminuée, ce qui mène à une accumulation dans l'ASL de

déchets, composés en majorité de débris cellulaires, d'eau et de sels. Ce mélange, visqueux, épais et pauvre en oxygène, constitue un mucus particulièrement propice à la colonisation bactérienne chez les patients.

**Table 3. Les différents paramètres physico-chimiques de l'ASL retrouvés chez les individus sains versus chez les patients CF** | ASL : « Airway Surface Liquid », VEF : Volume Expiratoire Forcé

Paramètres de l'ASM	Profil du gène <i>CFTR</i>	Variations
Salinité	sauvage	Normal → [Na <sup>+</sup> ] = 50 mM, [Cl <sup>-</sup> ] = 37 mM
	muté	Haute → [Na <sup>+</sup> ] = 90 mM, [Cl <sup>-</sup> ] = 85 mM
pH	sauvage	Neutre → ~ 7,35 ± 0,05
	muté	Acide → ~ 6,70 ± 0,03
Mucus	sauvage	Fluide → clairance mucociliaire efficace
	muté	Epais et visqueux → clairance mucociliaire inefficace
Oxygénation	sauvage	Normal → 185 mM de O <sub>2</sub> (VEF <sub>1</sub> > 70%)
	muté	Faible → ≤ 3 μM de O <sub>2</sub> (VEF <sub>1</sub> < 70%)

## 2.3. Infections respiratoires

La propagation de pathogènes étant favorisée par une clairance mucociliaire déficiente chez les patients CF, certains microorganismes parviennent à atteindre et coloniser les voies pulmonaires. Combinée aux changements physiologiques, l'inflammation pulmonaire participe également à la chronicité des infections.

### 2.3.1. Infections bactériennes

Les bactéries retrouvées chez les patients CF sont, dans la majorité des cas, caractérisées de pathogènes opportunistes<sup>11</sup>. Ils peuvent, dans le microenvironnement pulmonaire des patients CF, développer une pathogénicité, notamment en passant d'un phénotype « planctonique » (non adhérentes) à « biofilm ». Ce dernier est composé de bactéries sécrétant une matrice formée majoritairement d'eau, d'exopolysaccharides (EPS), de protéines et d'ADN extracellulaire [90]. La prévalence de ces espèces bactériennes évolue en fonction de l'âge du patient (**Figure 12**).

<sup>11</sup> Opportuniste : qui peut développer une pathogénicité (devenir pathogène) dans un environnement donné

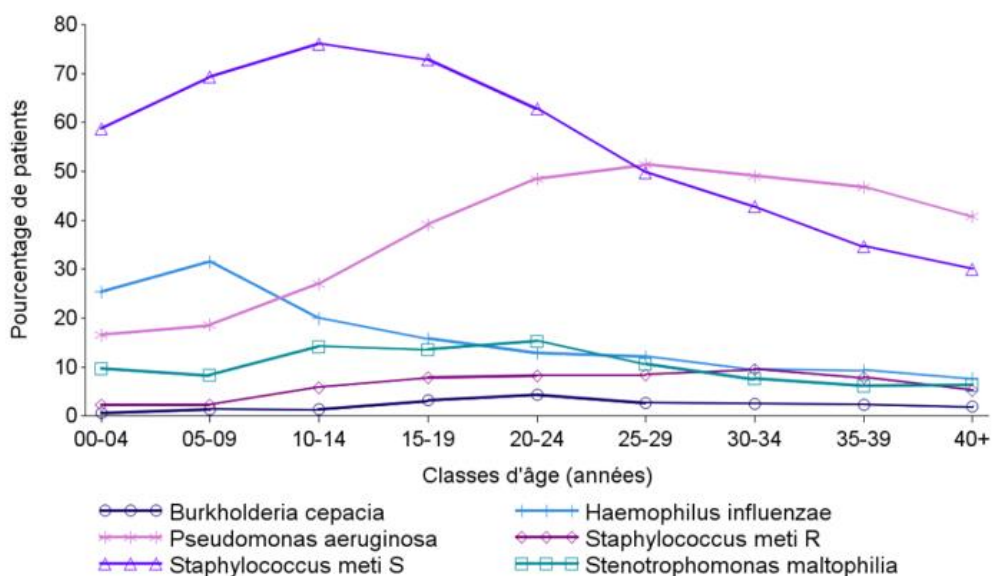
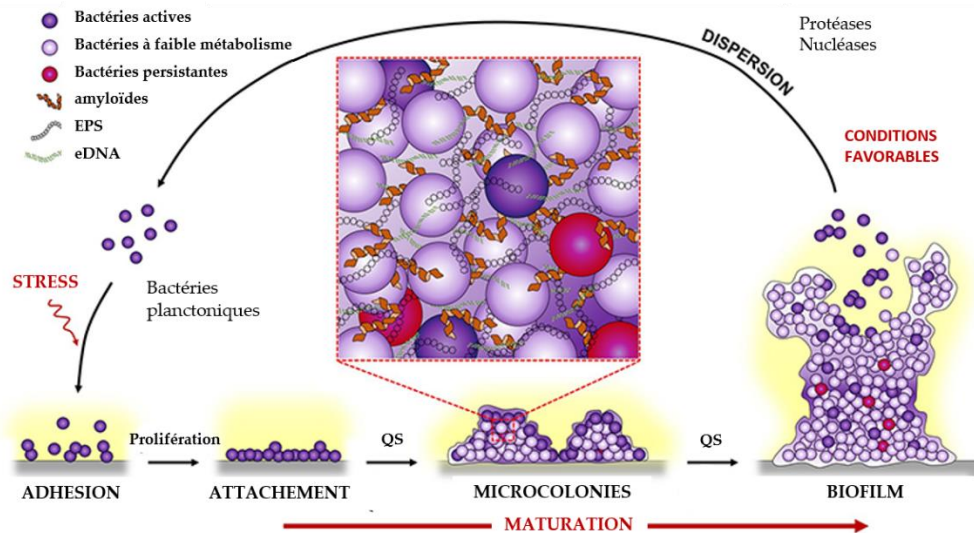


Figure 12. Répartition des principales espèces bactériennes responsables d'infections respiratoires chez les patients CF en fonction de leur âge | Meti S et meti R : méticilline sensible et méticilline résistante. (D'après le Registre français de la Mucoviscidose 2017).

Chez les enfants CF (11-17 ans), *S. aureus* est la bactérie pathogène la plus retrouvée, avec le plus haut taux de prévalence (80%) [91]. Cette bactérie à Gram positif aéro-anaérobie facultative commensale est retrouvée chez l'Homme sur la peau et dans les narines antérieures. Chez les sujets sains, 30 à 50% des individus seraient colonisés par *S. aureus*, notamment par portage nasal [92]. Souvent, le degré de sévérité de son infectiosité peut évoluer avec la production de toxine « leucocytin Pantone-Valentine » (LPV). De plus, la capacité de cette bactérie à former du biofilm<sup>12</sup> et à produire des microcolonies contribue à sa persistance dans les voies aériennes (**Figure 13**) [93]. Les résistances à la méticilline chez *S. aureus* (« Methicilin-resistant *S. aureus* » (MRSA)) ne cessent d'augmenter. Plusieurs études ont démontré que les patients CF infectés par MRSA sont plus souvent hospitalisés et ont besoin d'une consommation plus conséquente d'antibiotiques comparé aux patients infectés par les souches *S. aureus* sensibles à la méticilline (MSSA) [94,95]. Bien que la prévalence diminue en fonction de l'âge du patient, chez l'adulte, le taux d'infection s'élève à plus de 30%. Dans cette catégorie, le taux de patients étant coinfecteds par *S. aureus* et *P. aeruginosa* est plus important [96].

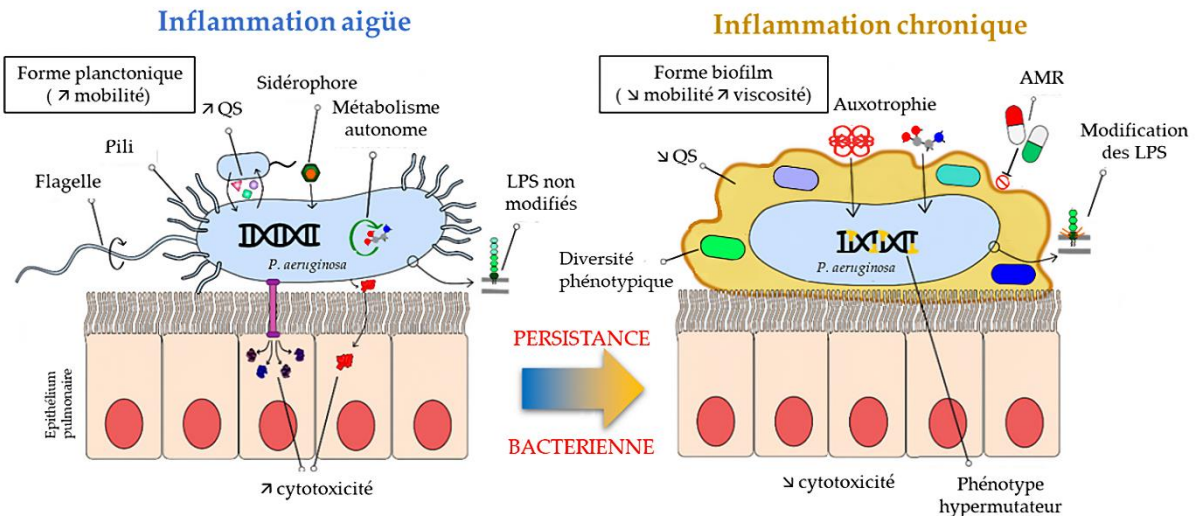
<sup>12</sup> Biofilm : communauté de microorganismes d'une ou plusieurs espèces, souvent symbiotique, adhérant entre eux et à une surface, et productrice d'une matrice adhésive protectrice.



**Figure 13. Les principales étapes et acteurs participant à la formation de biofilm chez *S. aureus* | QS : Quorum sensing. EPS : exo-polysaccharides. eDNA : ADN extracellulaire. (D'après [97]).**

Vers l'âge adulte, *P. aeruginosa* devient l'espèce prédominante. Cette bactérie à Gram négatif ubiquitaire est retrouvée principalement dans les milieux aquatiques et dans le sol. En effet, les sources de contamination de cette bactérie sont généralement des sources environnementales. Elle a été caractérisée pour la première fois en 1892 par Gessard, dans l'article intitulé « On the Blue and Green Coloration of Bandages », où l'auteur décrit une infection bactérienne de couleur bleue/verte (due à la présence de pyocyanine) dans le pus de plaies cutanées [98]. Lorsque ces bactéries contaminent les poumons des patients CF, elles s'adaptent à ce nouvel environnement en régulant des facteurs de virulence. Le niveau de l'inflammation pulmonaire conditionne leur régulation (**Figure 14**). Par exemple, les gènes impliqués dans la synthèse des flagelles, des pili et du « Quorum Sensing »<sup>13</sup> (QS) sont régulés positivement, afin de renforcer l'attachement aux cellules épithéliales dans les voies respiratoires [93]. Puis, leur régulation négative permet à la bactérie de former du biofilm en augmentant la synthèse d'exo-polysaccharides (alginate, PeI et PsI) (**Figure 14**) [99].

<sup>13</sup> Quorum sensing : capacité d'un microorganisme à détecter et à réagir à la densité de population de celui-ci



**Figure 14. Régulation des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* dans l’environnement pulmonaire** | Evolution génétique et phénotypique selon le niveau d’inflammation. QS : Quorum Sensing, LPS : lipopolysaccharides. AMR : « Antimicrobial Resistance ». (D’après [100]).

D’autres bactéries pathogènes (dites minoritaires) participent au développement des infections chroniques chez les patients CF. Parmi elles, *Burkholderia cepacia complex* (*Bcc*) est un genre bactérien qualifié d’émergent chez les patients CF et à l’origine de plusieurs complications. Ces bactéries sont connues pour déclencher le syndrome « *cepacia* », phénomène initialement décrit chez des enfants CF dont les fonctions respiratoires déclinent soudainement tout en étant associés à de la fièvre, une leucocytose ainsi qu’une augmentation de certains marqueurs inflammatoires [101]. Les *Bcc* sont considérées comme étant très virulentes, notamment grâce à la synthèse de pili pour l’attachement cellulaire et de protéases extracellulaires qui engendrent des dommages tissulaires. Ses capacités à former du biofilm et à résister à de nombreux antibiotiques lui confèrent un avantage majeur de survie dans l’environnement pulmonaire des patients CF. Actuellement, les infections causées par ces pathogènes sont souvent associées à une morbidité élevée [93]. Un autre pathogène, *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), est responsable de pneumopathies très difficiles à traiter chez les patients immunodéprimés et ceux hospitalisés en soins intensifs. En effet, cette bactérie est naturellement multirésistante à de nombreux antibiotiques [102]. Les taux de colonisation de *S. maltophilia* chez les patients CF ont augmenté ; leur prévalence actuelle est estimée entre 12 et 30% [93,103]. Les espèces appartenant au genre *Achromobacter*, sont des coques à Gram négatifs qui sont également des pathogènes persistants dans les infections bronchopulmonaires chez les patients CF [93]. Il a été démontré que 6 espèces appartenant à

ce genre sur les 21 existantes représentent 94% des infections à *Achromobacter* chez les patients CF aux Etats-Unis [104]. Leur plasticité génétique leur confère un statut d'hypermutateur, ce qui leur est favorable pour s'adapter et persister dans l'environnement pulmonaire [105]. Au sein de ce dernier, *Achromobacter* peut adhérer aux cellules épithéliales et former aisément du biofilm [106]. Une étude française a révélé que la détection de ces pathogènes dans les expectorations des patients avaient augmenté de 3,1 à 6,7% de 1999 à 2018 [107].

Enfin, l'environnement réduit en oxygène favorise la prolifération de bactéries pathogènes vivant en anaérobie. Leur prévalence est difficilement estimable car peu de ces bactéries sont cultivables en condition de laboratoire. *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, et *Actinomyces* sont les espèces les plus retrouvées [93]. Leur rôle dans la pathologie n'est pas encore bien identifié, bien que quelques études ont démontré que leur présence pouvait favoriser la virulence et la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* [108]. Outre les bactéries, d'autres microorganismes peuvent contribuer au déclin des fonctions respiratoires chez les patients CF.

### 2.3.2. Infections par d'autres pathogènes

Parmi les patients CF, les infections virales sont détectées plus fréquemment chez les enfants. Leur importance est souvent sous-estimée du fait qu'elles soient rarement diagnostiquées et sont difficilement identifiables pour un test donné. Les virus les plus couramment retrouvés sont le virus respiratoire syncytial (VRS), le rhinovirus humain, les virus de la grippe A et B et le virus parainfluenza [109]. D'autres virus comme le métapneumovirus humain, les picornavirus et les coronavirus peuvent être également retrouvés [93].

Concernant les infections fongiques, deux types de champignons peuvent être identifiés dans les expectorations : les levures et les champignons filamenteux. Parmi ces derniers, les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont les plus répandues, avec une prévalence de 78% [110]. Bien que les manifestations cliniques soient souvent asymptomatiques, elles peuvent cependant être à l'origine de complications en déclenchant une aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABA)<sup>14</sup>. Enfin, parmi les levures, les espèces de *Candida* sont

---

<sup>14</sup> ABA: hypersensibilité à l'*Aspergillus fumigatus* dont la manifestation clinique principale est l'asthme

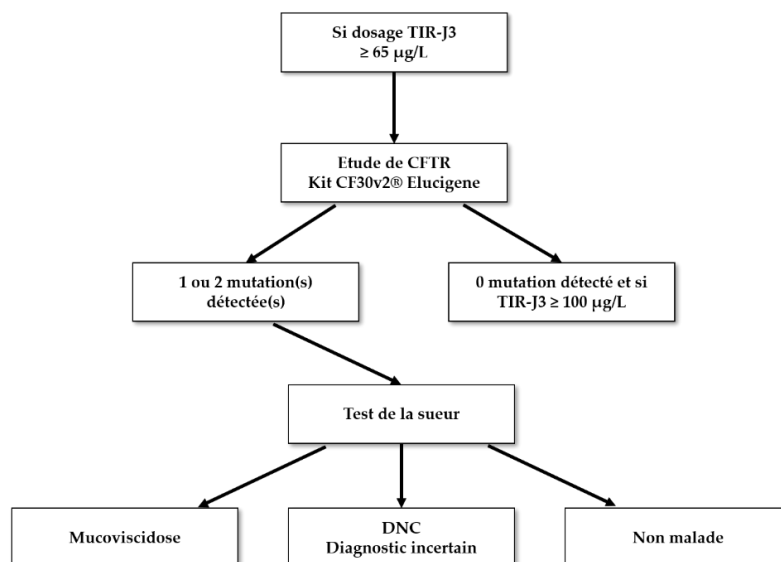
les plus fréquemment isolées des voies respiratoires avec une prévalence de 80 %. Elles peuvent impacter la pathogénicité d'autres microorganismes et ainsi aggraver les manifestations pulmonaires [111]. Cependant, il est difficile d'identifier la source de contamination de ces espèces car elles font parties du microbiote oropharyngé et peuvent migrer accidentellement vers les poumons [93].

## 2.4. Diagnostics et traitements actuels

Les manifestations cliniques chez les patients CF sont très variables d'un patient à l'autre (en fonction des différentes mutations), ce qui complique la mise en place d'un diagnostic précis et apporter, de ce fait, un traitement davantage adapté [112].

### 2.4.1. Dépistage et diagnostic

En France, depuis 20 ans, le dépistage néonatal systématique se fait dans les premiers jours de vie avec le test dit de « Guthrie ». Ce dernier repose sur le dosage de trypsinogène immuno réactives (TIR) à partir d'une goutte de sang. Si les résultats se sont avérés être associés à un dépistage positif, alors la recherche de mutation (Kit Elucigene® CF30v2) et le test de la sueur permettront, s'ils sont positifs également, d'établir le diagnostic.



**Figure 15. Programme de dépistage utilisé chez les patients CF permettant la mise en place du diagnostic clinique** | TIR : trypsinogène immunoréactives. Kit Elucigene® CF30v2: test génétique permettant la détection de 29 mutations. DNC : dépistage non concluant.

#### 2.4.2. Traitements des troubles digestifs

La dénutrition concerne entre 15 et 44% des patients selon plusieurs études. L'administration d'enzymes pancréatiques et l'ajout de vitamines liposolubles sont recommandés chez les patients CF pour lutter contre la malabsorption et l'hypoprotéinémie. Au quotidien, les apports énergétiques doivent être légèrement supérieurs aux apports journaliers classiquement recommandés (de 100 à 140% selon les besoins). En effet, les régimes hypercaloriques sont souvent préconisés avec un enrichissement en éléments nutritifs spécifiques (acides gras essentiels, acides gras saturés et acide docosahexaénoïque)[113].

#### 2.4.3. Traitements des symptômes pulmonaires

La Mucoviscidose étant multiviscérale, divers traitements symptomatiques sont appliqués dans le but de réduire les infections pulmonaires et l'inflammation, augmenter la clairance mucociliaire et renforcer les apports nutritionnels [114]. Les atteintes pulmonaires représentent aujourd'hui la principale cause de mortalité, ce qui a, par conséquent, entraîné le développement de nombreuses thérapies visant à améliorer les capacités respiratoires.

L'antibiothérapie demeure à ce jour la seule thérapie antibactérienne préconisée contre les infections bronchopulmonaires présentes chez les patients CF. Depuis les premiers traitements antibactériens, à savoir un sulfamide (Prontosil ®) et une  $\beta$ -lactamine (pénicilline) en 1934, d'autres antibiotiques ont permis une augmentation considérable de l'espérance de vie. À cette époque, le principal germe pathogène était *S. aureus* et de nombreuses souches étaient encore sensibles à la pénicilline. Depuis, la diversité des pathogènes à l'origine des infections persistantes n'a cessé d'augmenter, tout comme le développement de nouveaux antibiotiques. L'amélioration de leurs méthodes de détection a contribué à une meilleure utilisation des antibiotiques administrables chez les patients, bien que les recommandations actuelles ne suivent pas de consensus prédéfini. L'identification du principal pathogène respiratoire est réalisé par examen cytobactériologique des crachats ou prélèvement de sang. Après cet examen, l'antibiothérapie peut être attribuée aux patients en fonction de leur âge, du statut microbiologique (analyse qualitative et quantitative de la flore d'expectoration, des résistances aux antibiotiques et de l'avancée de l'infection) et de l'état des fonctions respiratoires (**Table 4**).

**Table 4. Liste des antibiotiques les plus couramment utilisés chez les patients CF en fonction du(es) pathogène(s) respiratoire(s) retrouvé(s) | La voie d'administration (VA), la posologie, le spectre d'action (parmi les principales bactéries CF : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia* et *A. chromobacter*) et les effets secondaires sont indiqués pour chacun d'entre eux. IV : intraveineuse GI : gastrointestinal.**

Famille antibiotiques	Antibiotique (VA)	Posologie	Bactéries ciblées	Effets secondaires	
Aminosides	Amikacine (IV)	30 mg/kg/jour	<i>P. aeruginosa</i>	Nephrotoxicité	
B-lactamines	Tobramycine (IV)	10 mg/kg/jour	<i>P. aeruginosa</i>	Ototoxicité, nephrotoxicité	
	Aztréonam (IV)	6 g/jour	<i>B. cepacia</i>	GI, éruptions cutanées	
Glycopeptides	Ceftazidime (IV)	6 g/jour	<i>B. cepacia</i>	GI, éruptions cutanées	
	Dicloxacilline (IV-oral)	50 mg/kg/jour	<i>S. aureus</i>	GI, cholestase	
	Flucloxacilline (oral)	100 mg/kg/jour	<i>S. aureus</i>	GI, cholestase	
	Amoxicilline (+acide clavulanique) (oral)	50-100 mg/kg/jour	<i>S. aureus</i>	GI, éruptions cutanées	
	Imipénem (IV)	2-4 g/jour	<i>Achromobacter species</i>	GI, épilepsies	
	Méropénem (IV)	6 g/jour	<i>Achromobacter species</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i>	GI, éruptions cutanées, hépatite, neutropénie	
	Ticarilline/ clavulanate (IV)	12 g/jour	<i>S. maltophilia</i> , <i>P. aeruginosa</i>	GI, éruptions cutanées, hépatite, neutropénie	
	Triméthoprime / sulfaméthoxazole (IV-oral)	8-10 mg/kg/jour	<i>Achromobacter species</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>B. cepacia</i>	GI, éruptions cutanées	
	Fluoroquinolones	Ciprofloxacine (IV-oral)	0,8-1,5 g/jour	<i>Achromobacter species</i> , <i>P. aeruginosa</i>	GI, épilepsie, tendinopathie
		Lévofloxacine (IV-oral)	500-750 mg/jour	<i>S. maltophilia</i>	GI, épilepsie, tendinopathie
Glycopeptides	Vancomycine (IV)	2 g/jour	<i>S. aureus</i>	Oto/nephrotoxicité, syndrome de l'homme rouge, neuropathie optique/périphérique, myélosuppression	
	Teicoplanine (IV)	10 mg/kg/jour	<i>S. aureus</i>	éruptions cutanées	
Glycylcyclines	Tigécycline (IV)	100 mg/jour	<i>S. maltophilia</i>	GI, cholestase	
	Clindamycine (IV-oral)	20-40 mg/kg/jour	<i>S. aureus</i>	GI	
Lincosamides/Macrolides	Linézolide (IV-oral)	1,2 g/jour	<i>S. aureus</i>	Oto/nephrotoxicité, syndrome de l'homme rouge, neuropathie optique/périphérique, myélosuppression	
	Chloramphénicol (IV)	4 g/jour	<i>B. cepacia</i>	<b>myélosuppression</b>	
Polymyxines	Colistine (IV)	8 mg/kg/jour	<i>P. aeruginosa</i>	Nephrotoxicité, neurotoxicité	
	Acide Fucidique (IV-oral)	25-50 mg/kg/jour	<i>S. aureus</i>	GI	
Protein synthesis inhibitor	Rifampicine (IV-oral)	15-20 mg/kg/jour	<i>S. aureus</i>	GI, hépatite, dyspné	
	Minoscylone (IV-oral)	200 mg/jour	<i>Achromobacter species</i>	GI, photosensibilité	

Les infections à *S. aureus* restent le plus souvent sensibles aux antibiotiques usuels, ce qui permet l'usage d'antibiotiques à large spectre, tels que les B-lactamines (dicloxacilline, flucloxacilline, amoxicilline...), ou à spectre restreint aux Gram positif (acide fusidique, rifampicine...). Les souches MRSA sont principalement traitées via l'utilisation de linézolide ou vancomycine. Concernant les infections à *P. aeruginosa*, le traitement préconisé peut différer selon l'avancement de l'infection (aigüe à chronique). S'il s'agit d'une primo-infection, une bi-antibiothérapie parentérale ( $\beta$ -lactamine/aminoside), prolongée par une antibiothérapie par voie inhalée, permet généralement d'éradiquer le germe et d'éviter le passage à l'infection chronique. Dans ce dernier cas, les périodes d'exacerbation se traitent également par une bi-antibiothérapie parentérale ( $\beta$ -lactamine ou quinolone/aminoside). Plusieurs études ont mis en avant l'intérêt de ces bithérapies pour renforcer l'efficacité thérapeutique des antibiotiques et limiter l'apparition de résistances [115]. Les germes *B. cepacia*, *S. maltophilia* et *A. xylosoxidans* sont quant à eux connus pour leurs résistances naturelles à de nombreux antibiotiques, notamment, à ceux dirigés contre *P. aeruginosa*. L'antibiothérapie doit être définie selon le profil phénotypique des résistances, reconnues par antibiogramme<sup>15</sup>.

D'autres traitements sont associés à l'antibiothérapie lors de la prise en charge des atteintes respiratoires, à savoir les anti-inflammatoires, la kinésithérapie respiratoire, les bronchodilatateurs et les fluidifiants mucolytiques (**Figure 16**).

La kinésithérapie a pour objectif de favoriser l'expectoration des sécrétions bronchiques des patients CF, en pratiquant plusieurs fois par jour des techniques visant à accélérer le flux respiratoire. Elle apporte un effet immédiat et limite possiblement, à long terme, les effets des médiateurs pro-inflammatoires contenus dans les sécrétions muco-purulentes. Ces pratiques peuvent être optimisées par la prise de fluidifiants (sérum hypertonique). Par ailleurs, l'élimination des sécrétions bronchiques est améliorée par l'utilisation de mucolytiques. Parmi ces derniers, la Dornase- $\alpha$ , appelée Pulmozyme<sup>®</sup>, permet d'hydrolyser l'ADN extracellulaire présent dans le mucus, améliorant ainsi les fonctions pulmonaires [116].

La réponse inflammatoire associée aux infections pulmonaires chez les patients CF se manifeste tôt dans la vie, devient persistante et peut, à terme, mener à une bronchiectasie.

---

<sup>15</sup> Antibiogramme : test biologique de laboratoire qui permet de mesurer la résistance bactérienne à un antibiotique

Certains antibiotiques de type aminoside, injectés par voie intraveineuse, peuvent diminuer la réponse immunitaire en dérégulant la production de biomarqueurs de l'inflammation pulmonaire et systémique [117,118]. Par ailleurs, les potentiateurs/correcteurs CFTR et les mucolytiques peuvent avoir des effets bénéfiques sur l'inflammation [119]. L'ibuprofène est actuellement le seul anti-inflammatoire recommandé pour le traitement à long terme de l'inflammation des voies respiratoires ; cependant, moins de 10 % des patients reçoivent ce médicament [120].

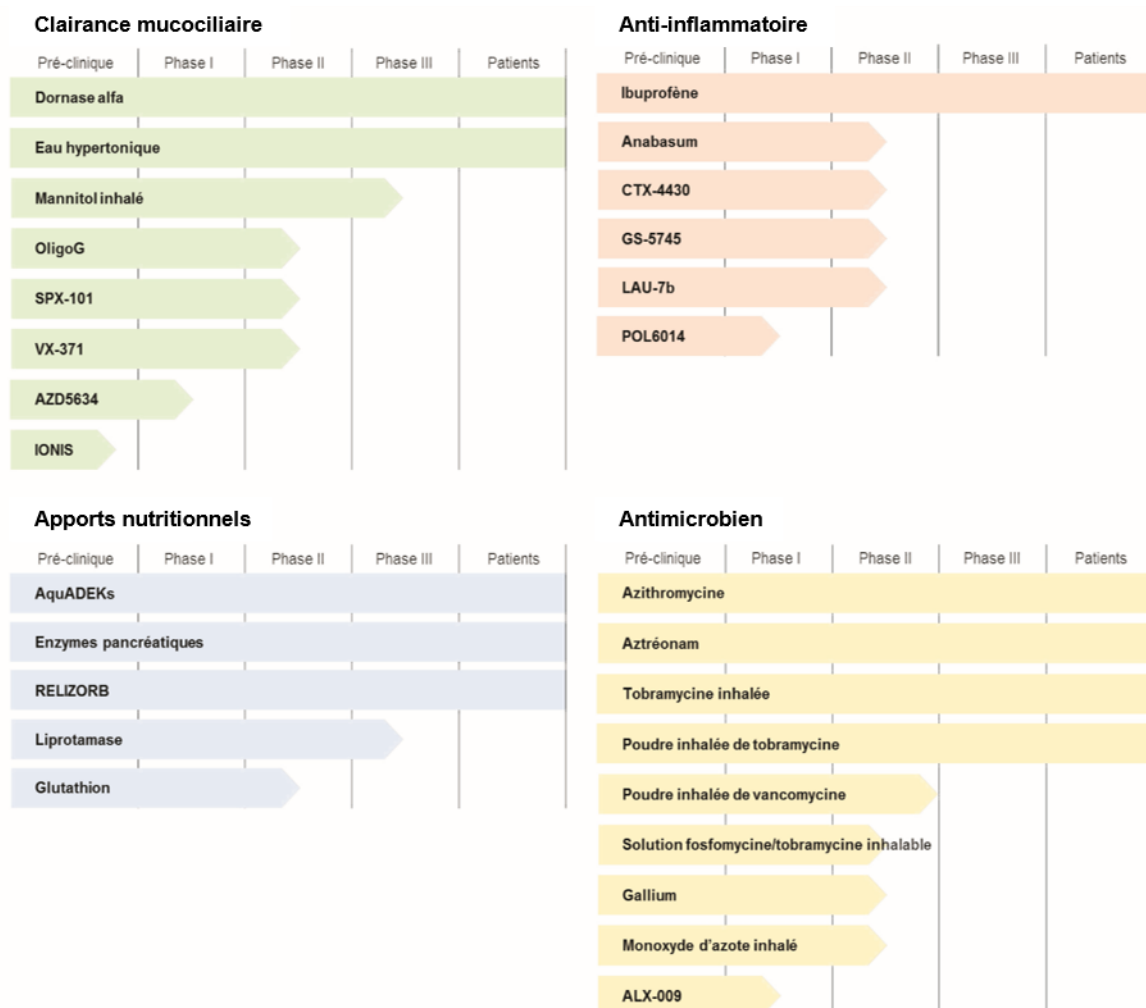


Figure 16. Vue d'ensemble sur les molécules thérapeutiques en cours de développement clinique ou actuellement utilisés chez les patients CF | (D'après <https://apps.cff.org/trials/pipeline>, registre de 2017, Thèse Angélique Mottais).

Bien que la mise en place de l'ensemble de ces thérapies ait augmenté considérablement l'espérance de vie des patients, une greffe pulmonaire peut être requise dans les stades les plus avancés de la maladie, pour lesquels les solutions thérapeutiques sont très réduites. Pendant longtemps, elle était l'ultime recours pour prolonger la vie du patient lorsque celui-ci avait

atteint le stade de l'insuffisance pulmonaire terminale. Cependant, l'émergence de nouveaux traitements, dit « à visée curative », ont récemment prouvé leur intérêt pour restaurer l'activité de la protéine CFTR et ainsi améliorer les fonctions pulmonaires [121].

## 2.5. Emergence de nouveaux traitements

Les traitements actuels administrés chez les patients CF sont principalement symptomatiques. Récemment, des traitements davantage curatifs et de nouveaux agents anti-infectieux ont fait l'objet d'études cliniques prometteuses.

### 2.5.1. Thérapies visant à restaurer l'activité du CFTR

Les traitements émergents à visée curative ont pour but de restaurer la fonctionnalité de CFTR, soit par thérapie de la protéine soit par « médecine génétique ».

#### 2.5.1.1. Thérapie de la protéine

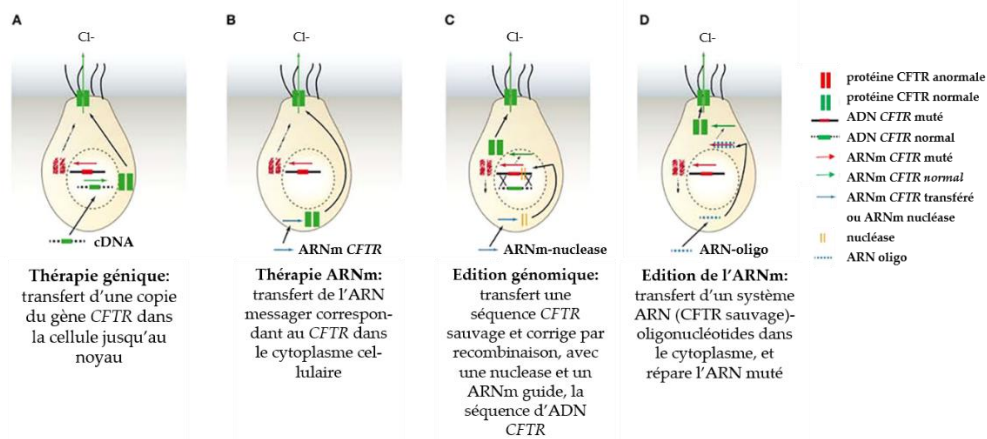
Les thérapies protéiques reposent sur l'utilisation de modulateurs qui sont mutation-dépendants. L'ivacaftor (ou Kalydeco® (VX-770)) agit comme un potentiateur du canal CFTR et permet ainsi d'augmenter la sortie d'ions chlorure par les cellules épithéliales en favorisant la fréquence d'ouverture du canal [122]. Son utilisation est indiquée chez les enfants âgés de 6 ans et plus pour les mutations de classe III. L'utilisation du médicament chez les insuffisants hépatiques sévères n'est pas recommandée et la prise doit être faite en fonction de l'évaluation de la balance bénéfique/risque. L'ivacaftor a permis à des patients portant la mutation G551D d'améliorer leur qualité de vie et leur fonction pulmonaire avec un gain de 10,6% du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) ainsi qu'une diminution des épisodes d'exacerbation [123]. Certains modulateurs sont utilisés en combinaison comme l'Orkambi®, une association d'un potentiateur, l'ivacaftor, et d'un correcteur, le lumacaftor (VX-809). Ce dernier permet d'améliorer l'adressage à la membrane du CFTR et son indication est préconisée pour les mutations où la protéine est anormale mais synthétisée malgré tout [124]. L'Orkambi® est indiqué chez les enfants dès l'âge de 6 ans étant homozygotes F508del afin de rétablir la protéine CFTR à la membrane plasmique et d'accroître sa fréquence d'ouverture. En effet, une augmentation du VEMS de 2,6 à 4% chez 1108 patients bénéficiant du traitement d'Orkambi®

a été montrée [125]. Une des dernières thérapies protéiques mise au point est le Kaftrio®, une trithérapie combinant deux correcteurs, l'élexacaftor (VX-445) et le tezacaftor (VX-661), et un potentiateur, l'ivacaftor. Une amélioration de la fonction respiratoire a été rapportée avec une augmentation du VEMS de plus de 13% [126]. Récemment, plusieurs études ont démontré que les modulateurs pouvaient impacter positivement le statut microbiologique des patients, en agissant, notamment, dans la prévention et la chronicité des infections à *P. aeruginosa* chez les jeunes patients. D'une part, une forte décroissance du taux de positivité pour ce pathogène a été observée après plusieurs mois de traitement avec l'ivacaftor [127]. D'autre part, une étude a également prouvé, après plusieurs années de traitement avec ce modulateur, la proportion de jeunes patients atteints de nouvelles infections a diminué significativement en comparaison avec une cohorte non traitée [128,129]. Par ailleurs, envisager une bithérapie en utilisant ces molécules modulatrices en combinaison avec des antibiotiques pourrait s'avérer pertinent [130]. Le désavantage de la thérapie protéique est son application mutation-dépendante. Les stratégies de « médecine génétique », sont quant à elles mutation-indépendante, et pourraient restaurer les propriétés structures/activités de CFTR pour n'importe quel profil génétique [131].

#### 2.5.1.2. Médecine génétique

Plusieurs stratégies de « médecine génétique » ont été utilisées pour restaurer la quantité de protéine CFTR fonctionnelle. Parmi elles, la thérapie génique et la thérapie de l'ARN messager consistent à transférer des acides nucléiques d'ADN (ou ARN dans le second cas) codant une séquence *CFTR* sauvage. D'autres stratégies visent à corriger la séquence mutée d'ADN à même le génome (ou d'ARN) *CFTR* via une recombinaison avec une séquence sauvage (**Figure 17**) [132,133].

Une première stratégie de « thérapie médecine » a été considérée, à savoir le transfert d'une copie d'un gène *CFTR* sain dans des cellules *CFTR* muté. Ce gène sain peut être apporté à la cellule avec deux types de vecteurs, les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux [134]. Dans le premier cas, des études pré-cliniques ont mis en avant leur fort pouvoir immunogène, ce qui limite leur progression vers les essais cliniques [135].



**Figure 17. Présentation schématique des stratégies émergentes de « médecine génétique » visant à restaurer l'activité de la protéine CFTR** | Description des concepts de base de la thérapie génétique (A), de la thérapie par ARNm (B), l'édition génomique (C) et l'édition de l'ARNm (D). (D'après [133]).

Quant à elles, les méthodes d'édition du génome, telle que la méthode CRISPR/Cas9, ont démontré des résultats encourageants, dans plusieurs études, en restaurant les propriétés du CFTR via l'insertion de la séquence sauvage dans le génome [136–138].

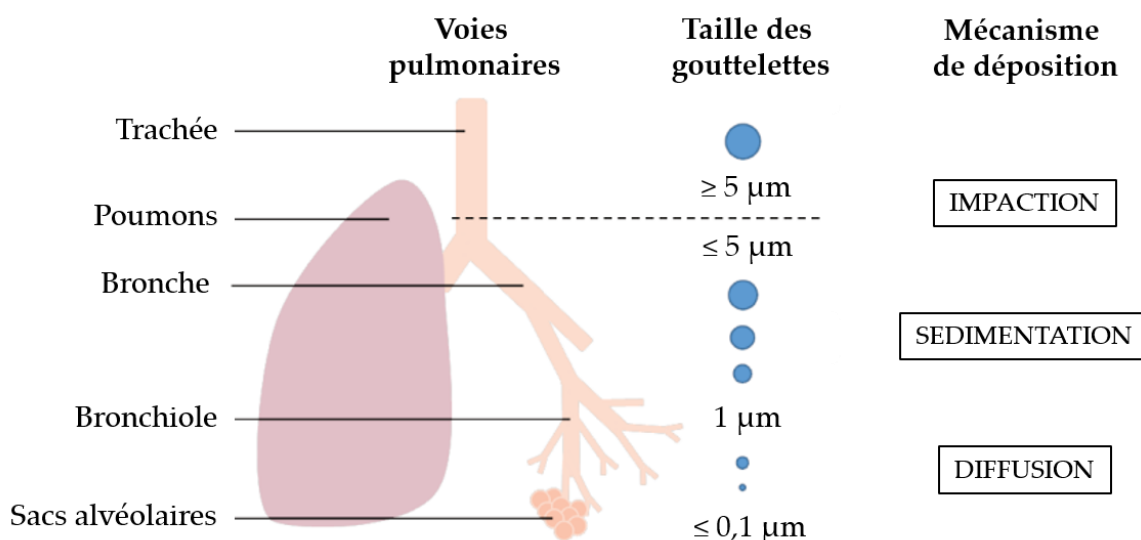
Le développement de molécules utilisées à la fois dans le transfert de gène (« médecine génétique ») et comme antimicrobien, est l'une des thématiques du laboratoire [139,140] et fera l'objet d'une étude détaillée dans la section « Résultats » (Cf Section Résultats, partie II,2.).

### 2.5.2. Thérapies anti-infectieuses

Malgré les bénéfices apportés par les antibiotiques, leur efficacité peut être limitée par le développement de leurs résistances, qui, favorise la persistance bactérienne [141]. De nouvelles stratégies thérapeutiques autres que l'antibiothérapie optimiseraient les traitements par antibiotiques. Par exemple, l'administration par voie intraveineuse de nitrate de Gallium a montré une amélioration des fonctions pulmonaires chez les patients CF [142]. Malgré le développement de ces alternatives, la majorité des traitements antimicrobiens expérimentaux consistent à renforcer l'efficacité des antibiotiques actuels. L'efficacité de ces derniers est optimisée par (i) l'ajout d'adjuvants (vecteurs lipidiques), (ii) leur utilisation en combinaison ou (iii) le développement d'autres modes d'administration (nébulisation) [143].

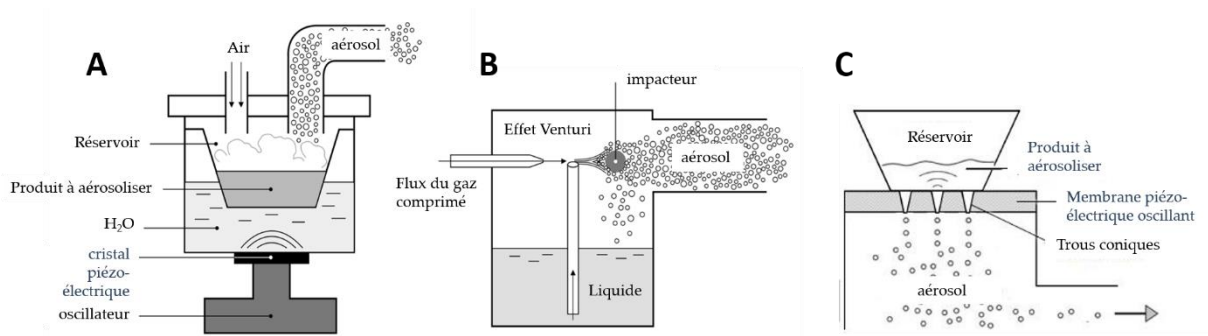
## 2.6. Voies d'administrations alternatives

La nébulisation est une voie d'administration d'agents thérapeutiques de plus en plus étudiée dans le cadre de la Mucoviscidose, du fait qu'elle permet de cibler plus efficacement les voies aériennes, en comparaison à une administration intraveineuse. Elle est associée à une toxicité réduite en raison d'une absorption systémique limitée. Cependant, obtenir une solution aérosolisable nécessite que les microgouttelettes formées soient respirables et d'une taille adaptée pour atteindre la zone d'intérêt. Plus elles seront de petites tailles, plus leur niveau de déposition dans les poumons sera profond. Les microgouttelettes de grandes tailles ( $\geq 5 \mu\text{m}$ ) se déposent par impaction, celles à tailles intermédiaires ( $1-5 \mu\text{m}$ ) par sédimentation et celles de petites tailles ( $<1 \mu\text{m}$ ) par diffusion (**Figure 18**).



**Figure 18. Mécanismes d'assimilation des particules aérosolisées en fonction de la taille des microgouttelettes formées** | (Source : Thèse Angélique Mottais, d'après [144])

Par ailleurs, les forces exercées par le processus d'aérosolisation peuvent altérer les propriétés physico-chimiques des molécules testées. Ainsi, le choix du système d'aérosol s'avère également un point critique sur la qualité de l'aérosolisation [145]. Schématiquement, on distingue trois types de nébuliseurs : les ultrasoniques, les pneumatiques, et les tamis vibrants (**Figure 19**).

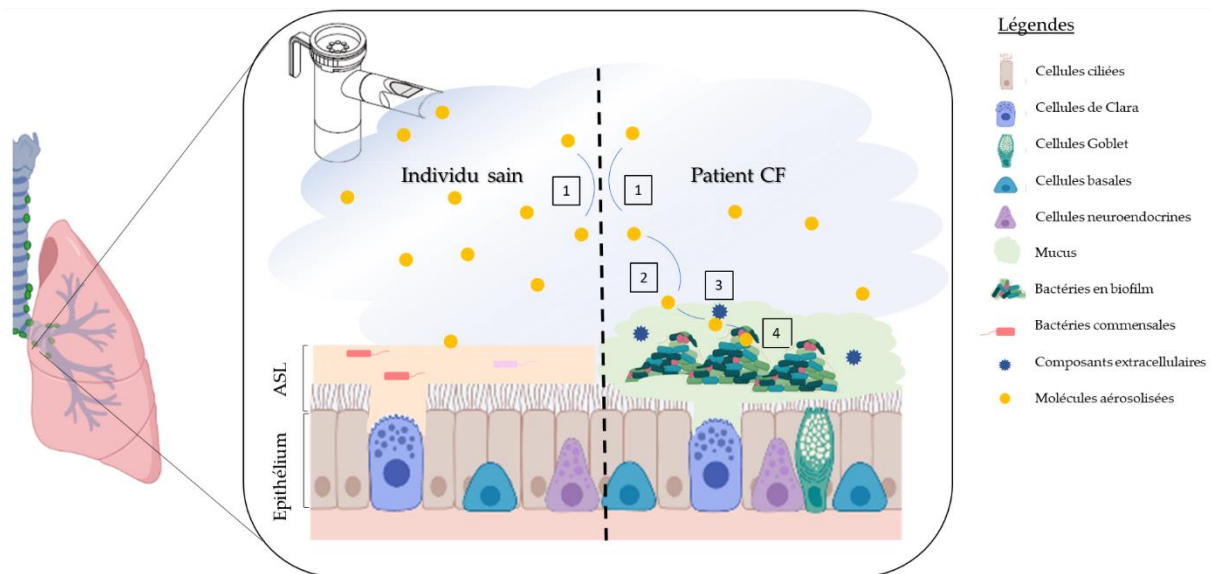


**Figure 19. Processus d'aérosolisation selon différents systèmes** | Les trois principaux sont : l'ultrasonique (A), le pneumatique (B) et le tamis vibrant (C). (D'après [145]).

Le premier utilise un générateur à ultrasons faisant vibrer un cristal piézoélectrique ou quartz. Les vibrations génèrent ensuite de fines gouttelettes à la surface de la solution médicamenteuse qui sont transmises via un système de ventilation. Les nébuliseurs pneumatiques, quant à eux, aspirent le liquide par effet Venturi, pour qu'il soit ensuite projeté sur un impacteur et redispersé sous forme de microgouttelettes de toutes tailles. Enfin, les nébuliseurs à tamis vibrants reposent sur le passage du liquide au travers d'une membrane micro-perforée et génère ainsi des particules de taille homogène.

De façon général, plusieurs facteurs peuvent limiter l'efficacité d'un aérosol d'agents antimicrobiens. Premièrement, lors du processus d'aérosolisation, les molécules doivent résister aux forces de cisaillement. Ensuite, une fois arrivées dans les voies respiratoires, elles sont confrontées à la présence de différents facteurs environnementaux. Elles doivent se déposer jusqu'au liquide interstitiel pulmonaire (ASL), composé, chez un patient CF, principalement de mucus visqueux et de biofilm. Les molécules devront franchir ces barrières physiologiques extracellulaires bronchopulmonaires qui englobent les bactéries ciblées pour agir, *in fine*, sur celles-ci (**Figure 20**).

Ensemble, ces paramètres forment les principales limites d'une application par aérosol d'agents médicamenteux dans le cadre de la Mucoviscidose.



Potentiels limites rencontrés lors d'un aérosol à visée antimicrobienne

- 1 Forces physiques   
 2 Adhésion au mucus   
 3 Diffusion dans le mucus   
 4 Internalisation dans le biofilm

**Figure 20. Principales limites observées lors d'une administration pulmonaire d'agents antimicrobiens par aérosolisation chez les patients CF | ASL : « Airway Surface Liquid ». (Biorender ®)**

### 2.6.1. Aérosolisation d'agents anti-infectieux

Les antibiotiques délivrés par aérosolisation ont pour avantage d'atteindre directement les zones colonisées par du biofilm et avec des concentrations intrapulmonaires très élevées et peu d'effets secondaires systémiques associés [141]. Certaines études ont mis en avant que les traces d'antibiotiques retrouvés dans les crachats des patients pouvaient être 100 fois plus concentrés lorsqu'ils sont administrés par aérosol en comparaison avec une administration intraveineuse (**Table 5**) [141,146].

**Table 5. Les différents antibactériens formulés et utilisés sous forme d'aérosol en clinique** | Les formulations sont administrables par aérosolisation de solution ou de poudre. Le dosage correspond à la quantité de produit administré par cycle d'aérosol, avec comme indiquée, une fréquence d'administration précise. (D'après [141]).

Antibactérien	Formulation (NPs)	Dosage, fréquence	Application (spectre)
Aztréonam ( Cayston® )	Solution (Lysine)	75 mg, 3 fois/jour	Approuvé ( <i>P. aeruginosa</i> )
Tobramycine ( TOBI® )	Solution	300 mg/5 mL, 2 fois/jour	Approuvé ( <i>P. aeruginosa</i> )
Tobramycine ( TIP® )	Poudre	112 mg, 2 fois/jour	Approuvé ( <i>P. aeruginosa</i> )
Colistine (ColiFin®)	Poudre et solution	1 Mio. U.I.	Approuvé ( <i>P. aeruginosa</i> )
Colistiméthate sodique ( Colobreathe® )	Poudre	1662500 IU, 2 fois/jour	Approuvé ( <i>P. aeruginosa</i> )
Amikacine ( Arikace® )	Solution (liposomal)	590 mg, 1 fois/jour	Approuvé ( <i>Mycobacterium NT</i> )
Levofloxacine ( Quinsair™ )	Solution	240 mg	Approuvé ( <i>P. aeruginosa</i> )
Levofloxacine ( Aeroquin® )	Solution	240 mg, 2 fois/jour	Phase III, NCT01180634
Vancomycine (AeroVanc®)	Solution	250 mg/5mL, 2 fois/jour	Phase II, NCT01594827
Denufosal tetrasodium	Solution	60 mg	Phase III, NCT00625612
Bactériophage (AP-PA02)	Solution	nd	Phase I/II (NCT04596319)
Citrate de gallium (AR-501)	Solution	nd	Phase II (NCT03669614)

Le Cayston® correspond à une formulation de l'aztréonam avec de la lysine pour inhalation, et est disponible comme traitement dans les infections CF par *P. aeruginosa*. Ses effets bénéfiques ont pu être relevés lors de plusieurs essais cliniques. En effet, des améliorations dans les symptômes respiratoires, la fonction pulmonaire et les analyses microbiologiques ont été rapportées chez des patients ayant reçu auparavant, ou non, un traitement de tobramycine inhalable [147,148]. Ces effets n'ont en revanche pas été observés chez les patients infectés par *B. complex* [149].

Par ailleurs, une étude randomisée subséquente de phase II, portant sur 151 patients porteurs de *P. aeruginosa*, a démontré que le traitement par inhalation de lévofloxacine pendant 28 jours a entraîné une augmentation des capacités respiratoires (VEMS de 8,7 %) [150]. La tobramycine peut être utilisée par inhalation soit à partir d'une solution (TIS ou TOBI) soit à partir d'une poudre (TIP). Cette dernière présente l'avantage de pouvoir être administrée très rapidement et efficacement à l'aide d'un dispositif d'inhalation « podhaler™ ». Dans l'essai EVOLVE de phase III, le TIP a considérablement amélioré le VEMS, réduit la densité des expectorations de *P. aeruginosa* et réduit l'hospitalisation liée aux voies respiratoires [151]. L'efficacité du TIP a été comparée à celle du TIS dans un essai clinique et ne semble pas être différente au niveau des augmentations du VEMS et des taux d'hospitalisations [152].

La colistine peut également être délivrée sous forme de poudre sèche, le Colobreathe®, est une formulation de poudre sèche encapsulée (1 capsule inhalée = 1 dose nébulisée) administrée à

l'aide d'un inhalateur portatif (Turbospin®). Son utilisation a été comparée à celle du TIS et ne semble pas avoir apporté plus de bénéfices à celle-ci [153]. L'amikacine liposomale inhalée, aussi appelée Arikace®, contient de fortes concentrations d'amikacine aqueuse soluble dans l'eau, enfermé dans un liposome. Sa forme liposomale lui confère une meilleure biodistribution et une meilleure capacité à traverser les barrières biologiques tels que le mucus et le biofilm [154]. Des études de phase I ont été réalisées chez 24 patients atteints de Mucoviscidose chronique à *P. aeruginosa* qui ont reçu une dose de Arikace® par inhalation (LC Star®, Pari) une fois par jour pendant 14 jours [24]. Une augmentation du VEMS% a été observée dans le temps, toutefois, aucune réduction de densité bactérienne dans les expectorations n'a été constatée. Des études de suivi de phase II ont ensuite été réalisées en utilisant l'Arikace® à doses multiples. Dans l'ensemble, le traitement était bien toléré et une augmentation du VEMS a pu être démontrée, et ce, même sur le long terme. La fréquence moyenne des expectorations de *P. aeruginosa* a également diminué de façon significative [155]. Des antibiotiques inhalables dirigés contre *S. aureus*, telle que la vancomycine (AeroVanc®), sont actuellement en cours d'évaluation (NCT01594827).

Des essais cliniques sont en cours pour traiter les infections bronchopulmonaires des patients CF par aérosolisation de molécules antimicrobiennes autres que les antibiotiques. C'est le cas notamment du citrate de gallium (AR-501, NCT03669614), de bactériophages (AP-PA02, (NCT04596319) et BX004-A, Biomx), de peptide antimicrobien (ALX-009, Alaxia). D'après la littérature, l'oxyde nitrique (ON) (RESP301, NCT05101915).

### 2.6.2. Aérosolisation d'autres molécules thérapeutiques

En plus des antibiotiques, l'utilisation de l'aérosol comme voie d'administration peut être appliquée pour divers agents thérapeutiques. Elle permet de délivrer efficacement des agents améliorant la clairance mucociliaire (mucolytiques et solutions hypersalines), des anti-inflammatoires, des enzymes pancréatiques et des vitamines [156].

En conclusion, la complexité de la pathologie donne lieu à la mise en place de traitements divers pour réduire les différents symptômes évoqués précédemment. Il est souvent intéressant d'utiliser des combinaisons de traitements, comme les antibiotiques en trithérapie pour ralentir le déclin des fonctions pulmonaires. Cependant, avoir recours à l'antibiothérapie

comme unique stratégie antimicrobienne peut s'avérer parfois être insuffisant pour traiter durablement les infections bactériennes. D'autres alternatives anti-infectieuses pourraient remédier aux infections pulmonaires en élargissant le choix de molécules antimicrobiennes et en diversifiant leurs mécanismes d'action.

### III. Potentielle application de la PDT comme stratégie antimicrobienne dans le cadre de la Mucoviscidose

---

#### 1. PDT et pathogènes pulmonaires

Chez les patients CF, le microenvironnement pulmonaire forme un milieu propice à la prolifération de divers microorganismes (Cf Section Introduction, Partie II. 2.3). Pour s'adapter à cet environnement, ces pathogènes évoluent en formant des biofilms polymicrobiens [109,157]. Le développement d'une stratégie à large spectre comme la PDT (grâce aux multiples sites d'action des ROS) serait pertinent afin d'éviter le recours à un large panel de molécule comme pour l'antibiothérapie.

##### 1.1. Action contre les bactéries d'intérêt

La liste de microorganismes sensibles à la PDT comprend des espèces bactériennes avec des niveaux de résistances aux antibiotiques élevés (Cf Section Introduction, partie I, 2.3.) pouvant être retrouvées chez les patients CF. La plupart des expériences réalisées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de PDT antimicrobienne utilisent des souches bactériennes standards (type ATCC) qui ont l'avantage d'être caractérisées génotypiquement et phénotypiquement, contrairement aux souches issues d'échantillons cliniques. *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont, dans ces études, les seules espèces bactériennes à avoir été isolées de patients CF (**Table 6**). Multiplier les études sur divers isolats cliniques serait pertinent car il a été démontré que leur phénotype virulent et leur capacité à former du biofilm peuvent leur conférer une sensibilité moindre à la PDT [158,159]. Cette dernière s'est avérée être efficace également sur de nombreuses espèces anaérobies pathogènes – *Fusobacterium*, *Petrovella*, *Porphyras*, *Propionibacterium* – retrouvées dans la flore buccale [160]. Ces espèces sont les mêmes que celles retrouvées dans les expectorations de certains patients CF. Cependant, leur présence dans les poumons de ces patients reste controversée car le risque de contamination des expectorations par des sécrétions oropharyngées lors du prélèvement n'est pas négligeable [93].

**Table 6. Liste des espèces microbiennes d'intérêt\* ayant déjà fait l'objet d'étude de PDT** | \* Elles correspondent aux principaux microorganismes qui sont propices au développement d'infections pulmonaires chez les patients CF. PS : MB : Bleu de méthylène», TBO : Bleu de toluidine O, RB : rose bengale, TMP : meso-Tetra(N-méthyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate, ALA : Acide aminolévulinique.

	Genre, espèce (identification)	PS (dose)	Traitement lumineux (dose)	Références
Bactéries	<i>S. aureus</i> (CF)	Hypocrellin B (0.5–2.5 µM)	LED 470 nm (0.3 J/cm <sup>2</sup> )	Jiang et al. 2013
		Ruthénium(II) complexes (25µM)	LED 450 nm (4 mW/cm <sup>2</sup> )	Le Gall et al. 2018
	<i>P. aeruginosa</i> (CF)	diaryl-porphyrins (10 µM)	410 nm light (20 J/cm <sup>2</sup> )	Orlandi, V.T et al., 2019
		TMP (2,5 mg/mL) / TBO (0.025 mg/mL)	635 ± 25 nm (100 mW/cm <sup>2</sup> )	Donnelly RF. et al. 2007
		MB / TMB (0,05-0,25 µg/mL)	635 ± 10 nm (100-200 J/cm <sup>2</sup> )	Cassidy C.M. et al. 2010
		TBO (10µM)	630 nm (90 J/cm <sup>2</sup> )	Tseng S.P. et al., 2009
		MB (0,6-400 µM)	650 nm (23 J/cm <sup>2</sup> )	Hendiani S. et al., 2019
	<i>M. abscessus complex</i> (non CF)	ALA (30-100 µg/mL)	LED light (635 nm, 80 J/cm <sup>2</sup> )	Yue C. et al., 2022
		ALA (100 µg/mL)	585–635 nm (0–160 J/cm <sup>2</sup> )	Wang X et al., 2022
		Porphyrins (0,013-30,40 µM)	370–800 nm (270 J/cm <sup>2</sup> )	Guterres KB. et al., 2020
		AgTMeP (3-7 nM)	LED 400-800 nm (90 J/cm <sup>2</sup> )	Guterres KB. et al., 2022
	<i>Bcc</i> (non CF)	MB / TMP (0,5 mg/mL)	Paterson lamp, 635 nm (200 J/cm <sup>2</sup> )	Cassidy C.M. et al., 2012
		Curcumine (50µM)	425 nm (16 mW/cm <sup>2</sup> )	Hu J. et al., 2018
	<i>S. maltophilia</i> (non CF)	Chlorophylle (15µM)	LEDs 402 (42 mW/cm <sup>2</sup> ) et 440 nm (44 mW/cm <sup>2</sup> )	Buchovec I. et al., 2022
Anaérobies (non CF)	Beaucoup d'études en dentisterie		Gursoy H et al., 2013	
Fungi	<i>Scedosporium spp.</i> (non CF)	MB (8 µg/mL)	635 ± 10 nm (12 J/cm <sup>2</sup> )	Lu Q. et al. 2017
	<i>Aspergillus spp</i> (non CF)	RB, TBO (31-125µM)	nd	Kim JR, Michielsen S. 2015
	<i>Candida spp</i> (non CF)	Zinc phthalocyanine	640 ± 20 nm (13.9 mW/cm <sup>2</sup> )	Prandini JA. et al., 2022
Virus	<i>Influenzae</i> (non CF)	Psoralens	UV	Nakashima K. et al., 1979
		Chlorin-e6 (3,8 µg/mL)	671 nm (15 J/cm <sup>2</sup> )	Jeong H et al., 2020

## 1.2. Action contre les autres pathogènes

Les infections bactériennes peuvent être associées à des contaminations virales et/ou fongiques [109]. Les parois chitineuses des champignons ne semblent pas prévenir l'effet de la PDT. Dans le cas de la PDT antivirale, certaines études ont mis en avant que cette stratégie est efficace sur divers types de virus, nus comme enveloppés, à ADN comme à ARN [15]. Dans le cas des infections virales chez les patients CF, les virus *influenza* sont particulièrement présents. Récemment, une méthodologie pertinente de prophylaxie et de traitement à l'échelle *in vivo* a été décrite en utilisant une PDT dirigée contre ces virus (**Table 6**). Les résultats ont démontré que le traitement peut déjouer les limites des agents antiviraux actuels en agissant d'abord sur l'inhibition de l'internalisation des virus dans les cellules de l'hôte puis sur l'activité antivirale [161].

## 2. L'application de PS dans les voies pulmonaire

### 2.1. Administration du PS

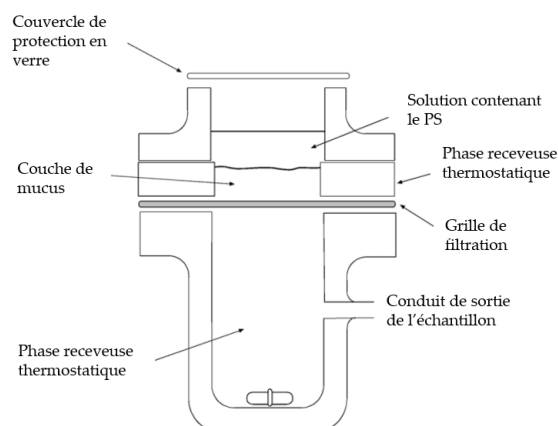
L'administration de PS et de la lumière sont deux défis majeurs pour une application PDT dans les interstices, et tout particulièrement, dans les voies pulmonaires. Dans ce cas, la voie systémique peut être envisagée comme mode d'administration du PS. Cependant, administrés par voie intraveineuse, ces molécules pourraient atteindre les poumons dans des quantités trop faibles. Cependant, si la dose utilisée est augmentée pour pallier à ce problème, des effets systémiques indésirables, tels que la photosensibilité, pourraient survenir [162]. L'aérosolisation de PS est actuellement l'une des alternatives à cette problématique, bien qu'elle soit peu de fois évoquée dans la littérature. En 2011, une étude pilote a été menée afin d'évaluer les capacités d'une solution de MB à générer des microgouttelettes avec un système pneumatique PARI TurboBOY® [159] (**Figure 21**). Généralement, avec ce nébuliseur, les antibiotiques aérosolisés chez les patients CF mesurent entre 3 et 5  $\mu\text{m}$ , un diamètre optimal pour permettre une administration ciblée dans les bronches. Les particules de MB générées dans cette étude sont de diamètre similaire. Une seconde étude vient compléter cette première, en analysant la capacité de trois PS (Vert d'indocyanine (ICG), Photodithazine® et Photogem®) à être délivrés via le système pneumatique CompA.I.R™ NE-C801 (Omron) (**Figure 21**). Le diamètre des gouttelettes générées par ce nébuliseur est de 9  $\mu\text{m}$  en moyenne, peu importe le PS testé [162]. L'aérosolisation de PS utilisés lors de cette thèse a fait l'objet d'une étude préliminaire résumée dans la section « Résultats » (Cf Section Résultats, partie I, 2.).



**Figure 21. Nébuliseurs utilisés pour l'aérosolisation de PS** | À gauche : PARI TurboBOY® (Pari) et à droite : CompA.I.R.™ NE-C801 (Omron)

## 2.2. Compatibilité physiologique

Au vu des données actuelles de la littérature, il est difficile d'évaluer la compatibilité de la PDT dans les conditions physiopathologiques retrouvées dans les voies respiratoires de patients CF. Une étude a été réalisée au cours de cette thèse afin d'évaluer la tolérance à la PDT en prenant en compte l'impact du microenvironnement pulmonaire (Cf Section Résultats, partie I, 1.1). Le mucus et le biofilm sont deux barrières physiologiques particulièrement problématiques pour traiter efficacement les infections pulmonaires. Donnelly et al. ont déterminé, à l'aide d'un dispositif de cellule de Franz, la capacité de plusieurs PS (TMP et TBO) à traverser une couche de mucus artificiel (**Figure 22**). Les résultats ont démontré que seulement 25 à 47% des PS étudiés peuvent diffuser dans ce milieu mimant le mucus pulmonaire de patients [164].



**Figure 22. Exemple de dispositif « cellule de Franz » permettant d'étudier la diffusion de molécules thérapeutiques à travers une couche de mucus** | (D'après [165]).

Ces chiffres attestent de la nécessité de formuler ces PS sous forme de nanoparticules (NP) avec des adjuvants leur permettant de diffuser plus efficacement à travers cette barrière. Par exemple, le chitosan<sup>16</sup>, l'acide poly(acide lactique-co-glycolique (PLGA) et le polyéthylène glycol (PEG) ont facilité la diffusion de 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (THPP) au travers du mucus gastrointestinal sécrété par des cellules HeLa [166,167]. D'autres formulations incluant notamment la mucine elle-même, peuvent permettre aux PS de mieux pénétrer dans le mucus [168].

Alternativement, une stratégie combinatoire PS/mucolytique (hypéricine/N-acétylcystéine (NAC)) peut booster les effets antibiofilms de la PDT [169]. La NAC, en plus de ses effets mucolytiques et antibiofilms [170,171], pourrait également jouer un rôle d'antioxydant et photo-stabilisateur en « détoxifiant » les ROS produits par la PDT. Plusieurs études confirment cette hypothèse en montrant qu'un pré-traitement à la NAC entraîne une meilleure tolérance cellulaire à la phototoxicité liée à la PDT [172,173]. Ce résultat intéressant serait le fruit d'une stimulation d'un antioxydant intracellulaire (le glutathion) par la NAC [174].

La deuxième matrice à franchir, à savoir le biofilm, est connue pour diminuer drastiquement l'efficacité des antibiotiques dans le cadre des infections bronchopulmonaires [175]. L'une des stratégies potentielles pour réaliser une PDT antibiofilm est de formuler les PS avec des polymères neutres (silice ou copolymères amphiphiles P123) ou chargés positivement (Polyéthylèneimine (PEI)) [176–178]. Les formulations de PS incluant des liposomes cationiques sont également intéressants pour faciliter la pénétration du PS au sein du biofilm [179].

Chez les patients CF, en plus de ces barrières, le degré de destruction parenchymateuse et de bronchiectasie dans les poumons modifie considérablement la distribution et la biodisponibilité pulmonaire d'agents nébulisés [158].

---

<sup>16</sup> chitosan : polyoside composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée en β- et de N-acétyl-D-glucosamine

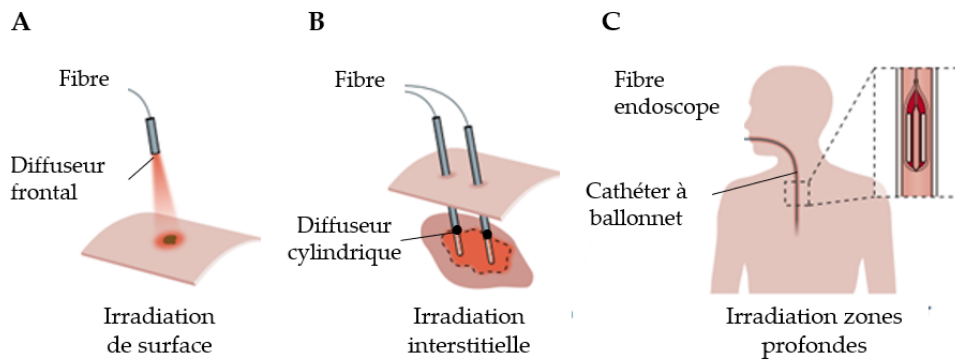
Par ailleurs, les antibiotiques relativement perméables à haut taux d'absorption, comme les fluoroquinolones (FQ), ne présentent pas plus d'avantage à être administré dans les poumons en comparaison avec les autres modes d'administration couramment utilisés (oral ou intraveineux).

Les antibiotiques formulés ont un taux d'absorption moins important. Ainsi, le temps de résidence pulmonaire est plus long et permet d'obtenir un effet antimicrobien plus longtemps [159]. Dans le cas des PS, le taux d'absorption et le temps de résidence, sont des constantes difficilement anticipables au vu des rares études analysant leurs caractéristiques pharmacologiques.

Cependant, en général, les PS sont des molécules relativement hydrophobes, ce qui pourraient sous-entendre, qu'ils pourraient être sujet à un phénomène de bioaccumulation. Peu d'études, en comparaison avec les antibiotiques, attestent de leur innocuité et leur biodistribution dans un modèle animal [180].

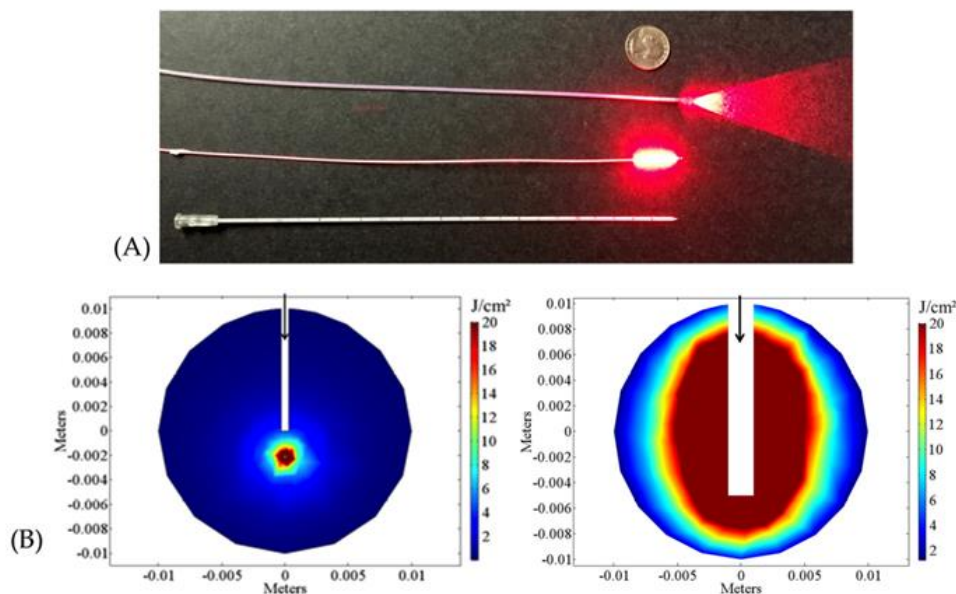
### 3. Délivrance de la source lumineuse

L'efficacité de la PDT dépend de la dosimétrie, du temps d'exposition et du mode d'administration de la lumière [28]. La délivrance de la lumière dans les interstices comme les voies pulmonaires peut nécessiter la mise au point de systèmes pour cibler efficacement les voies respiratoires basses [71]. Par exemple, la délivrance de la lumière par laser peut être améliorée par couplage avec des fibres à bout franc pour des applications cutanées. Des cylindres de diffusion ou des lentilles sont adaptées pour élargir considérablement la zone d'illumination aux extrémités de la fibre (300-380°) [181]. Dans les essais cliniques appliqués au cancer de l'œsophage, des fibres endoscopiques avec un cathéter à ballonnet sont d'avantage appropriées pour illuminer la zone d'intérêt (**Figure 23**) [31].



**Figure 23. Différents systèmes de couplage de fibres optiques utilisés pour des applications de PDT** | Les fibres sont couplées à (A) des diffuseurs frontaux pour les applications de surface, (B) des diffuseurs cylindriques pour cibler les interstices et (C) des cathéters à ballonnet pour atteindre les voies respiratoires/digestives [18]

Récemment, des simulations informatiques ont suggéré que les fibres avec diffuseurs cylindriques sont plus efficaces que les fibres coupées à plat pour délivrer la lumière thérapeutique (**Figure 24**) [182].



**Figure 24. Différents systèmes de fibres optiques existants permettant la réalisation d'une PDT dans les poumons** | (A) Du haut vers le bas : fibre à bout franc, fibre couplée à une lentille et système de cathéter transparent. (B) Différence de diffusion lumineuse entre une fibre à bout franc et une fibre couplée à un cylindre diffusant [71].

Une méthode tridimensionnelle de visionnage couplée au système d'illumination permettrait de mieux cibler les zones d'intérêt et, de ce fait, optimiserait l'effet PDT en réduisant les dommages collatéraux sur les régions environnantes [31]. D'autres sources d'excitation profonde peuvent également être utilisées, comme le rayonnement proche IR ou encore les rayons X. Par ailleurs, les sources alternatives aux ondes photoniques, comme les

rayonnements de Tcherenkov et les systèmes « auto-inductibles » activés par des mécanismes chimio-luminescents et bioluminescents, permettent d’exciter les PS [28,183].

Plusieurs paramètres peuvent limiter la délivrance de la lumière dans les voies respiratoires : la largeur de la trachée (limiter à 1,5 mm pour un modèle murin), la diffusion de la lumière dans le poumon (nécessité d’un diffuseur), le temps d’illumination (s’il y a un échauffement) et l’intensité lumineuse.

#### 4. Evaluation *in vivo*

Plusieurs modèles de petits animaux ont été utilisés pour appliquer une PDT antimicrobienne pulmonaire. Actuellement, quelques études *in vivo* ont été réalisées avec des LED et des fibres optiques comme mode d’illumination (**Table 7**). Par ailleurs, un modèle murin infecté (pneumonies) a été optimisé avec des systèmes intra et extracorporels [73,83,184]. Dans le cas d’une PDT *in vivo* sans effet observé, il peut s’avérer complexe de savoir si l’inefficacité du traitement dans les poumons n’est pas due à un défaut d’optimisation dans la délivrance du PS, de la lumière ou les deux.

**Table 7. Exemples d’études *in vivo* utilisant la PDT pour traiter des pathologies pulmonaires** | ICG : Indocyanine green

Modèle	PS + paramètres d’illumination	Résultats	Référence
<i>Cancers pulmonaires</i>			
Souris (xenogéffe)	Phthalocyanine + nd	Diminution de la taille de la tumeur	Dong, W. et al., 2021
Souris (DA3Hi, adénocarcinome)	Hypericine + Lampe (lumière visible) (60 J/cm <sup>2</sup> )	Necrose tumorale + réaction inflammatoire	Blak M. et al., 2000
Souris (modèle carcinome de Lewis)	Photofrin® + Laser couplé à une fibre optique (630±10 nm ; 80–90 mW/cm <sup>2</sup> )	Augmentation de l’expression du complément	Merchant S. et al., 2010
<i>Applications antimicrobiennes</i>			
Souris (BALB/c, étude de tolérance)	ICG + Laser couplé à une fibre + système extracorporel (808 nm)	Bonne tolérance du traitement (modèle non infecté)	Kassab G. et al., 2020
Souris (SKH-1, modèle pneumonie)	ICG + LED, illumination extracorporelle (780 nm)	Eradication bactérienne (taux de survie: 100%)	Geralde M. et al., 2017

En conclusion, cette thèse a pour objectif de répondre à la problématique suivante : La PDT est-elle une stratégie antimicrobienne pertinente dans le cadre des infections

bronchopulmonaires chez les patients atteints de Mucoviscidose ? Pour répondre à cela, plusieurs études ont été réalisées au cours de cette thèse. Nous avons pris pour exemple les limites de l'antibiothérapie actuelle chez ces patients. Parmi elles, le microenvironnement pulmonaire, très particulier dans le cas de cette pathologie, fait intervenir de nombreux dérèglements physiologiques.

Ces variations seront prises en compte dans un premier temps. Ensuite, une étude préliminaire visant à mettre en place une application chez l'animal a été réalisée. Dans une dernière partie, la compatibilité de la PDT avec d'autres thérapies a été étudiée.

# RESULTATS

---

## I. Evaluation de complexes de Ruthénium(II) comme PS dans le cadre des infections bronchopulmonaires

---

Dans l'étude réalisée par Le Gall T. et ses collègues en 2018 [185], un criblage de complexes du Ruthénium(II) en tant que PS antimicrobiens a été réalisé contre des souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Cette étude a permis d'identifier des PS d'intérêt sur la base de leur phototoxicité pour réaliser les travaux suivants. L'objectif est d'évaluer leur efficacité comme agents PDT en faisant varier individuellement les paramètres physiologiques du microenvironnement pulmonaire chez les patients CF.

### 1. Pertinence de la PDT dans le contexte physiopathologique








Le microenvironnement pulmonaire chez les patients CF est la résultante, directe et indirecte, d'un dysfonctionnement de la protéine CFTR causé par une(des) mutation(s) au sein du gène *CFTR*. En effet, la déshydratation et l'accumulation du mucus visqueux entraînent la colonisation des poumons par des pathogènes qui amplifie l'inflammation chronique des voies respiratoires. Actuellement, peu d'études sur la PDT ont été réalisées en prenant en considération ce contexte physiopathologique.

#### 1.1. Impact des conditions physiologiques et microbiologiques

Certaines études ont démontré que, chez les patients CF, l'efficacité de l'antibiothérapie pouvait être compromise sous l'effet de différents facteurs environnementaux pulmonaires. Dans une première étude, nous avons étudié les limites du modèle PDT développé en prenant en considération les déséquilibres physicochimiques (pH, salinité, oxygénation) et microbiologiques (dysbiose, infections polymicrobiennes, adaptations phénotypiques) retrouvés dans les poumons chez les patients CF. Ce travail, initialement présenté lors de différents congrès (PDD-PDI, AEBIN School, SFNano), a été publié dans le *Journal Pharmaceutics*.

## Article

# Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways

Raphaëlle Youf <sup>1</sup>, Adeel Nasir <sup>1</sup>, Mareike Müller <sup>2</sup>, Franck Thétiot <sup>3</sup>, Tanguy Haute <sup>1</sup> , Rosy Ghanem <sup>1</sup> , Ulrich Jonas <sup>4</sup> , Holger Schönherr <sup>2</sup> , Gilles Lemerrier <sup>5</sup> , Tristan Montier <sup>1,6</sup>  and Tony Le Gall <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> INSERM, Univ Brest, EFS, UMR 1078, GGB-GTCA, 29200 Brest, France

<sup>2</sup> Physical Chemistry I & Research Center of Micro- and Nanochemistry and (Bio)Technology (Cμ), Department of Chemistry and Biology, University of Siegen, 57076 Siegen, Germany

<sup>3</sup> Unité Mixte de Recherche (UMR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 6521, Université de Brest (UBO), CS 93837, 29238 Brest, France

<sup>4</sup> Macromolecular Chemistry, Department of Chemistry and Biology, University of Siegen, 57076 Siegen, Germany

<sup>5</sup> Coordination Chemistry Team, Unité Mixte de Recherche (UMR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 7312, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, CEDEX 2, 51687 Reims, France

<sup>6</sup> CHRU de Brest, Service de Génétique Médicale et de Biologie de la Reproduction, Centre de Référence des Maladies Rares Maladies Neuromusculaires, 29200 Brest, France

\* Correspondence: tony.legall@univ-brest.fr



**Citation:** Youf, R.; Nasir, A.; Müller, M.; Thétiot, F.; Haute, T.; Ghanem, R.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1664. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081664>

Academic Editor: Maria Nowakowska

Received: 1 July 2022

Accepted: 5 August 2022

Published: 10 August 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/>).

**Abstract:** Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) depends on a variety of parameters notably related to the photosensitizers used, the pathogens to target and the environment to operate. In a previous study using a series of Ruthenium(II) polypyridyl ([Ru(II)]) complexes, we reported the importance of the chemical structure on both their photo-physical/physico-chemical properties and their efficacy for aPDT. By employing standard in vitro conditions, effective [Ru(II)]-mediated aPDT was demonstrated against planktonic cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains notably isolated from the airways of Cystic Fibrosis (CF) patients. CF lung disease is characterized with many pathophysiological disorders that can compromise the effectiveness of antimicrobials. Taking this into account, the present study is an extension of our previous work, with the aim of further investigating [Ru(II)]-mediated aPDT under in vitro experimental settings approaching the conditions of infected airways in CF patients. Thus, we herein studied the isolated influence of a series of parameters (including increased osmotic strength, acidic pH, lower oxygen availability, artificial sputum medium and biofilm formation) on the properties of two selected [Ru(II)] complexes. Furthermore, these compounds were used to evaluate the possibility to photoinactivate *P. aeruginosa* while preserving an underlying epithelium of human bronchial epithelial cells. Altogether, our results provide substantial evidence for the relevance of [Ru(II)]-based aPDT in CF lung airways. Besides optimized nano-complexes, this study also highlights the various needs for translating such a challenging perspective into clinical practice.

**Keywords:** antimicrobial photodynamic therapy; antimicrobial resistance; biofilm; benchmark analysis; cystic fibrosis; micro-environment; ruthenium complexes

## 1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) consists of administrating a non-toxic photosensitive molecule, called photosensitizer (PS), followed by light irradiation to generate reactive oxygen species (ROS) including singlet oxygen molecules (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) producing multiple non-specific alterations to living organisms in an area to treat [1–3]. This three-partners (O<sub>2</sub>, light and PS) reaction may be used in a wide range of biomedical settings, notably for anticancer

and antimicrobial applications [2,4,5]. Antimicrobial PDT (aPDT) has been suggested as a promising alternative or complementary treatment to current antibiotic therapy [3,6–9]. Indeed, since aPDT does not require any interaction with a specific molecular target and may be more resilient than the latter, it could allow overcoming the increasing spread of multidrug-resistant (MDR) micro-organisms [6–8,10]. Although many *in vitro* investigations have been done ascertaining the potential relevance of such a strategy, much fewer studies have been conducted so far under *in vivo* infected conditions [11,12]. However, the activity of PS strongly depends on the environment (where the therapeutic effect must occur), which should be thus considered as an additional critical parameter in PDT [13].

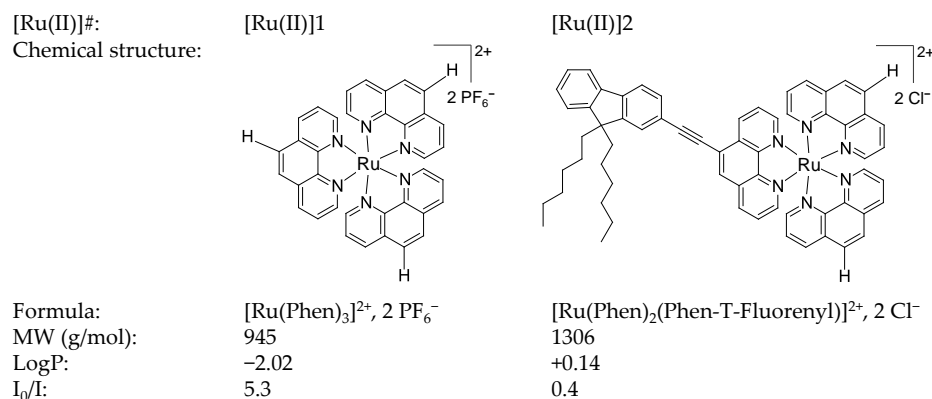
Metal complexes constitute a vast pipeline of potential active drugs with great promise for various biomedical applications [14–16]. As recent examples, silver *N*-heterocyclic carbenes with long *N*-alkyl chains [17], titanium(IV) complexes [18] or platinum cyclo-octadiene complexes [19] have been reported for their antibacterial properties. Regarding ruthenium complexes, ruthenium(II) polypyridyl complexes (hereafter abbreviated as [Ru(II)]) are endowed with peculiar properties, making them promising chemotherapeutic candidates [20–22]. They constitute attractive PS for PDT, notably because (i) they strongly absorb visible light, (ii) they display tunable photophysical properties, (iii) they can efficiently produce ROS upon light irradiation and (iv) they are generally not cytotoxic in the dark [23–25]. Recently, we conducted a structure–activity study using a variety of [Ru(II)] and a series of Gram-positive or Gram-negative clinical bacterial strains [23]. The molecular structure of [Ru(II)] was shown to strongly impact their photophysical properties and in turn their ability to perform bacterial photo-inactivation. Notably, the polar and amphiphilic characters of asymmetric complexes were associated with both a higher affinity for bacteria and a greater aPDT efficiency. This *in vitro* study emphasized the phototoxic potential of [Ru(II)] against various bacteria, irrespective of their antibiotic resistance profile, and thus their relevance to overcome antimicrobial resistance (AMR). Of note, the clinical bacterial strains included in that study were responsible for diverse infections in humans, notably in the airways of cystic fibrosis (CF) patients.

CF (OMIM 219700) is a lethal inherited disorder frequent in Caucasian populations [26]. It is generally due to mutations occurring in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, which encodes a protein channel inserted in the apical membrane of epithelial cells, where it regulates the luminal secretion of chloride and water. In CF patients, the pathophysiological disorders occurring in lung airways and the resulting pulmonary symptoms strongly impact their lifespan and quality of life [27]. The dysregulation of CFTR and other ionic channels leads to the dehydration of the airway surface liquid (ASL), with the consequent impairment of mucociliary clearance and the accumulation of a hyperviscous mucus [28]. This provides appropriate conditions for lung colonization by opportunistic pathogens, especially *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growing in the form of hard-to-treat biofilms [27].

As a first line to treat CF lung infections, antibiotherapy has significantly increased the quality of life and the median survival age of patients. Nevertheless, pulmonary physiological impairments (especially sticky sputum formation, lowered pH and osmotic and oxidative stresses) alter the efficiency of antibiotics by reducing their stability and diffusion, leading to sub-inhibitory concentrations in sputum [29,30]. Furthermore, bacteria in biofilms can resist to 100–1000 times higher doses of antibiotics compared with the same bacteria growing as planktonic cells [31]. In contrast with systemic antibiotic administration, aerosolized and nebulized deliveries allow for significant improvements (up to 100 times) of their concentrations in CF sputum [32–34]. However, continuous antibiotherapies increase the risk of resistance emergence that can severely limit the remaining antibiotic options in patients with advanced diseases [35]. Today, MDR micro-organisms, notably belonging to the WHO priority pathogen list [36], are increasingly reported in CF patients [37,38]. For all these reasons, CF lung disease can be considered a challenging model system to develop novel antimicrobial treatment targeting infected airways. To our knowledge, besides many

other antimicrobial approaches, the potential of aPDT has been scarcely considered in that respect to date.

The present study aimed to further expand our previous study on [Ru(II)] complexes [23], prospecting for the use of such compounds for performing aPDT in CF lung airways. Thus, two compounds (hereafter noted as [Ru(II)]1 and [Ru(II)]2, respectively; Figure 1) were selected considering their photo-physical and physico-chemical properties. They were used to conduct evaluations while taking into account CF pathophysiological disorders that may impact their activity (Table S1). In light of the results obtained, the relevance of [Ru(II)]-based aPDT for treating CF lung infections is critically discussed.



**Figure 1.** Chemical structure and relevant features of [Ru(II)] used in this study. The partitioning index LogP is a measure of the difference in solubility of the compound in 1-butanol and in water. I<sub>0</sub>/I is a measure of the singlet oxygen production efficiency, as determined using a Stern–Volmer analysis. LogP and I<sub>0</sub>/I were calculated and reported in our previous study (in which the counter-ion was hexafluorophosphate for both compounds) [23]. “Phen”: 1,10-phenanthroline.

## 2. Materials and Methods

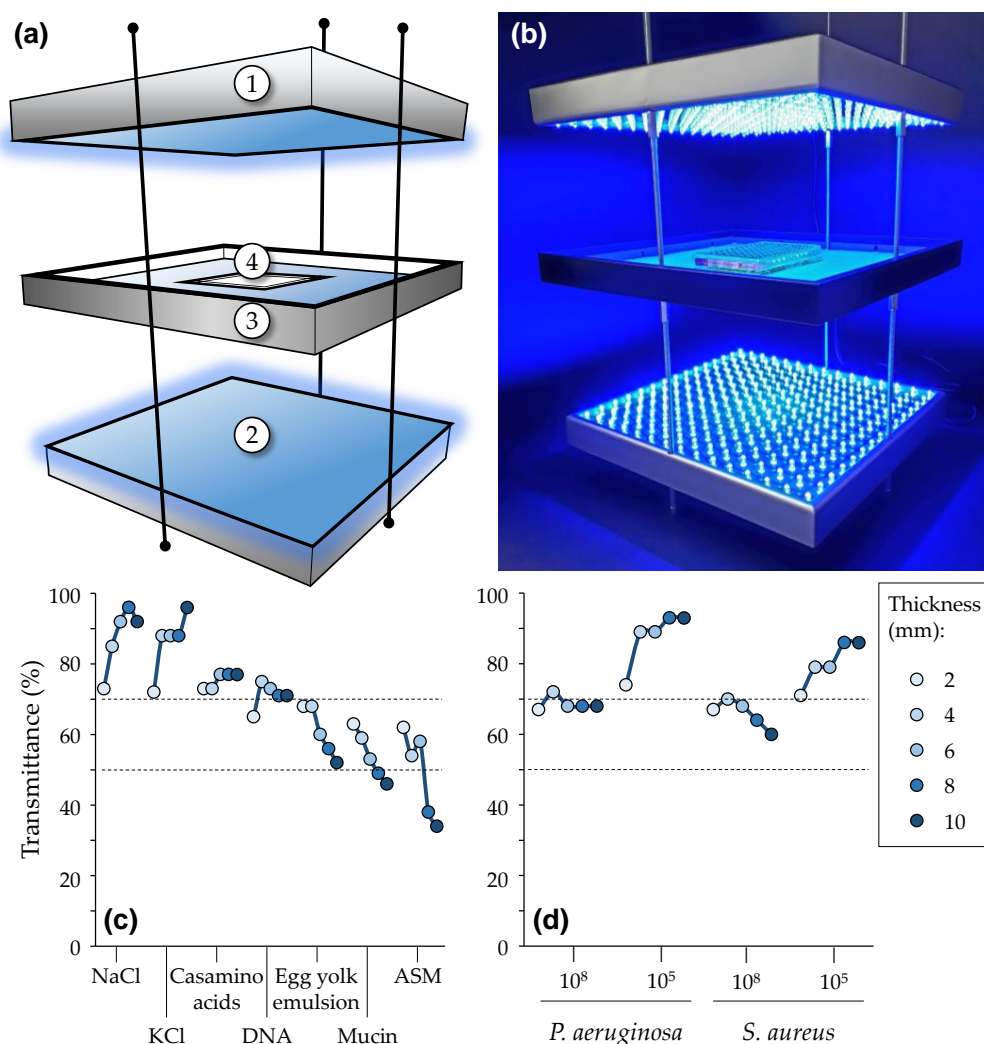
### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Photosensitizers

Two [Ru(II)] were used as PS, i.e., [Ru(Phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub> and [Ru(Phen)<sub>2</sub>(Phen-T-Fluorenyl)]<sup>2+</sup> (Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>, hereafter abbreviated as [Ru(II)]1 and [Ru(II)]2, respectively (Figure 1). [Ru(II)]1 was purchased from StremChemicals (CAS. 60804-75-3, StremChemicals, Newburyport, MA, USA), whereas [Ru(II)]2 was synthesized as previously reported [23]. For both compounds, powders and solutions were stored in the dark at room temperature (RT). Unless otherwise stated, stock solutions were prepared in DMSO at 5 mM. In every test, [Ru(II)] were tested for concentrations ≤ 64 μM, thus bringing DMSO to final concentrations that did not exceed 1%, as recommended in CLSI guidelines.

#### 2.1.2. Illumination Set-Up and Light Treatment Procedure

Illumination treatments were performed using a home-made illumination device (Figure 2). This custom-built experimental system was designed to perform simultaneous top and bottom illumination with two wide (310 × 310 mm) panels (each incorporating 225 14W pure blue LEDs; λ: 450–470 nm) facing each other at adjustable distances. LED panels were placed on both sides of a plate that could be used to expose standard multi-well plates in a central exposure area (CEA). The heating resulting from light emission was measured using a temperature sensor placed in the middle of the CEA and monitoring temperature variation during irradiation. A PM160 wireless handheld power meter (Thorlabs, Bergkirchen, Germany) was used to measure light transmittance in various experimental settings, as detailed in Results section.



**Figure 2.** Illumination set-up. Schematic representation (a) showing the two LED panels (① and ②) placed above and underneath an in-between plate (③) used to hold materials placed in a central exposure area (④). The picture in (b) shows the illumination of a 96-well plate containing [Ru(II)] samples. Fluorescence was clearly visible to the naked eyes. Light transmittances was measured through various samples with increasing thicknesses, including ASM and its individual components (c) as well as several bacterial inoculums prepared in saline (d). The dashed lines correspond to 50 and 70% transmittances, respectively. See Figure S1 for more technical details about this setup.

Unless otherwise stated, the illumination device was used for light treatment, as follows. A total of 20 min after the addition of [Ru(II)], the samples to irradiate were placed in the CEA, and then top and bottom exposure to LED light was repeated twice for 5 min, with 5 min under ambient light in between each exposure. The whole procedure was carried out at room temperature. A typical irradiation cycle thus lasted no more than 15 min in total (which was found to be sufficient to obtain PDT effects in many cases). The effect of that treatment was assessed by comparing samples subjected to light with the same samples kept in the dark. In this manuscript, the above-mentioned conditions are denoted “ON” (light-treated condition) and “OFF” (non-irradiated control), respectively.

### 2.1.3. Bacterial Strains

A series of *S. aureus* or *P. aeruginosa* strains were used in this study: the laboratory strain *S. aureus* RN4220 [39], the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) N315 [40], the *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC<sup>®</sup> 19660<sup>™</sup>, hereafter noted PA19660) and the CF-originating *P. aeruginosa* PAH [41]. All bacterial routine handlings were conducted with

Luria Bertani (LB) broth at 37 °C. Detailed information about each strain is available in the Supplementary Materials (Table S2).

#### 2.1.4. Cells

A new bioluminescent cell line was derived from the human CF bronchial epithelial cell line CFBE41o- [42]. The protocol used to establish this genetically modified cell line (hereafter noted CFBE-Luc) is detailed in the Supplementary Materials. They were grown in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic and 1% L-glutamine (complete culture medium hereafter noted EMEMc; all components obtained from Lonza, Levallois-Perret, France). Incubations were performed at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.1.5. Specific Media

Artificial sputum medium (ASM) was prepared as previously reported [43]. Mannitol Salt Agar (Thermo Fischer Scientific, Hampshire, UK) and Pseudomonas Isolation Agar (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to specifically determine the number of colony forming units (CFUs) of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. Acetate buffers at various pH were prepared as described in the Supplementary Materials (Table S3). Saline solution (hereafter noted 1X NaCl) corresponded to 0.9% NaCl (Versol, London, UK).

### 2.2. Bacteria and Cell Culture Conditions

#### 2.2.1. Bacteria Growing as Planktonic Cells

Overnight cultures of the bacteria were prepared by inoculating 5 mL of LB broth with a single colony picked from an LB agar plate, followed by incubation at 37 °C for 12–16 h. For experiments requiring bacteria in the exponential phase, 10 µL of overnight culture were used to inoculate 10 mL of LB broth, with subsequent incubation for approximately 5 h at 37 °C. After centrifugation at 2000× *g* for 10 min at 4 °C, the supernatant was carefully discarded to isolate bacterial pellets. The latter were suspended in required solutions at the desired bacterial density, assuming that OD600 of 0.6 and 1.2 corresponded to 10<sup>7–8</sup> CFU/mL for *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively [23].

#### 2.2.2. Bacteria Growing as Sessile Cells in Biofilms

*S. aureus* and *P. aeruginosa* overnight cultures were prepared as mentioned in the previous section. After the centrifugation and resuspension of bacterial pellets in LB, 10 mL of diluted suspension was prepared (at 10<sup>6</sup> CFU/mL) and then used to inoculate a 96-well round bottom microplate (Costar, Kennebunk, MI, USA). Incubation was then carried out for 20 h at 37 °C under static humidified conditions.

#### 2.2.3. Co-Cultures of Bacteria and Eukaryotic Cells

Co-culture experiments involving eukaryotic and prokaryotic cells were conducted using CFBE-Luc and PA19660, respectively. Briefly, CFBE-Luc were first grown (without bacteria) under either of the two following types of culture conditions. (i) For cultures in submerged conditions, cells were seeded in 96-well plates (Sarstedt, Numbrecht, Germany) at a density of 50,000 cells in 200 µL of EMEMc per well and were incubated for 24 h at 37 °C before subsequent use. (ii) For cultures at the air–liquid interface (ALI), cells were seeded in 0.4 µm pore membrane inserts (Sarstedt, Numbrecht, Germany) at a density of 150,000 cells in 200 µL of EMEMc per insert and were incubated at 37 °C. After 1 week, the culture medium in the apical chamber was removed, and the cells were maintained at ALI for at least 3 weeks, with the culture medium in the basal chamber being renewed every 3–4 days. Trans-epithelial electrical resistance was measured using an EVOM2 epithelial Volt/Ohm meter (World Precision Instruments, Hertfordshire, Germany).

### 2.3. Characterizations of [Ru(II)] under Various Experimental Conditions

All below-mentioned fluorescence and absorption measurements were performed using the multiplate reader Mithras2 LB 943 (Berthold Technology, Thoiry, France).

#### 2.3.1. Fluorescence and UV Visible Spectra

For fluorescence measurements, 50  $\mu\text{M}$  [Ru(II)] in 200  $\mu\text{L}$  was introduced per well of a black 96-well plate (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Denmark). Measurements were performed with excitation at  $460 \pm 15$  nm and emission readings at  $590 \pm 22$  nm. For UV-visible spectra, UV/vis transparent flat-bottom multi-well plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) were used with 50  $\mu\text{M}$  [Ru(II)], in either 1X NaCl or water. Absorption was measured from 230 to 630 nm (increment = 5 nm) at 25 °C.

#### 2.3.2. PS interaction with Bacteria

Bacteria ( $10^8$  CFU/mL) were mixed with 50  $\mu\text{M}$  [Ru(II)] in water or saline. A first measurement was performed to determine the total fluorescence. Then, a centrifugation at  $2000 \times g$  for 10 min at 4 °C was performed to pellet bacterial cells. The supernatant and pellet were carefully isolated, and a second fluorescence measurement was performed on these two fractions. The fluorescence distribution in the latter informed about the strength of the interaction between [Ru(II)] and the bacteria (assuming that the higher fluorescence in the pellet, the stronger interaction of [Ru(II)] with bacteria).

#### 2.3.3. PI Assay

Bacteria ( $10^8$  CFU/mL) were mixed with 50  $\mu\text{M}$  [Ru(II)] in saline. Following the centrifugation of samples at  $2000 \times g$  for 10 min at 4 °C, the bacterial pellets were isolated and suspended in 1 mL of 100  $\mu\text{M}$  propidium iodide (PI; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). As a positive control of permeabilization, bacteria previously treated with 70% isopropanol were subjected to the same. These mixtures were incubated for 5 min at RT. Following another centrifugation, the supernatant was discarded, and bacterial pellets were suspended in 1X NaCl. Fluorescence was read with excitation at  $488 \pm 8$  nm and emission at  $617 \pm 15$  nm.

#### 2.3.4. Determination of Singlet Oxygen Production

The singlet oxygen sensor green (SOSG) fluorescent probe (Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) was used to quantify  $^1\text{O}_2$ . Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of 50  $\mu\text{M}$  [Ru(II)] was mixed with 50  $\mu\text{L}$  of Tris buffer at pH 7.0, supplemented or not with  $10^7$  CFU/mL of bacteria. Then, 10  $\mu\text{L}$  of SOSG was added to reach a final concentration of 10  $\mu\text{M}$ . After incubation for 20 min in the dark, light treatment was performed before reading fluorescence, with excitation at  $504 \pm 6$  nm and emission at  $525 \pm 12$  nm.

#### 2.3.5. Determination of Intracellular ROS Production

The 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Merck, Darmstadt, Germany), a cell permeant reagent fluorogenic dye, was used to quantify intracellular ROS production. It is converted in DCFH carboxylate anion (DCFH), a non-fluorescent compound, by cellular esterase. In the presence of ROS (e.g., hydroxyl anion or hydrogen peroxide), it is oxidized in dichlorofluorescein (DCF), which is highly fluorescent. Briefly,  $10^8$  CFU/mL of bacteria were exposed to 10  $\mu\text{M}$  of DCFH-DA in 1X PBS for 30 min. Bacteria were then collected by centrifugation at  $2000 \times g$  for 10 min at 4 °C and were washed with 1X NaCl. Another centrifugation was performed, and bacterial pellets were mixed with 200  $\mu\text{L}$  of 25  $\mu\text{M}$  [Ru(II)] in 1X NaCl. After irradiation, fluorescence was measured with excitation at  $485 \pm 12$  nm and emission at  $535 \pm 12$  nm.

#### 2.3.6. Hypoxic Condition Assay

Sunflower oil (Merck, Darmstadt, Germany) was deposited at the surface of a given medium to prevent any contact with ambient air. Janus Green B (JGB, Merck, Darmstadt,

Germany) mixed in the medium (0.03 %, *w/v*) was used as a fluorescent hypoxic indicator, as previously reported [44]. More details are given in the Supplementary Materials (Figure S7).

#### 2.4. Assessment of Antibacterial PDT Effects

##### 2.4.1. Assessment of PDT Effects on Planktonic Cells

The determination of the bacteria still alive following a given treatment was performed using several methods. First, the spotting method provided a rough demonstration of the specific effect of light and any possible dark toxicity. For doing so, 5  $\mu\text{L}$  of each condition (just before and then after light treatment) was dropped on a nutritive (non-selective) agar plate using a multichannel pipette. Following the incubation of the plates overnight at 37 °C, it was possible to distinguish between full, intermediate or no antibacterial effect compared to control conditions. Second, semi-quantitative bacterial counting was performed to roughly estimate the number of CFU/mL. For doing so, control and test conditions were subjected to serial 10-fold dilutions (10  $\mu\text{L}$  in 90  $\mu\text{L}$  of 1X NaCl), and then 5  $\mu\text{L}$  of each dilution was spotted on an LB agar plate. After incubation at 37 °C for 24–48 h, counting was performed to estimate the bacterial density in each sample. Third, growth kinetics allowed for the estimation of reductions in bacterial density down to 10<sup>5</sup> CFU/mL, as previously reported [23]. Briefly, 195  $\mu\text{L}$  of LB liquid medium per well was inoculated with either 5  $\mu\text{L}$  of a given test condition or 5  $\mu\text{L}$  of serial dilutions of a control inoculum of the same bacteria. The plate was then introduced into the Mithras2 LB943 microplate reader (Berthold). Incubation was carried out at 30 °C for at least 16 h, with stirring and OD readings (at 600 nm) being repeated every 10 min. The number of viable bacteria was inferred by comparing the kinetics of test conditions with those of the control inoculums (containing from 10<sup>5</sup> to 10<sup>0</sup> CFU/mL) [23].

##### 2.4.2. Assessment of PDT Antibiofilm Effects

PDT eradication assays were conducted following protocols reported earlier [45], with some modifications. We distinguished two experimental set-ups, which we named pre-delivery and post-delivery, depending on the timing of the addition of [Ru(II)] to bacteria with respect to the biofilm formation. Briefly, for the pre-delivery eradication assay, *S. aureus* RN4220 or *P. aeruginosa* PA19660 at a density of 10<sup>6</sup> CFU/mL was first mixed with a given [Ru(II)] at 50  $\mu\text{M}$  in 0.5X NaCl. After incubation for 20 h at 37 °C under static conditions, the planktonic phase was carefully discarded, and the isolated biofilm was subjected to light treatment. The latter was performed using a modified procedure, with 15 min instead of 5 min at each step (to allow for obtaining better PDT effects). For the post-delivery eradication assay, the above-mentioned bacteria were grown (without [Ru(II)]) for 20 h at 37 °C under static conditions. Then, the planktonic phase was discarded, and the biofilm was carefully washed twice with saline solution before being covered with 100  $\mu\text{L}$  of 50  $\mu\text{M}$  [Ru(II)] in 0.5X NaCl. After incubation for 20 min, light treatment was performed as detailed above. For both eradication assays, antibacterial effects were assessed immediately after light treatment using the procedures described above (see Section 2.4.1) and in the Supplementary Materials. Ciprofloxacin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a dose of 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was used as a positive control.

##### 2.4.3. Assessment of PDT Effects on Bacteria in Co-Culture Experiments

Following the cell culture in either of the two above-mentioned culture conditions (see Section 2.2.3), 50  $\mu\text{L}$  of bacteria (10<sup>5</sup> CFU/mL of PA19660) mixed with either of the two [Ru(II)] compounds (at 50  $\mu\text{M}$  in 0.5X NaCl) were deposited over CFBE-Luc cells. The light treatment was performed 15 min later. Then, the mixture containing bacteria and [Ru(II)] was removed, and the bacterial load was immediately determined by enumeration. The culture medium of submerged cells or cells cultured at ALI was replaced with fresh antibiotic-free medium. After 24 h incubation, the cells were lysed with the Passive Lysis Buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). For every test, luciferase expression and total protein content were determined using the Luciferase Assay System (Promega,

Charbonnières-les-Bains, France) and the BC assay kit (Uptima, Interchim, Montluçon, France), respectively. The data were expressed as relative light units (RLU) per milligram of total proteins, as previously reported [41].

### 2.5. Statistical Analysis

For every assay, tests were performed in technical triplicates ( $n = 3$ ), and at least 2 independent experiments were performed ( $N \geq 2$ ). The results presented correspond to the mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD) for all the variables. Data were compared by using Student's *t*-test processed with Prism software version 6.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Statistically significant differences were denoted as follows: \*\*\*,  $p$ -value  $\leq 0.001$ ; \*\*,  $p$ -value  $\leq 0.01$ ; \*,  $p$ -value  $\leq 0.05$ . Non-significant differences were noted "ns".

## 3. Results

In this study, two [Ru(II)] (Figure 1) were compared in a series of assays, in an attempt to unveil the isolated influence of various factors showing relevance to the conditions in CF lung airways (Table S1). We first performed photophysical characterizations to assess both the illumination protocol and the [Ru(II)] selected. Then, various experimental conditions were considered to underpin and weigh the parameters that could interfere with [Ru(II)]-mediated aPDT.

### 3.1. Characterizations of the Illumination System and PS

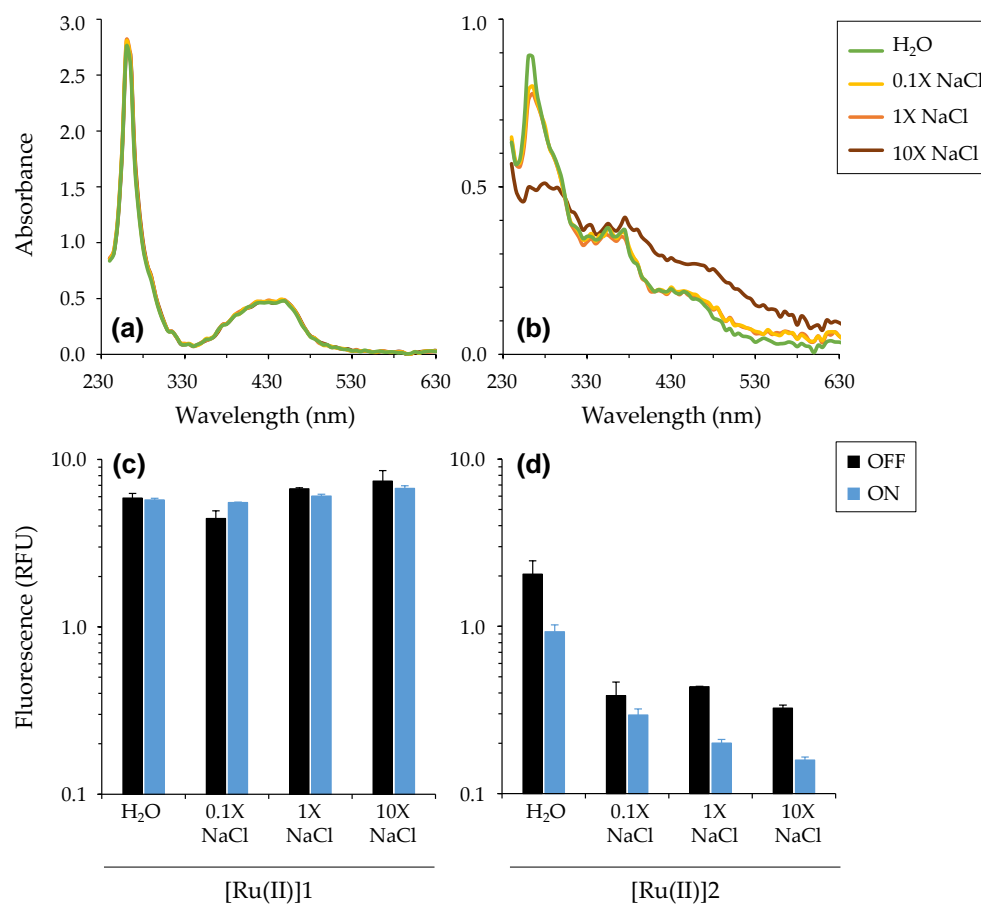
#### 3.1.1. Assessment of the Functioning of the Illumination System

All light treatments in this study were performed using a custom-built illumination system made of light-emitting diodes (LED) specifically suited for the [Ru(II)] evaluated (Figure 2A). LED panels were set equidistant (15 cm) from an in-between plate bearing a central exposure area (CEA). This allowed us to obtain an effective homogenous illumination field over wide areas, with a maximum of  $\sim 4 \text{ mW/cm}^2$  (or  $\text{mJ/s/cm}^2$ ) and less than 10% variation of the light power measured in different locations of the CEA (Figure S1). The heating induced by the illumination was monitored, showing that the temperature increase as a function of illumination time was moderate and negligible in every case (Figure S1). Indeed, the light treatments performed in this study (consisting of 5 to no more than 15 min of continuous irradiation) led to an estimated temperature increase lower than  $2^\circ\text{C}$ . Even after 1 h of continuous illumination, an elevation of no more than  $4^\circ\text{C}$  above RT could be measured. Importantly, results were the same whether the temperature probe was placed in the CEA in the air or in a liquid (not shown). Thus, it can be stated that the short-lived irradiations performed herein did not induce any noticeable temperature increase in the samples, and light-induced heating did not play any significant role in the results obtained.

Furthermore, light transmittance was assessed through liquid samples of various thicknesses, turbidities and compositions (Figure 2B). For practical reasons, the light emitted from one panel (either the top or the bottom one) was measured after its diffusion through liquid samples contained in a wider well than the diameter of the surface active captor of the power meter (i.e., 1.55 cm and 0.95 cm, respectively). In particular, we studied NaCl, KCl, casamino acids, egg yolk emulsion and mucin, as well as their combination in ASM [43]. It was found that light transmittance was the most affected by ASM, mainly due to its content in mucin and egg yolk emulsion, causing increased light scattering. Then, the inoculum of bacterial samples was also shown to curb light diffusion, regardless of the bacteria considered. Overall, light transmittance was lowered when the medium was more turbid, complex or viscous. Other measurements demonstrated the benefit of top and bottom illumination to better irradiate samples in their entirety (not shown). All combined, these trials qualified our system for a controlled screening under multiple experimental conditions.

### 3.1.2. Photophysical Characterizations of [Ru(II)]

UV-visible absorption and fluorescence measurements were determined for both [Ru(II)], either in water or in saline solutions of different ionic strengths, before then after light treatment (Figures 3 and S2).



**Figure 3.** Photophysical properties of [Ru(II)] in water or in saline solutions. Absorption in the UV-visible spectrum (a,b) and fluorescence (c,d) were determined with [Ru(II)]1 (a,c) and [Ru(II)]2 (b,d). In every test, [Ru(II)] concentration was 50  $\mu$ M in 200  $\mu$ L. Fluorescence measurements were performed before (OFF) then after (ON) light treatment. Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$ . The fluorescence background is  $\sim$ 0.05 RFU in every case. “RFU”: relative fluorescence unit.

Considering UV-visible absorption, the two compounds exhibited clearly different spectra, which did not vary in the same direction when increasing the salt concentration in the solution. (1) In water, [Ru(II)]1 showed (i) an intense band between 250 and 280 nm, due to an intra-ligand (IL) electronic transition, (ii) a band around 300–400 nm likely attributed to an intra-ligand charge transfer (ILCT) involving the phenanthroline unit and (iii) a broad band around 450 nm corresponding to metal-to-ligand charge transfer (MLCT) characteristic of such polypyridyl ruthenium complexes. The large width of the MLCT band is attributable to vibronic broadenings and/or the overlap of more bands corresponding to different close-lying electronic transitions [46]. Compared with [Ru(II)]1, [Ru(II)]2 exhibited a strongly different UV-visible spectrum, characterized with lower absorption at every wavelength, but exhibiting clearly visible bands. (2) In saline solutions, [Ru(II)]1 spectra were almost indistinguishable, even for high salt concentrations (up to 10X NaCl). In contrast, [Ru(II)]2 showed more sensitivity to saline, which could be detected right from the lowest concentration tested (i.e., 0.1X NaCl). For 10X NaCl, the spectrum was smoothed with less visible bands. Overall, spectra for both compounds as measured in

water or saline (up to 0.9% i.e., 1X NaCl) were very similar to those reported earlier in 1X PBS [23]. Noticeably, they were unchanged following light treatment (Figure S2).

Considering fluorescence, [Ru(II)]1 was found to be more fluorescent than [Ru(II)]2, irrespective of the condition considered. Furthermore, whereas [Ru(II)]1 fluorescence intensity was almost the same in every condition, it was reduced by about half for [Ru(II)]2 in saline conditions. Light treatment also provided distinct results depending on the compounds, with [Ru(II)]1 fluorescence remaining the same whereas it was significantly reduced for [Ru(II)]2. These results may be ascribed, at least in part, to the difference in solubility of these two complexes, as denoted by their respective LogP value (Figure 1), resulting in obvious (clearly visible) turbidity, light scattering and lesser light diffusion occurring for [Ru(II)]2 in saline solutions. The lowered fluorescence signal specifically noted for [Ru(II)]2 after light treatment, in water or saline, is also remarkable, but not explained at present. Importantly, all measurements were performed over a period that did not permit any noticeable precipitation.

All combined, these results further point out that the molecular engineering of such complexes can have strong impacts on their physico-chemical and photophysical properties. This is especially verified under saline conditions approaching those in CF lungs (Table S1).

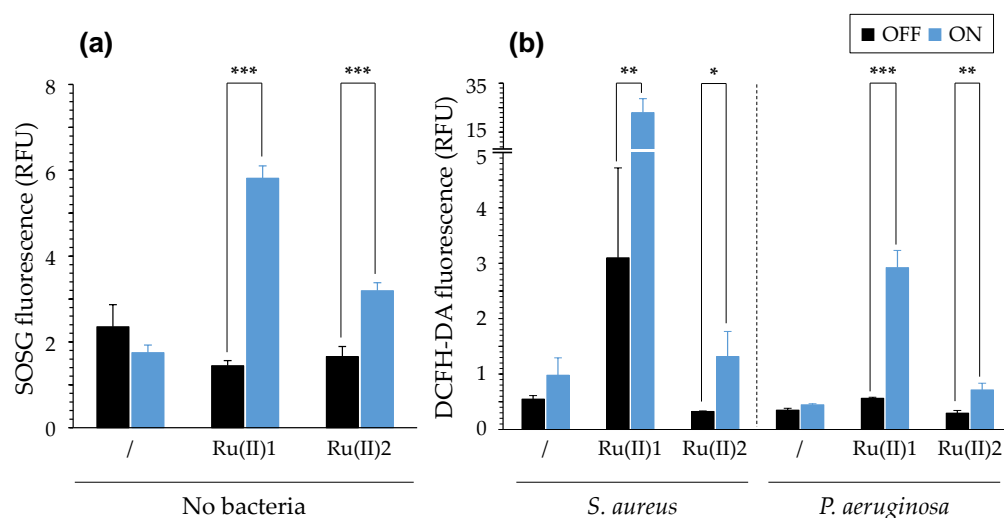
### 3.1.3. Singlet Oxygen and ROS Productions

The abilities of [Ru(II)] to produce  $^1\text{O}_2$  and ROS were investigated in various experimental conditions. For  $^1\text{O}_2$  production, we used the cell impermeant derivative SOSG probe, which is highly selective for  $^1\text{O}_2$  and does not show any appreciable response to  $\bullet\text{OH}$  or  $\bullet\text{O}_2^-$ , as claimed by the manufacturer. The SOSG functioning primarily relies on  $\text{O}_2$  availability and can be used in the absence or presence of cells. Upon light treatment, in the absence of bacteria, the production of  $^1\text{O}_2$  was detectable with [Ru(II)]1 and to a lesser extent with [Ru(II)]2 (Figure 4). In the presence of bacteria, this production was also detected, and it was found to be enhanced for [Ru(II)]2 with *S. aureus* (Figure S3). Regarding ROS production, we used the DCFH-DA probe that is cell-permeable and requires the use of live cells. Upon entering a bacterial cell, DCFH-DA is hydrolyzed by esterases to the non-fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, which can be then oxidized by a variety of ROS to the strongly fluorescent dichlorofluorescein. Despite some background and signal variations, it was noticeable that both compounds were able to induce ROS production, as demonstrated by the fluorescence increase measured after light treatment. [Ru(II)]1 appeared to be more efficient than [Ru(II)]2 for both  $^1\text{O}_2$  and ROS productions, which could be stronger in the presence of *S. aureus* than *P. aeruginosa*. These findings were actually in accordance with findings we reported earlier using other experimental determination methods (Figure 1) [23].

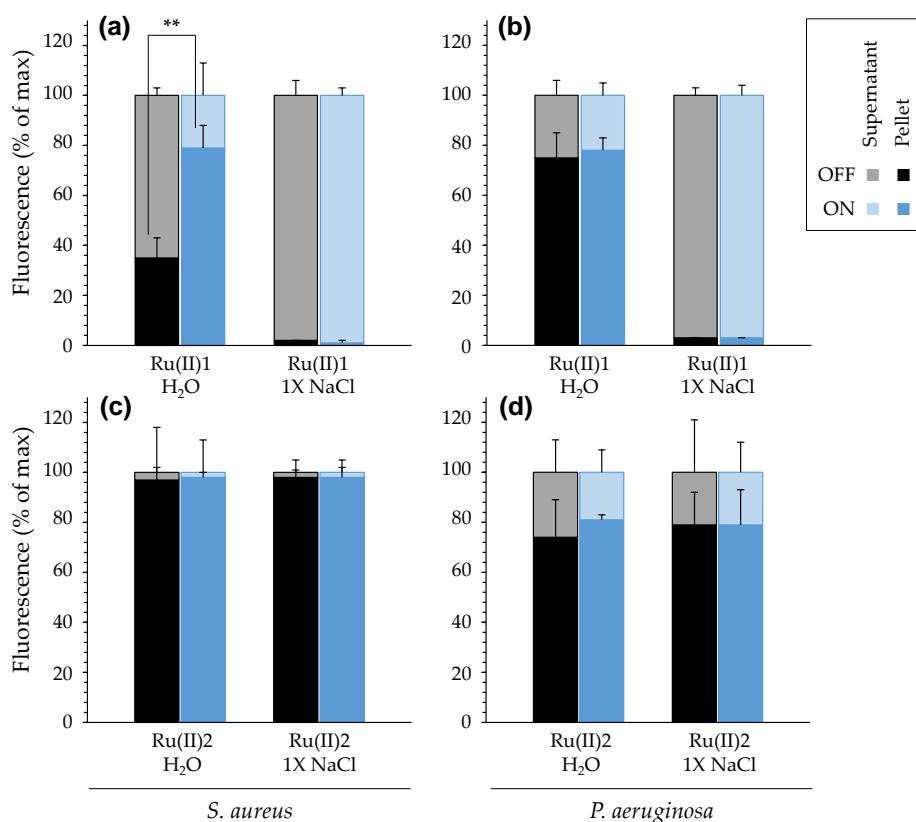
### 3.1.4. Bacteria/Ru(II) Interaction and PI Assay

The capacity of [Ru(II)] to interact with bacteria in solution was evaluated by considering the ability of the former to absorb at the surface of—and co-precipitate with—the latter, as reported earlier [23]. Fluorescence measurements were performed to track [Ru(II)] after a centrifugation step. In the absence of bacteria, the fluorescence in the solution did not vary, and no pellet was formed, meaning that [Ru(II)] did not precipitate in any condition considered. On the other hand, in the presence of bacteria, the centrifugation led to pellet the latter, and the fluorescence in the solution could decrease, reflecting an interaction between bacteria and [Ru(II)]. As shown in Figure 5, very different results were obtained with the two [Ru(II)] assayed, depending on the strains, the ionic strength and, in some cases, the light applied. For [Ru(II)]2, it was noteworthy that it fully precipitated with bacteria in almost every condition considered, showing its propensity to interact with *S. aureus* and (to a slightly lesser extent) with *P. aeruginosa*. When considering [Ru(II)]1, the salinity prevented its capacity to interact with any bacteria, whereas in water, some interaction could be measured, with various intensities depending on the bacteria considered. Noticeably, light treatment (performed before the centrifugation step)

was found to significantly increase the interaction capacity of [Ru(II)]1 when mixed in water with either of the two *S. aureus* strains evaluated (but not with *P. aeruginosa* strains; Figures 5 and S4).



**Figure 4.** Production of singlet oxygen and intracellular ROS upon light treatment of [Ru(II)]. Results were obtained using SOSG (a) and DCFH-DA (b), respectively; *S. aureus* and *P. aeruginosa* were RN4220 and PA19660, respectively. [Ru(II)] = 25  $\mu$ M in Tris-HCl for SOSG and 1X NaCl for DCFH-DA. Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$  (representative results of  $N = 2$ ). \*\*\*,  $p$ -value  $\leq 0.001$ ; \*\*,  $p$ -value  $\leq 0.01$ ; \*,  $p$ -value  $\leq 0.05$ . See Figure S3 for more data.



**Figure 5.** Interaction assay between [Ru(II)] and bacteria when mixed either in water or in 1X NaCl. Results were obtained using [Ru(II)]1 (a,b) or [Ru(II)]2 (c,d) with *S. aureus* RN4220 (a,c) and *P. aeruginosa* PA19660 (b,d). See Figure S4 for results obtained with other bacterial strains. [Ru(II)] = 25  $\mu$ M. Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$  and  $N \geq 2$ . \*\*,  $p$ -value  $\leq 0.01$ .

We also investigated several possible effects of [Ru(II)] on the integrity of bacterial cells. First, the surface charge of bacteria did not change following the mixture with a given [Ru(II)] in water, neither before nor after light treatment (Figure S5). Indeed, in every case, *S. aureus* and *P. aeruginosa* exhibited zeta potentials of around  $-15$  mV and  $-20$  mV, respectively. Second, the ability of [Ru(II)] to permeabilize bacterial cells was evaluated by conducting a PI assay. Live cells are normally non-permeable to PI, which can thus be used as a dye to detect dead cells in a population. This highlighted again that the two [Ru(II)] yielded different results in the experimental conditions considered. Indeed, no obvious permeabilization could be found with [Ru(II)]1 when mixed with *S. aureus* or *P. aeruginosa*. On the other hand, whereas no effect was found towards *P. aeruginosa*, [Ru(II)]2 could permeabilize *S. aureus* cells, which was clearly observed when light treatment was applied (Figure S5).

### 3.2. Impact on aPDT of Different Parameters during Light Treatment

The possible impact on the photodynamic inactivation of various parameters relevant with respect to CF lung condition was evaluated in dedicated experiments. In every case, bacteria were mixed with either [Ru(II)] and subjected to light treatment in the specific conditions detailed below. Immediately after, the remaining viable cells were determined by growing these under standard, non-selective conditions, as detailed in the Material and Methods section. This allowed us to study the potential impact of each parameter specifically during the duration of light treatment.

#### 3.2.1. Impact of Salinity

The effect of salinity on the antibacterial effects mediated by either of the two [Ru(II)] was evaluated with two *S. aureus* and two *P. aeruginosa* strains. The results obtained showed that, in many cases, better aPDT effects (but also stronger light-independent toxicity) are obtained in water compared to saline solution (Table 1). With respect to the antibiotic-resistant profile of bacteria (Table S2), no correlation could be clearly shown with susceptibility to a given [Ru(II)], in accordance with previous studies [3,23]. These results further point out the critical importance of salinity on [Ru(II)]-mediated PDT, irrespective of the compound used.

**Table 1.** MIC<sup>1</sup> of [Ru(II)] following light treatment performed either in water or in 1X NaCl.

			[Ru(II)]1		[Ru(II)]2	
			OFF	ON	OFF	ON
<i>S. aureus</i>	RN4220	NaCl	>64 <sup>2</sup>	>64	64	32
		Water	>64	32	64	8
	N315	NaCl	>64	>64	64	64
		Water	>64	64	64	32
<i>P. aeruginosa</i>	PA19660	NaCl	>64	64	>64	32
		Water	8	8	8	8
	PAH	NaCl	>64	>64	8	8
		Water	>64	64	Nd	Nd

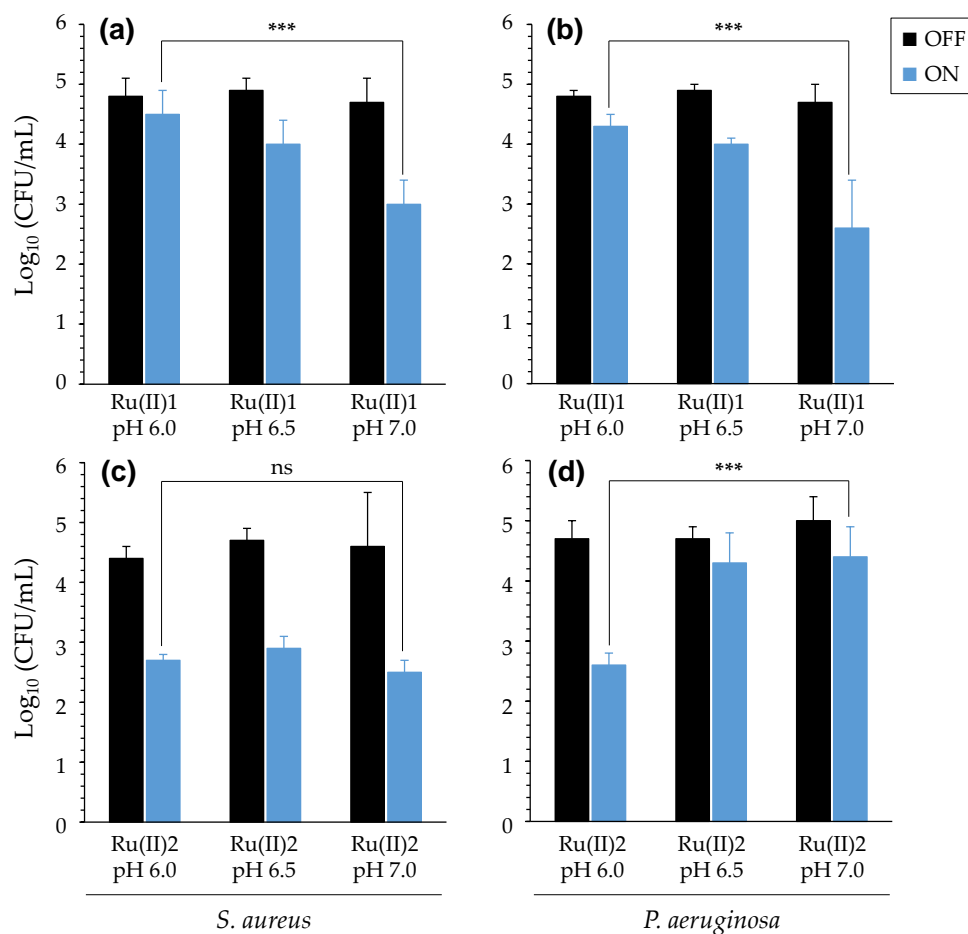
<sup>1</sup> The concentrations evaluated were: 2, 8, 32 and 64  $\mu$ M; <sup>2</sup> in  $\mu$ M. Representative data obtained with  $n = 3$  and  $N = 2$ . "Nd": not determined.

Considering these results, subsequent experiments were conducted with adjusted saline and [Ru(II)] concentrations (as specified below), to allow for the highlighting of the impact of other parameters on aPDT.

#### 3.2.2. Impact of Acidic pH

Bacteria were mixed with either [Ru(II)] in buffers at different pH (7.0, 6.5 or 6.0) encompassing the values commonly measured in the CF ASL (Table S1). After light treatment, bacterial density was determined to distinguish the possible effects of light and

pH towards *P. aeruginosa* and *S. aureus*. First, it was checked that, for a given strain, the growth ability was not affected following transient incubation in the various conditions assayed (Figure S6). As shown in Figure 6, the pH could impact the antibacterial effects, depending on both the bacteria evaluated and the [Ru(II)] used. For [Ru(II)]1, significantly higher reductions in the density of bacteria (either *S. aureus* or *P. aeruginosa*) were measured at a neutral pH than at an acidic pH. For [Ru(II)]2, the PDT effects towards *S. aureus* were almost the same at the various pH investigated. Noticeably, better effects against *P. aeruginosa* could be obtained for the lowest pH, thus showing an opposite trend as compared with [Ru(II)]1.



**Figure 6.** PDT effects of [Ru(II)] at various pH. Results were obtained using [Ru(II)]1 (a,b) or [Ru(II)]2 (c,d) with *S. aureus* RN4220 (a,c) and *P. aeruginosa* PA19660 (b,d). [Ru(II)] concentration was adapted to each strain evaluated: [Ru(II)]1 was 40 and 10  $\mu$ M, whereas [Ru(II)]2 was 0.1 and 1  $\mu$ M in acetate buffers, when assaying *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$  and  $N = 2$ . \*\*\*,  $p$ -value  $\leq 0.001$ ; “ns”: non-significant.

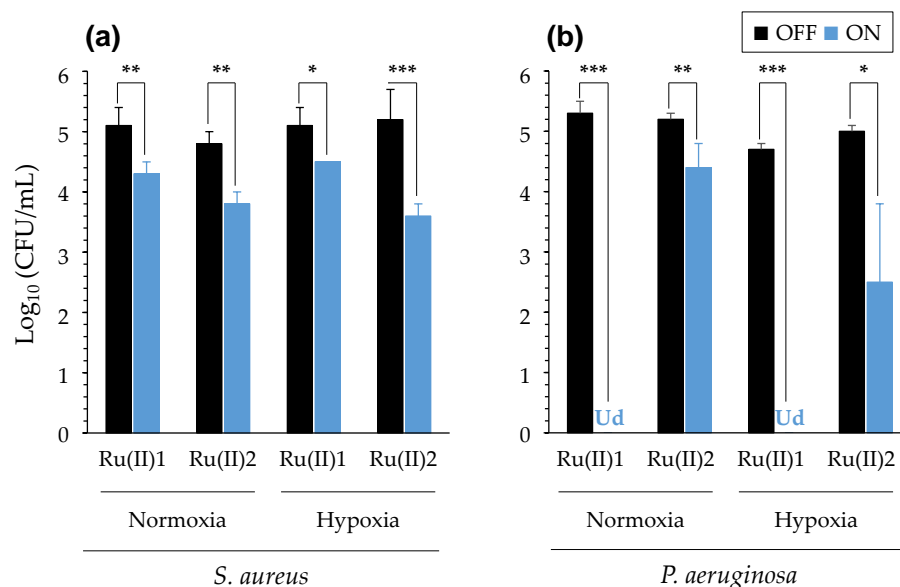
These results thus underscore that the pH of the environment can indeed impact, in multiple ways, the PDT activity of the two [Ru(II)] considered herein.

### 3.2.3. Impact of Reduced Oxygenation

Since CF patients suffer from impaired ventilation, and since oxygen is a pivotal parameter in PDT, the impact of reduced oxygenation was also important to study. First, we checked the possibility to achieve reduced oxygenation in solution by using oil deposition at the surface of the latter, with Janus Green B (JGB) being used as an oxygen indicator, as previously reported [44] (see Supplementary Materials Figure S7).

Then, the ability of both [Ru(II)] to achieve aPDT was compared in hypoxic versus normally oxygenated conditions (with or without oil deposition, respectively, with JGB

being no longer used). As shown in Figure 7, it was remarkable that, in both conditions evaluated, [Ru(II)]1 and [Ru(II)]2 exhibited almost similar aPDT efficiencies towards *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Although further investigations should be conducted, these results suggest that [Ru(II)] may exhibit PDT effects through an oxygen independent pathway, as suggested earlier for other PS by Hamblin and colleagues [47].



**Figure 7.** PDT effects of [Ru(II)] in normal or hypoxic media. Results were obtained with *S. aureus* RN4220 (a) and *P. aeruginosa* PA19660 (b). [Ru(II)]1 was 50 and 25  $\mu$ M, whereas [Ru(II)]2 was 0.1 and 1.25  $\mu$ M in 0.5X NaCl, when assaying *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$  (representative data of  $N = 4$ ). \*\*\*,  $p$ -value  $\leq 0.001$ ; \*\*,  $p$ -value  $\leq 0.01$ ; \*,  $p$ -value  $\leq 0.05$ . “Ud”: undetectable bacteria.

#### 3.2.4. Impact of Artificial Sputum Medium (ASM)

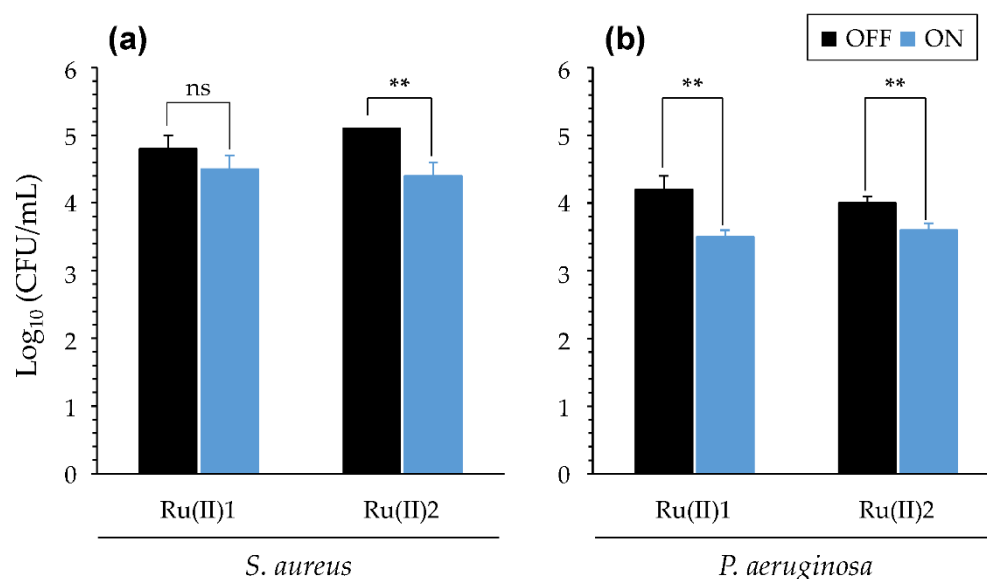
The ability of [Ru(II)] to exert aPDT effects on bacteria in ASM was also evaluated. As shown in (Figure S8), upon light treatment, no effects could be found with any [Ru(II)]. Taking into account the lesser ability of light to diffuse in ASM (Figure 2B), we adapted the procedure used for light treatment, using 15 min instead of 5 min at each step. Following such prolonged light treatment, some aPDT effects could be obtained (Figure 8). Indeed, in the experimental condition used, both [Ru(II)] slightly but significantly reduced the bacterial load of *P. aeruginosa*. On the other hand, only [Ru(II)]2 was able to do the same against *S. aureus*. Compared with the evaluations performed in other simpler media, ASM strongly impacted the ability of [Ru(II)] to exert aPDT. These results suggest that less efficient light penetration, but also some interaction of [Ru(II)] with some ASM component(s), could interfere with the ability of these PS to exert aPDT, reducing or abolishing the latter towards *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively.

### 3.3. PDT towards Bacteria Grown in Different Conditions

#### 3.3.1. PDT towards Polymicrobial Cultures

The ability of [Ru(II)] to inhibit planktonic bacteria was evaluated, using standardized inoculums of *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains. The latter were either used alone or were mixed at the same density, and then light treatment was performed either directly or after 4 h of co-cultivation. As shown in Figure S9, bacteria grew with the same efficiency in every condition considered, including in the presence of [Ru(II)], provided that light was not applied. However, when light treatment was performed, both [Ru(II)] were efficient to fully photo-inactivate *S. aureus*, irrespective of the culture condition, i.e., in mono and polymicrobial conditions. On the other hand, no aPDT effect was obtained towards

*P. aeruginosa* in the experimental condition considered. However, the full eradication of both bacteria could be obtained when increasing [Ru(II)] concentrations (not shown).



**Figure 8.** PDT effects of [Ru(II)] in ASM. Results were obtained with *S. aureus* RN4220 (a) and *P. aeruginosa* PA19660 (b) for prolonged irradiation. See Figure S8 for results obtained when using standard light treatment. [Ru(II)] concentration = 25  $\mu$ M in 1X ASM. Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$  and  $N = 2$ . \*\*,  $p$ -value  $\leq 0.01$ ; “ns”: non-significant.

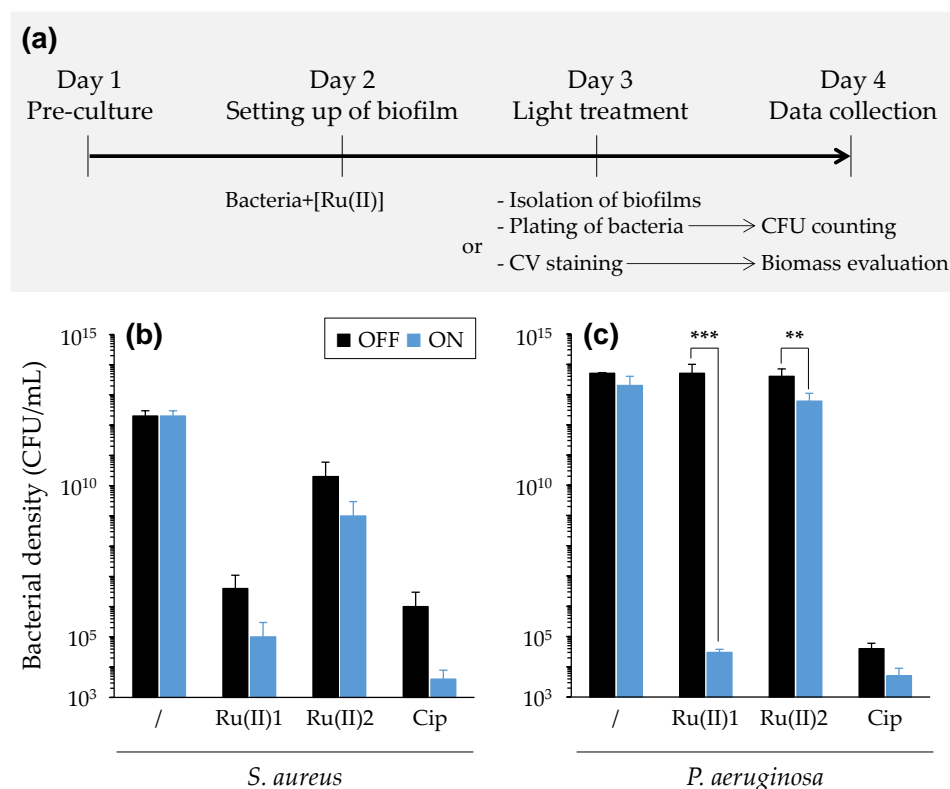
### 3.3.2. PDT towards Bacterial Biofilms

Antibiofilm PDT assays were performed considering the ability of [Ru(II)] to eradicate biofilms of either *S. aureus* or *P. aeruginosa*. For this purpose, the protocols originally described by Haney and colleagues [45] for assaying antibiotics or peptides were adapted for the evaluation of PS. In particular, a light treatment step was included, which here consisted of illuminating biofilm two times for 15 min, with an incubation time of 15 min under ambient light between each irradiation (“modified light treatment procedure”).

A first assay was conducted to determine the potency of [Ru(II)] incorporated into biofilm, thus bypassing the presumably limiting diffusion step in the latter. For doing so, planktonic bacteria were first mixed with a given [Ru(II)] (but without doing any light treatment at this stage). After incubation for 20 h under static conditions, planktonic bacteria in the supernatant were carefully discarded, and then light treatment was applied. Following this, cell viability and biomass were determined by bacterial enumeration and crystal violet staining, respectively (Figure 9). For *S. aureus* biofilm, both [Ru(II)] demonstrated some toxicity in the absence of specific light treatment, with significant ( $p < 0.001$ ) reductions in the bacterial load by six and two logs compared to biofilm control, respectively. The light treatment allowed enhancing this effect by one more log reduction. For *P. aeruginosa* biofilm, no dark toxicity was observed, with the same bacterial load being determined with or without any [Ru(II)] in the absence of light. Upon light treatment, the bacterial loads were reduced by nine and one log with [Ru(II)]1 and [Ru(II)]2, respectively (Figure 9). No difference with respect to biomass could be observed, regardless of the conditions evaluated (Figure S10).

In light of these encouraging results, complementary experiments were performed following a more conventional biofilm eradication assay [45,48]. Here, biofilm was settled using bacteria in the absence of any [Ru(II)]. Following incubation for 20 h under static conditions, the supernatant containing planktonic cells was discarded, and the biofilm was carefully washed before being exposed to either of the two [Ru(II)]. After light treatment was applied, antibiofilm effects were evaluated in different ways. First, the cell viability and metabolic state were determined with a resazurin assay (Figure S11). Upon light

treatment, no significant difference could be noticed in “control” conditions (i.e., with biofilms without any [Ru(II)]), whereas a significant reduction in dye absorbance was found in “test” conditions (i.e., with biofilms treated with [Ru(II)]1), which was dose-dependent (i.e., stronger for 50  $\mu$ M than 30  $\mu$ M of compound) with both *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Bacterial enumeration and CV staining were also carried out to further characterize biofilm eradication effects. Some reduction in the bacterial load in biofilm could be found, but with many variations (in difficult-to-reproduce experiments), and no modification of the total biomass could be underscored. Noticeably, the results suggest that the antibiofilm potency of [Ru(II)]1 following post-delivery may be superior to that of [Ru(II)]2, a finding in line with the results obtained in the “pre-delivery antibiofilm assay”.



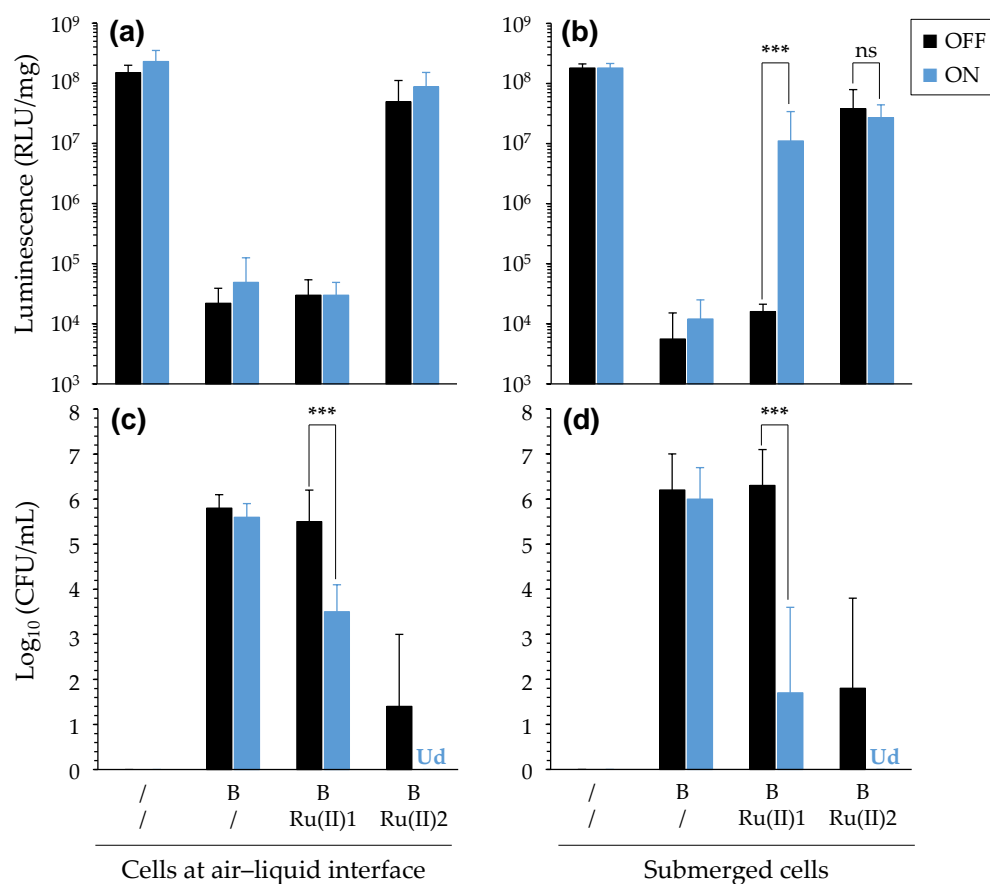
**Figure 9.** PDT effect of [Ru(II)] towards bacteria in biofilms (“pre-delivery antibiofilm assay”). The workflow of the experimentation is presented (a) with the results obtained when assaying *S. aureus* RN4220 (b) and *P. aeruginosa* PA19660 (c). Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$  and  $N = 3$ . \*\*\*,  $p$ -value  $\leq 0.001$ ; \*\*,  $p$ -value  $\leq 0.01$ . “Cip”: ciprofloxacin.

### 3.3.3. PDT towards Bacteria in the Presence of Eukaryotic Cells

Last, we investigated the ability of [Ru(II)] to display aPDT while not affecting a culture layer of eukaryotic cells. For this purpose, genetically modified human bronchial epithelial cells (CFBE-Luc) were used, and constitutive bioluminescence was used to monitor viability. These cells were cultivated either under submerged conditions or in porous inserts to better model the human airway at the air–liquid interface. In the latter condition, trans-epithelial electrical resistance measurements were used to assess the formation of tight junctions in the obtained epithelial monolayer (not shown). *P. aeruginosa* was mixed with either of the two [Ru(II)] before addition to the cells. After light treatment was applied, the bacterial mixture was replaced with a fresh medium (without antibiotics) for submerged cells, or it was discarded for cells cultured in inserts.

After incubation for 24 h, irrespective of the light treatment applied, bacteria without [Ru(II)] efficiently grew in both cell culture conditions, which resulted in a strongly reduced bioluminescence indicative of cell injuries/death due to the growing bacteria (Figure 10). When assaying [Ru(II)], quite similar results were obtained with submerged cells and

cells cultured at the air–liquid interface. With [Ru(II)]1, no dark toxicity towards bacteria was noticed, whereas the bacterial load was significantly reduced upon light irradiation. However, this effect was only partial, and bacteria were still able to grow to some extent. As a result, the cells were affected, particularly those cultured at the air–liquid interface, whereas those under submerged conditions still retained some metabolic activity (as reflected in quite-high-bioluminescence signals). When using [Ru(II)]2, it was noticeable that, although some dark toxicity towards bacteria occurred, light treatment allowed us to obtain a full eradication of bacteria. At the same time, cell viability was preserved, as demonstrated with bioluminescence levels similar to that of control non-infected cells (Figure 10). From these results, no obvious adverse effects towards CFBE-Luc attributable to [Ru(II)] were found.



**Figure 10.** PDT effects of [Ru(II)] in the presence of eukaryotic cells cultured in different conditions. Results were obtained when assaying bacteria (B) with CFBE-Luc cells, with the latter being cultivated either at the air–liquid interface (a,c) or under submerged conditions (b,d). Luminescence measurements ((a,b); expressed in the unit of RLU/mg of total protein) and CFU enumeration (c,d) were used to assess cell viability and antibacterial effects, respectively. Mean  $\pm$  SD with  $n = 3$  and  $N = 2$ . \*\*\*,  $p$ -value  $\leq 0.001$ ; “ns”: non-significant. “Ud”: undetectable.

#### 4. Discussion

[Ru(II)] may be used in many biomedical applications, notably to fight against pathogenic micro-organisms [20]. However, to date, these compounds have been considered and tested in experimental conditions usually far from clinical settings. Furthermore, their mechanism of action, which is required for obtaining approval for a given biomedical application, is not fully unveiled yet or has been investigated only under some specific conditions. In vivo studies—or studies performed under in vivo approaching conditions—using [Ru(II)] are still lacking, particularly for antimicrobial purposes [11,49]. In the present study, we questioned whether [Ru(II)]-based aPDT could be used to fight against lung pathogens

responsible for infections in CF patients, especially those in the advanced stages of the disease, for which the chronic use of multiple antibiotics and the resulting selection of MDR lung pathogens severely limits the options of antibiotic coverage [35].

CF lung disease could be eligible for treatment with aPDT for several reasons, including the following. (i) Lung airways can be targeted with a local administration method, especially via aerosol that allows one to obtain a high load of in situ active drugs with low systemic side-effects [50–52]. (ii) Because PDT reactions only occur in areas where the PS accumulates and light is applied, lung pathogens settling at the epithelium surface can be the first biological targets of PDT-induced oxidative stresses. (iii) Lungs are located inside the chest and are thus non-exposed to ambient light, which avoids or limits photosensitivity for the host. (iv) The residence time of inhaled drugs within the lungs determines the duration of antibacterial activity at the site of infection, which may be prolonged for metal cations due to slower pulmonary absorption compared with some antibiotics [51,53]. (v) CF airways are characterized with hypoxia, especially inside the mucus and biofilms where pathogens develop. Although O<sub>2</sub> has been claimed to be a pivotal element in PDT reactions, some evidence have been obtained recently for oxygen-independent photoinactivation of bacteria with some PS [47].

Besides these eligibility criteria, CF is characterized by many pathophysiological disorders, making lung infections particularly hard to treat. Loss-of-function mutations in the CFTR impair the efflux of anions such as chloride and bicarbonate across the apical membrane of the respiratory epithelial cells. This has many consequences, considering the multiple roles of bicarbonate secretion in the airways: HCO<sub>3</sub><sup>−</sup> notably drives ionic content and fluid on epithelial surfaces, regulates the local pH, allows mucins to unfold and become slippery and contributes to innate immunity. Slippery mucins are needed to trap microorganisms and transport them away from epithelial surfaces, whereas a neutral pH is needed for optimal bacterial killing by antimicrobial proteins such as defensins [54]. When CFTR is dysfunctional, the lack of bicarbonate secretion disrupts these normal processes. Electrolytic and osmolality imbalance results in the accumulation of highly viscous secretion, leading to recurrent infections and chronic colonization by opportunistic pathogens. Particularly, *P. aeruginosa* in the lungs of CF patients can grow to high densities in the stagnant mucopurulent secretions that are depleted in oxygen [55]. All these disturbances can impact the efficiency of antimicrobials [30]. Before this study, it was unclear whether [Ru(II)] could exert some aPDT under CF lung micro-environments.

In a previous study, 17 mononuclear, homo- or heteroleptic, ruthenium(II) polypyridyl complexes were evaluated regarding their ability to photo-inactivate bacterial clinical isolates [23]. This screening was carried out under standard in vitro conditions, using planktonic bacteria in phosphate-buffered saline (PBS) at a pH of 7.4. This allowed us to highlight the potent aPDT effects of some [Ru(II)] on CF-associated *P. aeruginosa* isolates. Among the compounds investigated, the highly hydrophilic [Ru(Phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> (PF<sub>6</sub><sup>−</sup>)<sub>2</sub> showed the highest <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quantum yield, but, likely due to a defect to stand in the near environment of bacteria, it was almost ineffective in the experimental condition considered. Contrastingly, the much less efficient <sup>1</sup>O<sub>2</sub> producer [Ru(Phen)<sub>2</sub>(Phen-T-Fluorenyl)]<sup>2+</sup> (PF<sub>6</sub><sup>−</sup>)<sub>2</sub> was highlighted as the most effective in that study. We speculated that this compound reached a compromise with respect to lipophilicity, which was found to negatively impact <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation but was required to efficiently interact with bacteria. Although these [Ru(II)] exhibited a common core, the engraftment of a (Phen-T-Fluorenyl) ligand was thus shown to strongly impact the photophysical and physicochemical properties determining photodynamic antibacterial effects.

To expand this work further, we here focused on the two above-mentioned [Ru(II)], herein noted as [Ru(II)]1 and [Ru(II)]2, respectively (Figure 1), to learn more details about bacterial photo-inactivation under a wider variety of experimental conditions than considered before [23] and better approaching CF lung disorders (Table S1). We first conceived and qualified a custom-built robust experimental system allowing us to perform multiple tests under various well-controlled experimental conditions (Figure 2). The protocol used

proved to be reproducible and efficient as a result of both the number of tests performed in parallel and the requirement of only a few (repeated twice) and short-lived (5 to 15 min each) successive irradiations. Considering the lower hydrophilicity of [Ru(II)]<sub>2</sub>, it was formulated with chlorides instead of hexafluorophosphates to increase water solubility. A stepwise complexified approach was followed to investigate the antibacterial photodynamic effect of [Ru(II)] when varying parameters related to environmental conditions.

(1) The photophysical characterizations of [Ru(II)] showed very different behaviors for the two [Ru(II)], likely primarily associated with their different water-solubilities. In particular, [Ru(II)]<sub>1</sub> absorption in the UV-visible spectrum was almost the same in water and in saline, whereas [Ru(II)]<sub>2</sub> absorption was disturbed in NaCl in a saline-dose-dependent manner. However, for NaCl concentrations in the range of that typically found in CF airways [56], the UV-vis spectrum of each compound was similar to that in water (Figure 3). Different abilities for <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and intracellular ROS generations were measured (Figure 4), further detailing the results previously obtained [23]. The assays conducted to study the interaction of [Ru(II)] with bacteria possibly leading to some membrane permeabilization allowed us to obtain insight into the potential mechanism(s) of action involved (Figures 5, S3 and S4). Collectively, these assays underpinned the main role of osmotic strength and the composition of the surrounding medium determining, in different ways, the ability of [Ru(II)] to display photodynamic properties.

(2) The impact of different parameters on aPDT during illumination was then assessed, including salinity (Table 1), pH (Figure 6) and oxygen availability (Figure 7). In many cases, contrastive results were obtained with the two [Ru(II)] evaluated. PDT towards bacteria in ASM could also be measured, provided that the light treatment was adapted, underscoring the impact of complex medium compositions and the need for sufficient light diffusion to activate [Ru(II)] (Figure 8). These results are consistent with findings reported earlier with other PS [57].

(3) Bacteria grown in different conditions were finally evaluated to better take into account CF lung infectious conditions. The latter is a complex lifelong evolving polymicrobial disease, typically characterized with “a switching” between *S. aureus* (early colonizer) and *P. aeruginosa* (predominant in adulthood), which constitutes a turning point in the disease [58]. Particularly, *P. aeruginosa* adopts a biofilm lifestyle that allows this pathogen to elude antimicrobials while reaching high titers. (i) Here, we demonstrated the possibility to use [Ru(II)] in photoinactivation of a given bacteria, whether it was cultivated alone or mixed with another species (Figure S9). (ii) Biofilm eradication assays were also carried out, according to two experimental set-ups, which we named pre-delivery and post-delivery methods, depending on the timing of the addition of [Ru(II)] to bacteria with respect to the biofilm formation. In independent experiments, some obvious effects were obtained showing antibiofilm effects of [Ru(II)] either entrapped in or even deposited at the surfaces of biofilms. Remarkably, upon light irradiation, “pre-delivered” [Ru(II)]<sub>1</sub> strongly reduced the bacterial load in *P. aeruginosa* biofilm, as efficiently as an antibiotic used as a positive control (Figure 9). Following the post-delivery method, some PDT effect on the metabolism of bacteria in biofilms was demonstrated (Figure S11), which could be associated with some variable reductions in the bacterial load in biofilms (not shown); however, in every case, no modification of the total biomass could be found (not shown). The ability of [Ru(II)] to exert some aPDT effect even from the surfaces of biofilms suggests that the diffusion of ROS was not prevented by the biofilm thickness. These results are actually in accordance with observations reported before with other PS [59]. However, it is obvious that weaker effects were obtained when assaying compounds following the post-delivery method; this clearly points out the limited ability of [Ru(II)] to diffuse and get close to the target bacteria in biofilms, due at least in part to the biofilm composition and the high amount of slim especially produced by PA19660. If this limitation is circumvented (such as experimentally performed in this study; Figure 9), [Ru(II)] can exert potent PDT effects against biofilm-growing bacteria, despite the presence of extracellular polymeric substances, and towards bacteria at different growth stages. It is noteworthy here that complementary assays indeed

showed the potential of [Ru(II)] to act on bacteria growing in either stationary or exponential phases (not shown). Besides this, the demonstration of aPDT from biofilm-embedded [Ru(II)] is consistent with the demonstration of the ability of [Ru(II)] to retain some activity in less oxygenated conditions (Figure 7). In light of the above, we can speculate that [Ru(II)] may display PDT effects through different photochemical pathways, including an oxygen-independent mechanism [47]. This warrants further investigations to determine whether [Ru(II)] can actually retain their activity under the almost-anaerobic conditions that can be found in CF airways [60]. (iii) Last, we highlighted the potential of [Ru(II)] towards bacteria grown in the presence of eukaryotic cells. Oxidative stress targeting bacteria could be obtained while preserving underlying cell cultures either in submerged conditions or at the air–liquid interface (Figure 10).

All combined, the results obtained gauge the potential of [Ru(II)] under specific conditions approaching CF lung infections. This study further confirmed the potential of [Ru(II)]<sub>2</sub>, as shown in our previous study that used less optimized illumination systems [23]. Furthermore, salinity is clearly identified as a main limitation for [Ru(II)]-based PDT. However, we herein demonstrate that modulating the experimental conditions can drastically modify the ability of a given [Ru(II)] to exert aPDT; an ineffective compound could indeed become effective under adapted experimental conditions allowing to overcome its limitations. However, it is noteworthy that, depending on the various conditions evaluated, one or the other [Ru(II)] performed more efficiently.

Following the present study, several optimizations can be proposed addressing the chemical structure and/or the formulation of the bare compounds evaluated herein. It is indeed obvious that the [Ru(II)] considered may be optimized or replaced by other candidates, and from this point of view, there is ample room for improvement. The results obtained with [Ru(II)] suggest that they may be highly efficient, provided their respective drawbacks are bypassed, which may be done following different strategies. For instance, PEGylated derivatives of [Ru(II)] may be less prone to aggregation and precipitation while showing improved mucus penetration and antimicrobial activity against bacterial biofilms, as recently reported, for instance, for tobramycin [61]. Derivatives triggered with two-photon absorption in near-infrared (NIR) or IR could allow for a better penetration of the excited beam [24,25,62], which may be crucial for targeting infections in deep organs, such as the lungs. The encapsulation of ruthenium complexes has also been reported as a means to overcome the limitations of PS in biological fluids [63,64]. By providing additional specificity for the bacteria to eliminate, these strategies may allow for avoiding/reducing adverse events in CF patients in which a sub-optimal antioxidant protection was reported as a cause of pre-existing oxidative stress [65].

The study design used herein allowed highlighting the impact of multiple parameters typical of CF lung pathophysiology, especially increased osmotic strength, acidic pH, lower oxygen availability, mucus secretion and biofilm formation. Other parameters should be considered, such as lung surfactant, as evaluated with other PS [66]. Some technical optimizations are anticipated in follow-up studies for better assessing the actual feasibility to perform efficient aPDT in CF lung airways. The optimization of light treatment is crucial, as suggested with prolonged illuminations that herein allowed us to achieve better results when assaying complex samples such as ASM and biofilms. In line with a complexification by the incremental implementation of multiple barriers, it can also be informative to perform assays using ALI cultures of primary human bronchial epithelial cells, producing mucus that could be colonized with biofilm-forming lung pathogens, thus better recapitulating CF lung disease [67]. This integrated approach should be used before eventual evaluations conducted *in vivo* in animals, in accordance with the 3R rule in animal experimentation. Although investigations using CF animal models can provide additional clues, it is noteworthy that currently available *in vivo* models are still not fully satisfying, since they fail to recapitulate the disease, as observed in CF humans. Notably, the lung pathology is milder in mouse models compared to humans, and CF mice do not

spontaneously develop airway infections [68]. Thus, studies performed under in vitro experimental conditions remain crucial.

## 5. Conclusions

This study aimed to provide proof of principle for a potential therapeutic use of [Ru(II)]-based aPDT in CF lung airways. Beyond the obvious importance of the molecular engineering of [Ru(II)], this work corroborates that multiple conditions must be met to reach optimal activities. We indeed point out that microbial photo-inactivation can be impacted by environmental features characteristic of the pathophysiological context of CF lung airways. Accordingly, this study may be used to define requirement specifications and guidelines for aPDT in this specific biological context and to design dedicated [Ru(II)] derivatives. In addition, the use of an appropriate administration route and method to ensure safe and efficient in situ light activation is required. Intensive works are currently ongoing on these topics in our laboratories. In conclusion, metal complexes such as [Ru(II)] constitute credible candidates for combating lung infections as a result of their unique photodynamic properties and also other modes of action, including redox activation, ligand exchange and the depletion of substrates involved in cellular processes [14,15,69]. Further research will allow for the gaining of breadth and depth in the utility and feasibility of [Ru(II)] for application in CF lung airways.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14081664/s1>, Table S1: Patho-physiological disorders typically found in lung airways of CF patients that could interfere with aPDT; Table S2: Bacteria used and their characteristics; Table S3: Volumes of acetic acid and sodium acetate stock solutions to mix for obtaining buffers at desired pH; Figure S1: Further characterizations of the illumination set-up; Figure S2: Impact of light treatment on UV-visible spectra of [Ru(II)] in water or in saline solutions; Figure S3: Production of singlet oxygen upon light treatment of [Ru(II)] in different conditions; Figure S4: Interaction assay between [Ru(II)] and bacteria when mixed either in water or in 1X NaCl; Figure S5: [Ru(II)] effects on cell surface integrity of bacteria; Figure S6: Growth kinetics of bacteria following transient incubation in acetate buffers at various pH; Figure S7: Assessment of hypoxic conditions with oil deposition at the surface of the medium; Figure S8: PDT effects of [Ru(II)] in ASM; Figure S9: PDT effects of [Ru(II)] on *S. aureus* when cultured alone (A) or in mixtures (M) with *P. aeruginosa*; Figure S10: Biomass quantification via crystal violet (CV) staining; Figure S11: PDT effects of [Ru(II)] towards bacteria in biofilms (“post-delivery antibiofilm assay”).

**Author Contributions:** Conceptualization: T.L.G., R.Y., A.N., M.M., F.T., T.H., R.G., U.J., H.S., G.L. and T.M.; data curation: T.L.G., R.Y. and A.N.; formal analysis: T.L.G., R.Y., A.N., M.M., F.T., T.H., R.G., U.J., H.S., G.L. and T.M.; funding acquisition: T.L.G., M.M., F.T., U.J., H.S., G.L. and T.M.; investigation: T.L.G., R.Y., A.N., M.M. and T.M.; methodology: T.L.G., R.Y., A.N. and M.M.; project administration: T.L.G. and T.M.; resources: T.L.G., R.Y., A.N., M.M., T.H., R.G., U.J., H.S., G.L. and T.M.; supervision: T.L.G.; validation: T.L.G., R.Y., A.N., M.M., F.T., T.H., R.G., U.J., H.S., G.L. and T.M.; writing—original draft preparation: T.L.G. and R.Y.; writing—review and editing: T.L.G., R.Y., A.N., M.M., F.T., T.H., R.G., U.J., H.S., G.L. and T.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by a grant from ANR/BMBF (TARGET-THERAPY; PIs: Tony Le Gall and Holger Schönherr; ANR grant number: ANR-20-AMRB-0009, RPV21103NNA; BMBF Förderkennzeichen: 16GW0342). Financial support was also obtained from the “Association de Transfusion Sanguine et de Biogénétique Gaétan Saleün” (France) and the “Conseil Régional de Bretagne” (France). Raphaëlle Youf is a recipient of a PhD fellowship from the French “Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” (Paris, France).

**Data Availability Statement:** The raw/processed data required to reproduce these findings are either available from the supporting materials or cannot be shared at this time, as the data also form a part of ongoing studies.

**Acknowledgments:** We are grateful to Lhousseine Touqui and Frédéric Tewes for scientific support and expertise. We also acknowledge Alizé Hascoët for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

### Abbreviations

ALI, air–liquid interface; aPDT, antimicrobial photodynamic therapy; ASL, airway surface liquid; ASM, artificial sputum medium; CF, cystic fibrosis; CFBE-Luc, bioluminescent cystic fibrosis bronchial epithelial cell line; CFU, colony forming unit; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; JGB, janus green B; LED, light emitting diode; MDR, multidrug-resistant; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; OFF, non-illuminated; ON, subjected to light treatment; Phen, 1,10-phenanthroline; PI, propidium iodide; PS, photosensitizer; RFU, relative fluorescence unit; RLU, relative luminescence unit; ROS, reactive oxygen species; RT, room temperature; [Ru(II)], ruthenium(II) polypyridyl complexes; SOSG, singlet oxygen sensor green; TEER, trans-epithelial electrical resistance;  $^1\text{O}_2$ , singlet oxygen.

### References

- Dai, T.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M.R. Photodynamic Therapy for Localized Infections—State of the Art. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2009**, *6*, 170–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R. Photoantimicrobials—Are We Afraid of the Light? *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, e49–e55. [[CrossRef](#)]
- Youf, R.; Müller, M.; Balasini, A.; Thétiot, F.; Müller, M.; Hascoët, A.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hamblin, M.R.; Hasan, T. Photodynamic Therapy: A New Antimicrobial Approach to Infectious Disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 436–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chen, J.; Fan, T.; Xie, Z.; Zeng, Q.; Xue, P.; Zheng, T.; Chen, Y.; Luo, X.; Zhang, H. Advances in Nanomaterials for Photodynamic Therapy Applications: Status and Challenges. *Biomaterials* **2020**, *237*, 119827. [[CrossRef](#)]
- Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy—Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098–1107. [[CrossRef](#)]
- Pereira Rosa, L. Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. *J. Med. Microb. Diagn.* **2014**, *3*, 4. [[CrossRef](#)]
- Hu, X.; Huang, Y.-Y.; Wang, Y.; Wang, X.; Hamblin, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1299. [[CrossRef](#)]
- Pérez-Laguna, V.; Gilaberte, Y.; Millán-Lou, M.I.; Agut, M.; Nonell, S.; Rezusta, A.; Hamblin, M.R. A Combination of Photodynamic Therapy and Antimicrobial Compounds to Treat Skin and Mucosal Infections: A Systematic Review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1020–1029. [[CrossRef](#)]
- Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 539. [[CrossRef](#)]
- Jakubaszek, M.; Goud, B.; Ferrari, S.; Gasser, G. Mechanisms of Action of Ru(II) Polypyridyl Complexes in Living Cells upon Light Irradiation. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13040–13059. [[CrossRef](#)]
- Silva, Z.S.; Bussadori, S.K.; Fernandes, K.P.S.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M.R. Animal Models for Photodynamic Therapy (PDT). *Biosci. Rep.* **2015**, *35*, e00265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cieplik, F.; Deng, D.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy—What We Know and What We Don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44*, 571–589. [[CrossRef](#)]
- Frei, A. Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential? *Antibiotics* **2020**, *9*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Frei, A.; Zuegg, J.; Elliott, A.G.; Baker, M.; Braese, S.; Brown, C.; Chen, F.; Dowson, C.G.; Dujardin, G.; Jung, N.; et al. Metal Complexes as a Promising Source for New Antibiotics. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2627–2639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Spesia, M.B.; Durantini, E.N. Evolution of Phthalocyanine Structures as Photodynamic Agents for Bacteria Inactivation. *Chem. Rec.* **2022**, *22*, e202100292. [[CrossRef](#)]
- Mottais, A.; Berchel, M.; Le Gall, T.; Sibiril, Y.; d'Arbonneau, F.; Laurent, V.; Jaffrès, P.-A.; Montier, T. Antibacterial and Transfection Activities of Nebulized Formulations Incorporating Long N-Alkyl Chain Silver N-Heterocyclic Carbene Complexes. *Int. J. Pharm.* **2019**, *567*, 118500. [[CrossRef](#)]
- Rodríguez, I.; Fernández-Vega, L.; Maser-Figueroa, A.N.; Sang, B.; González-Pagán, P.; Tinoco, A.D. Exploring Titanium(IV) Complexes as Potential Antimicrobial Compounds. *Antibiotics* **2022**, *11*, 158. [[CrossRef](#)]

19. Frei, A.; Ramu, S.; Lowe, G.J.; Dinh, H.; Semenc, L.; Elliott, A.G.; Zuegg, J.; Deckers, A.; Jung, N.; Bräse, S.; et al. Platinum Cyclooctadiene Complexes with Activity against Gram-positive Bacteria. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 3165–3171. [[CrossRef](#)]
20. Munteanu, A.-C.; Uivarosi, V. Ruthenium Complexes in the Fight against Pathogenic Microorganisms. An Extensive Review. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 874. [[CrossRef](#)]
21. Knežević, N.Ž.; Stojanovic, V.; Chaix, A.; Bouffard, E.; Cheikh, K.E.; Morère, A.; Maynadier, M.; Lemerrier, G.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; et al. Ruthenium(II) Complex-Photosensitized Multifunctionalized Porous Silicon Nanoparticles for Two-Photon near-Infrared Light Responsive Imaging and Photodynamic Cancer Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 1337–1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Li, F.; Collins, J.G.; Keene, F.R. Ruthenium Complexes as Antimicrobial Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2529–2542. [[CrossRef](#)]
23. Le Gall, T.; Lemerrier, G.; Chevreux, S.; Tücking, K.-S.; Ravel, J.; Thétiot, F.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Montier, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure-Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2229–2239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lemerrier, G.; Four, M.; Chevreux, S. Two-Photon Absorption Properties of 1,10-Phenanthroline-Based Ru(II) Complexes and Related Functionalized Nanoparticles for Potential Application in Two-Photon Excitation Photodynamic Therapy and Optical Power Limiting. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *368*, 1–12. [[CrossRef](#)]
25. Karges, J.; Kuang, S.; Maschietto, F.; Blacque, O.; Ciofini, I.; Chao, H.; Gasser, G. Rationally Designed Ruthenium Complexes for 1- and 2-Photon Photodynamic Therapy. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3262. [[CrossRef](#)]
26. Cutting, G.R. Cystic Fibrosis Genetics: From Molecular Understanding to Clinical Application. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Castellani, C.; Assael, B.M. Cystic Fibrosis: A Clinical View. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 129–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ghanem, R.; Roquefort, P.; Ramel, S.; Laurent, V.; Haute, T.; Le Gall, T.; Aubry, T.; Montier, T. Apparent Yield Stress of Sputum as a Relevant Biomarker in Cystic Fibrosis. *Cells* **2021**, *10*, 3107. [[CrossRef](#)]
29. Hurley, M.N.; McKeever, T.M.; Prayle, A.P.; Fogarty, A.W.; Smyth, A.R. Rate of Improvement of CF Life Expectancy Exceeds That of General Population—Observational Death Registration Study. *J. Cyst. Fibros.* **2014**, *13*, 410–415. [[CrossRef](#)]
30. den Bossche, S.V.; Broe, E.D.; Coenye, T.; Braeckel, E.V.; Crabbé, A. The Cystic Fibrosis Lung Microenvironment Alters Antibiotic Activity: Causes and Effects. *Eur. Respir. Rev.* **2021**, *30*, 210055. [[CrossRef](#)]
31. Stewart, P.S.; Costerton, J.W. Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135–138. [[CrossRef](#)]
32. Chmiel, J.F.; Aksamit, T.R.; Chotirmall, S.H.; Dasenbrook, E.C.; Elborn, J.S.; LiPuma, J.J.; Ranganathan, S.C.; Waters, V.J.; Ratjen, F.A. Antibiotic Management of Lung Infections in Cystic Fibrosis. I. The Microbiome, Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, Gram-Negative Bacteria, and Multiple Infections. *Ann. ATS* **2014**, *11*, 1120–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Fischer, D.R.; Namanny, H.; Zobel, J.T. Follow-up Survey of the Utilization of Anti-Pseudomonal Beta-Lactam Antibiotics at U.S. Cystic Fibrosis Centers: Follow-Up Survey of the Utilization of Anti-Pseudomonal. *Pediatr. Pulmonol.* **2016**, *51*, 668–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wagener, J.S.; Rasouliyan, L.; VanDevanter, D.R.; Pasta, D.J.; Regelman, W.E.; Morgan, W.J.; Konstan, M.W. Oral, Inhaled, and Intravenous Antibiotic Choice for Treating Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **2013**, *48*, 666–673. [[CrossRef](#)]
35. Sherrard, L.J.; Tunney, M.M.; Elborn, J.S. Antimicrobial Resistance in the Respiratory Microbiota of People with Cystic Fibrosis. *Lancet* **2014**, *384*, 703–713. [[CrossRef](#)]
36. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. Available online: <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed on 29 June 2018).
37. Moser, C.; Thomsen, T.R.; Høiby, N. Next Generation Microbiology and Cystic Fibrosis Diagnostics: Are We There Yet? *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2018**, *24*, 599–605. [[CrossRef](#)]
38. Pailhoriès, H.; Herrmann, J.-L.; Velo-Suarez, L.; Lamoureux, C.; Beauruelle, C.; Burgel, P.-R.; Héry-Arnaud, G. Antibiotic Resistance in Chronic Respiratory Diseases: From Susceptibility Testing to the Resistome. *Eur. Respir. Rev.* **2022**, *31*, 210259. [[CrossRef](#)]
39. Nair, D.; Memmi, G.; Hernandez, D.; Bard, J.; Beaume, M.; Gill, S.; Francois, P.; Cheung, A.L. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus Aureus* Strain RN4220, a Key Laboratory Strain Used in Virulence Research, Identifies Mutations That Affect Not Only Virulence Factors but Also the Fitness of the Strain. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 2332–2335. [[CrossRef](#)]
40. Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Nagai, Y.; et al. Whole Genome Sequencing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Lancet* **2001**, *357*, 1225–1240. [[CrossRef](#)]
41. Le Gall, T.; Berchel, M.; Le Hir, S.; Fraix, A.; Salaün, J.Y.; Férec, C.; Lehn, P.; Jaffres, P.-A.; Montier, T. Arsonium-Containing Lipophosphoramides, Poly-Functional Nano-Carriers for Simultaneous Antibacterial Action and Eukaryotic Cell Transfection. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 1513–1524. [[CrossRef](#)]
42. Goncz, K.K.; Kunzelmann, K.; Xu, Z.; Gruenert, D.C. Targeted Replacement of Normal and Mutant CFTR Sequences in Human Airway Epithelial Cells Using DNA Fragments. *Hum. Mol. Genet.* **1998**, *7*, 1913–1919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sriramulu, D.D.; Lünsdorf, H.; Lam, J.S.; Römling, U. 2005 Microcolony Formation: A Novel Biofilm Model of *Pseudomonas Aeruginosa* for the Cystic Fibrosis Lung. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 667–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Saxena, S.; Agrawal, I.; Singh, P.; Jha, S. Portable, Low-Cost Hypoxia Chamber for Simulating Hypoxic Environments: Development, Characterization and Applications. *Med. Devices Sens.* **2020**, *3*, e10064. [[CrossRef](#)]

45. Haney, E.F.; Trimble, M.J.; Hancock, R.E.W. Microtiter Plate Assays to Assess Antibiofilm Activity against Bacteria. *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 2615–2632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Girardot, C.; Lemerrier, G.; Mulatier, J.-C.; Chauvin, J.; Baldeck, P.L.; Andraud, C. Novel Ruthenium(II) and Zinc(II) Complexes for Two-Photon Absorption Related Applications. *Dalton Trans.* **2007**, 3421–3426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hamblin, M.R.; Abrahamse, H. Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism? *Antibiotics* **2020**, *9*, 53. [[CrossRef](#)]
48. Dalecki, A.G.; Crawford, C.L.; Wolschendorf, F. Targeting Biofilm Associated Staphylococcus Aureus Using Resazurin Based Drug-Susceptibility Assay. *J. Vis. Exp.* **2016**, *111*, e53925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Heinemann, F.; Karges, J.; Gasser, G. Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2727–2736. [[CrossRef](#)]
50. Le Gall, T.; Berchel, M.; Davies, L.; Mottais, A.; Ghanem, R.; Fautrel, A.; Gill, D.; Hyde, S.; Lehn, P.; Lehn, J.-M.; et al. Aerosol-Mediated Non-Viral Lung Gene Therapy: The Potential of Aminoglycoside-Based Cationic Liposomes. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 25. [[CrossRef](#)]
51. Brillault, J.; Tewes, F. Control of the Lung Residence Time of Highly Permeable Molecules after Nebulization: Example of the Fluoroquinolones. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, E387. [[CrossRef](#)]
52. Kassab, G.; Geralde, M.C.; Inada, N.M.; Achilles, A.E.; Guerra, V.G.; Bagnato, V.S. Nebulization as a Tool for Photosensitizer Delivery to the Respiratory Tract. *J. Biophotonics* **2019**, *12*, e201800189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lamy, B.; Tewes, F.; Serrano, D.R.; Lamarche, I.; Gobin, P.; Couet, W.; Healy, A.M.; Marchand, S. New Aerosol Formulation to Control Ciprofloxacin Pulmonary Concentration. *J. Control. Release* **2018**, *271*, 118–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Abou Alaiwa, M.H.; Reznikov, L.R.; Gansemer, N.D.; Sheets, K.A.; Horswill, A.R.; Stoltz, D.A.; Zabner, J.; Welsh, M.J. PH Modulates the Activity and Synergism of the Airway Surface Liquid Antimicrobials  $\beta$ -Defensin-3 and LL-37. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 18703–18708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Worlitzsch, D.; Tarran, R.; Ulrich, M.; Schwab, U.; Cekici, A.; Meyer, K.C.; Birrer, P.; Bellon, G.; Berger, J.; Weiss, T.; et al. Effects of Reduced Mucus Oxygen Concentration in Airway Pseudomonas Infections of Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 317–325. [[CrossRef](#)]
56. Saint-Criq, V.; Gray, M.A. Role of CFTR in Epithelial Physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 93–115. [[CrossRef](#)]
57. Donnelly, R.F.; McCarron, P.A.; Cassidy, C.M.; Elborn, J.S.; Tunney, M.M. Delivery of Photosensitizers and Light through Mucus: Investigations into the Potential Use of Photodynamic Therapy for Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Cystic Fibrosis Pulmonary Infection. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 217–226. [[CrossRef](#)]
58. Pernet, E.; Guillemot, L.; Burgel, P.-R.; Martin, C.; Lambeau, G.; Sermet-Gaudelus, I.; Sands, D.; Leduc, D.; Morand, P.C.; Jeammet, L.; et al. Pseudomonas Aeruginosa Eradicates Staphylococcus Aureus by Manipulating the Host Immunity. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5105. [[CrossRef](#)]
59. Quishida, C.C.C.; Carmello, J.C.; Mima, E.G.d.O.; Bagnato, V.S.; Machado, A.L.; Pavarina, A.C. Susceptibility of Multispecies Biofilm to Photodynamic Therapy Using Photodithazine<sup>®</sup>. *Lasers Med. Sci.* **2015**, *30*, 685–694. [[CrossRef](#)]
60. Lamoureux, C.; Guilloux, C.-A.; Beauruelle, C.; Gouriou, S.; Ramel, S.; Dirou, A.; Le Bihan, J.; Revert, K.; Ropars, T.; Lagrèfeuille, R.; et al. An Observational Study of Anaerobic Bacteria in Cystic Fibrosis Lung Using Culture Dependent and Independent Approaches. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6845. [[CrossRef](#)]
61. Bahamondez-Canas, T.F.; Zhang, H.; Tewes, F.; Leal, J.; Smyth, H.D.C. PEGylation of Tobramycin Improves Mucus Penetration and Antimicrobial Activity against Pseudomonas Aeruginosa Biofilms in Vitro. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 1643–1652. [[CrossRef](#)]
62. Boca, S.C.; Four, M.; Bonne, A.; van der Sanden, B.; Astilean, S.; Baldeck, P.L.; Lemerrier, G. An Ethylene-Glycol Decorated Ruthenium(II) Complex for Two-Photon Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* **2009**, *31*, 4590–4592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bœuf, G.; Roullin, G.V.; Moreau, J.; Van Gulick, L.; Zambrano Pineda, N.; Terryn, C.; Ploton, D.; Andry, M.C.; Chuburu, F.; Dukic, S.; et al. Encapsulated Ruthenium(II) Complexes in Biocompatible Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles for Application in Photodynamic Therapy. *Chempluschem* **2014**, *79*, 171–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Soliman, N.; Sol, V.; Ouk, T.-S.; Thomas, C.M.; Gasser, G. Encapsulation of a Ru(II) Polypyridyl Complex into Polylactide Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Galli, F.; Battistoni, A.; Gambari, R.; Pompella, A.; Bragonzi, A.; Pilolli, F.; Iuliano, L.; Piroddi, M.; Dehecchi, M.C.; Cabrini, G. Oxidative Stress and Antioxidant Therapy in Cystic Fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 690–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kassab, G.; Diaz Tovar, J.S.; Souza, L.M.P.; Costa, R.K.M.; Silva, R.S.; Pimentel, A.S.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Lung Surfactant Negatively Affects the Photodynamic Inactivation of Bacteria-in Vitro and Molecular Dynamic Simulation Analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2123564119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ghanem, R.; Laurent, V.; Roquefort, P.; Haute, T.; Ramel, S.; Gall, T.L.; Aubry, T.; Montier, T. Optimizations of In Vitro Mucus and Cell Culture Models to Better Predict In Vivo Gene Transfer in Pathological Lung Respiratory Airways: Cystic Fibrosis as an Example. *Pharmaceutics* **2020**, *13*, 47. [[CrossRef](#)]

- 
68. Semaniakou, A.; Croll, R.P.; Chappe, V. Animal Models in the Pathophysiology of Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **2019**, *9*, 1475. [[CrossRef](#)]
  69. Anthony, E.J.; Bolitho, E.M.; Bridgewater, H.E.; Carter, O.W.L.; Donnelly, J.M.; Imberti, C.; Lant, E.C.; Lermyte, F.; Needham, R.J.; Palau, M.; et al. Metalodrugs Are Unique: Opportunities and Challenges of Discovery and Development. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 12888–12917. [[CrossRef](#)]

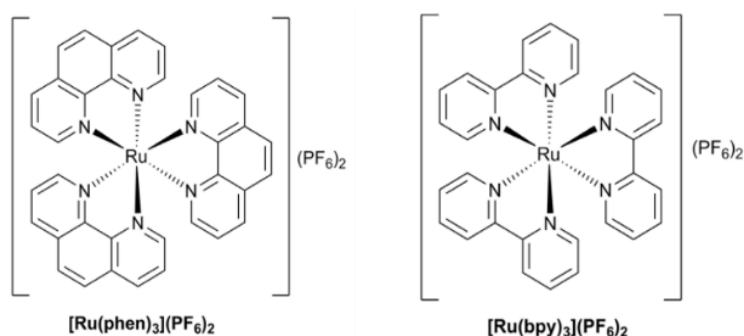
## 1.2. Diffusion à travers le mucus et le biofilm

D'après l'étude présentée précédemment [186], les paramètres identifiés comme étant les plus limitants à l'efficacité de [Ru(II)]-PDT sont les barrières physiologiques extracellulaires bronchopulmonaires, i.e. le mucus et la matrice du biofilm. Dans l'étude suivante, la capacité des [Ru(II)] à diffuser dans ces matrices et à y produire de l'oxygène singulet a été étudiée. Ce draft, initialement présenté sous forme de poster au congrès *Eurobiofilm2022*, a été rédigé en vue d'une soumission au Journal *Biofilm*.

### *Nota Bene*

Dans l'étude réalisée précédemment, le complexe nommé [Ru(II)]1 [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> avaient démontré, si on prend en compte l'ensemble des facteurs environnementaux considérés, des résultats encourageants mais moins importants que le deuxième composé nommé [Ru(II)]2 ([Ru(Phen)<sub>2</sub>(Phen-T-Fluorenyl)]<sup>2+</sup>(Cl)<sub>2</sub>[Ru(II)]). En revanche, les facteurs les plus limitants pour l'application PDT sont le biofilm et le mucus. En effet, en condition biofilm, l'efficacité du [Ru(II)]2 était considérablement diminuée. L'étude suivante sera centrée essentiellement sur ces deux paramètres, ce qui limite l'intérêt du [Ru(II)]2.

Pour cette nouvelle étude, un autre composé, commercial comme le [Ru(II)]1, a été sélectionné: le [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, dont la terminologie utilisée sera, dans ce draft, [Ru(II)]2. La différence chimique majeure entre [Ru(II)]1 et ce PS provient de la nature du ligand bidentale utilisé pour former les complexes, à savoir la 1,10-Phénanthroline pour [Ru(II)]1, et la 2,2'-Bipyridine pour [Ru(II)]2 (comme illustré dans la figure ci-dessous). L'efficacité de ce PS comme agent de PDT antimicrobienne n'a pas encore été décrit dans la littérature.



**Figure complémentaire.** Structure de [Ru(II)]1, [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, et [Ru(II)]2, [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, utilisés pour cette étude (D'après Ena T. Luis, et al., 2016)

# **Impact of biofilm and mucus on antimicrobial photodynamic therapy using Ruthenium(II) polypyridyl complexes in CF context**

Raphaëlle Youf, et al

## **INTRODUCTION**

La Mucoviscidose (CF) est une maladie génétique héréditaire caractérisée par la présence de mutation(s) au sein du gène *CFTR* [1]. Ses mutations ont pour conséquence de produire une protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) dysfonctionnelle ou absente, ce qui mène à des manifestations cliniques dans de nombreux organes, et tout particulièrement, dans les voies respiratoires et digestives [2]. Au sein des poumons, la production de mucus épais combinée à une inflammation chronique confère un milieu propice à la colonisation microbienne [3]. Par ailleurs, l'ensemble des dérèglements physiologiques pulmonaires (impactant en particulier le pH, la salinité, et l'oxygénation) conduisent à la formation d'un microenvironnement contribuant à la diminution de l'efficacité de l'antibiothérapie actuelle [4,5]. Les principaux pathogènes retrouvés, *S. aureus* et *P. aeruginosa*, sont deux bactéries possédant une forte plasticité génétique et phénotypique, ce qui leur permet de contourner l'activité de nombreux antibiotiques [6,7]. Par exemple, éradiquer un biofilm peut nécessiter l'utilisation de doses d'antibiotiques 10 à 1000 fois plus importantes que celles utilisées en planctonique pour atteindre une efficacité antimicrobienne similaire [8,9]. Les biofilms sont définis comme étant des agrégats bactériens en contact avec une surface qui peuvent être composés d'une seule espèce (biofilm monomicrobien) ou d'une communauté de microorganismes (biofilm polymicrobien) [10]. Ils sont caractérisés par la production d'une matrice adhésive et protectrice, composée majoritairement d'eau, de polysaccharides et d'ADN extracellulaire. Chez les patients atteints de mucoviscidose (ci-après notés patients CF), le biofilm en son ensemble forme une barrière physiologique diminuant l'efficacité des antibiotiques, qu'ils soient administrés par voie intraveineuse ou par aérosol [11,12].

De plus, chez ces patients, le mucus, complexifie l'efficacité des antimicrobiens de par ses propriétés physico-chimiques et rhéologiques [13,14]. La production de biofilm dans le mucus forme une barrière biologique extrêmement difficile à franchir pour de nombreux agents thérapeutiques, qu'ils soient antimicrobiens, anti-inflammatoires ou à visée curative [15–18].

La thérapie photodynamique (PDT) est une stratégie basée sur l'utilisation d'une molécule photosensible (PS), une source lumineuse et de l'oxygène [19]. Le PS, lors d'une excitation lumineuse, produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) [20]. Les propriétés antimicrobiennes de ces dernières ont été observées sur un large panel de micro-organismes [21]. Contrairement aux PS naturels, retrouvés chez de nombreux organismes vivants, les PS synthétiques ont démontré de meilleures propriétés chimiques, notamment de par leur solubilité ou leur innocuité [22,23]. En comparaison avec l'antibiothérapie, l'effet antimicrobien de la PDT repose sur une production de dérivés d'oxygène hautement réactifs, capables d'agir sur de multiples composantes cellulaires [21,24]. Par conséquent, l'émergence de résistance à ce type de traitement est fortement réduite et n'a, à ce jour, pas été reporté dans la littérature.

Les complexes de Ruthénium (notés [Ru(II)] dans cette étude) font partie, avec les complexes à bases de platine et d'iridium, des PS synthétiques métalliques les plus étudiés dans la PDT [25]. Précédemment, la [Ru(II)]-PDT a permis de réduire la prolifération de bactéries pathogènes retrouvées chez les patients CF, à savoir *S. aureus* et *P. aeruginosa* [26]. De plus, le microenvironnement pulmonaire retrouvé chez les patients CF peut faire varier son efficacité. Les paramètres physico-chimiques (salinité, oxygénation et pH) et microbiologiques (condition de croissance et complexification de modèle microbien) ont été considérés.

Parmi ces différents critères, les limitations thérapeutiques les plus apparentes sont la présence de biofilm et de mucus. Afin de mieux comprendre l'impact de ces barrières sur la PDT, cette étude a pour objectif d'évaluer la capacité des [Ru(II)] à pénétrer, à diffuser et à produire de l'oxygène singulet au sein de ces matrices. Pour répondre à cette problématique, deux [Ru(II)] ont été sélectionnés,  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}(\text{PF}_6)_2$ , nommé [Ru(II)]1, et  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}(\text{PF}_6)_2$ , nommé [Ru(II)]2. Un milieu visant à mimer le mucus présent chez les patients CF, nommé Artificial Sputum Medium (ASM), sera utilisé.

## RESULTATS

### Efficacité de la PDT en condition planctonique

Premièrement, l'effet de la PDT a été comparé en utilisant, lors de l'illumination, deux milieux différents (le NaCl 0,45% et l'ASM). Le NaCl 0,45% est le milieu de référence sélectionné pour cette étude est car il permet d'obtenir, comme démontré dans l'étude précédente [27], une photo-inactivation efficace de *S. aureus* RN4220 et *P. aeruginosa* Pa19. Après incubation et illumination des mix [Ru(II)]-bactéries dans ces deux milieux, un repiquage sur milieu LB agar suivi d'une cinétique de croissance ont été réalisés afin de dénombrer les bactéries après traitement. En condition standard (NaCl 0,45%), les deux [Ru(II)] ont la capacité de produire un effet PDT contre les deux souches testées (Figure 1AB). En comparaison avec le milieu standard, lorsque le traitement est réalisé en milieu ASM, l'efficacité de la PDT est réduite pour *S. aureus* ([Ru(II)]1 : p-value  $\leq 0,05$ , [Ru(II)]2 : p-value : ns) et *P. aeruginosa* ([Ru(II)]1 et [Ru(II)]2 : p-value  $\leq 0,001$ ) (Figure 1AB).

### Propriétés des [Ru(II)] dans l'ASM

Les propriétés des [Ru(II)] dans l'ASM ont été évaluées par des tests (i) d'interaction du composé avec les composants du milieu et (ii) de production de l'oxygène singulet. Afin de quantifier les [Ru(II)] interagissant avec l'ASM, les complexes ont été incubés dans ce milieu (ASM) et en eau (control). Après centrifugation, des mesures de densité optique (DO) à 455 nm ont été réalisées sur les surnageants et les culots et sur une gamme de [Ru(II)] dont les quantités sont connues. Cette dernière a été utilisée pour déterminer la quantité de [Ru(II)] dans chaque fraction. Chaque valeur de DO a été normalisée de façon à retirer le bruit de fond généré par l'ASM seul. D'après les résultats obtenus, entre 0,2 et 3,8 nmol de [Ru(II)] (soit 10 à 13 % m/m) sont retrouvés dans les culots en condition ASM, ce qui indique qu'ils peuvent interagir avec les composants de ce milieu (Figure 1C). Après une illumination en présence de la sonde « Singlet Oxygen Sensor Green » (SOSG), la quantification par fluorescence de cette sonde dans les surnageants a été lue et normalisée par rapport à la condition contrôle (biofilm seul, Fluo. SOSG = 1 U.F.R.). Que ce soit pour [Ru(II)]1 ou [Ru(II)]2, cette production est différente entre les deux milieux. En effet, les [Ru(II)] présents dans ces fractions ne semblent pas produire de l'oxygène singulet en condition ASM en comparaison avec la condition control (eau) (Figure 1D).

## Efficacité de la PDT en condition biofilm

L'effet de la PDT sur la formation du biofilm a ensuite été évalué. Brièvement,  $10^6$  CFU/mL de bactéries contenant  $50 \mu\text{M}$  de [Ru(II)] ont été incubées pendant 24h après ajout de milieu LB ou ASM en condition statique afin de former un biofilm. Dans ces deux milieux, les bactéries testées ont la capacité de former du biofilm. En effet, de tests visant à déterminer leur biomasse (crystal violet) ont été réalisés dans ce sens (datas non montrées). La partie planctonique a été retirée de façon à pouvoir illuminer le biofilm uniquement. Après illumination, chaque biofilm a été resuspendu, dissous, dilué (en NaCl 0,9% en dilution sérielle), puis déposé sur gélose LB agar afin de pouvoir procéder à un dénombrement bactérien après avoir incubé les plaques pendant 24h. D'après les résultats obtenus, lorsque le biofilm a été formé dans du milieu LB, le traitement PDT, peu importe le [Ru(II)] testé, induit une diminution significative de la densité bactérienne dans les biofilms de *S. aureus*. En revanche, lorsqu'il est formé dans du milieu ASM, le biofilm de *S. aureus* semble développer une tolérance à l'effet PDT car aucune phototoxicité n'est observée, peu importe le [Ru(II)] testé (**Figure 2A**). Ensuite, une diminution de la quantité de *P. aeruginosa* dans le biofilm après illumination avec [Ru(II)]1 a été observé, et ceci, dans les deux milieux testés ( $\sim 5$  log). En revanche, en utilisant [Ru(II)]2, la charge bactérienne est inchangée peu importe le milieu utilisé (**Figure 2B**).

## Propriétés des [Ru(II)] dans le biofilm

La quantité de [Ru(II)] a été calculée selon le même protocole que celui utilisé pour la quantification en ASM. Cependant, les mesures d'absorbance à 455 nm du [Ru(II)] ont été substituées à celles obtenues par lecture de fluorescence. Chaque valeur de fluorescence a été normalisée de façon à retirer le bruit de fond généré par le biofilm seul. Pour les deux souches, la quantité de [Ru(II)]1 ou [Ru(II)]2 retrouvée dans la section biofilm est de l'ordre de 0,02 à 0,35 nmol lorsque le biofilm est formé dans du milieu LB (**Figure 2C**). En revanche, lorsqu'il est formé en ASM, les quantités de [Ru(II)]1 retrouvées dans les biofilms sont plus importantes ( $p\text{-value} \leq 0.01$ ). A l'issue de ces tests, la quantification d'oxygène singulet produit par les [Ru(II)] au sein de ces biofilms a été évaluée. Pour cela,  $10 \mu\text{M}$  de sonde SOSG ont été ajoutés par puits. Ensuite, après illumination, sa fluorescence a ensuite été mesurée dans toutes les conditions et normalisée par rapport à la condition contrôle (biofilm seul, Fluo. SOSG = 1 U.F.R.). Globalement, les [Ru(II)] retrouvés dans le biofilm de *S. aureus* sont capables de

produire de l'oxygène singulet lorsque le biofilm a été formé dans du milieu LB uniquement ( $p\text{-value} \leq 0.001$ ) (**Figure 2D**). En revanche, dans ces mêmes conditions, cette production n'a pas été détectée dans les biofilms de *P. aeruginosa*. Dans cette expérience, l'impact du milieu ASM sur la production d'oxygène singulet a pu être mis en évidence uniquement pour les biofilms de *S. aureus*. Ainsi, lorsque le biofilm est formé en milieu ASM, les [Ru(II)] retrouvés dans cette section ne semblent plus être en mesure de produire de l'oxygène singulet. Ce dernier n'a été détecté dans aucune condition avec *P. aeruginosa*.

### **Efficacité de la PDT et propriétés des PS après diffusion dans de l'ASM**

La capacité des [Ru(II)] à diffuser à travers une couche d'ASM a été évaluée dans le montage de transwell décrit dans le Matériels et Méthodes (Figure 3). Après diffusion, les 150  $\mu\text{L}$  dans l'insert (compartiments D + M) et dans les puits (compartiment A) ont été collectés afin de (i) réaliser des tests PDT avec le [Ru(II)] ayant diffusé (compartiment A) et (ii) quantifier le [Ru(II)] et l'oxygène singulet dans chaque compartiment. Premièrement, les tests PDT ont démontré que les [Ru(II)], après avoir diffusé 4h vers le compartiment (A) sans ASM, conservent leurs propriétés photo-toxiques contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* ( $p\text{-values}$  significatives, exceptées pour [Ru(II)]<sub>2</sub> contre *P. aeruginosa*) (**Figure 3AB**). En revanche lorsque cette couche d'ASM est franchi par les [Ru(II)], leur phototoxicité n'est plus observée. Ce résultat peut être expliqué au vu de la faible quantité de [Ru(II)] à pouvoir diffuser au travers. En effet, sans ASM, leurs quantités dans (A) et (D) sont similaires ( $p\text{-value} : ns$ ) ; en revanche, en présence de cette barrière, seulement 30% des [Ru(II)] ont pu diffuser (**Figure 3C**). Par ailleurs, la quantification de l'oxygène singulet généré par les [Ru(II)] démontrent que ces PS ne sont peut-être plus en mesure de les produire après diffusion dans l'ASM dans la fraction (A) mais également dans la fraction (D) (**Figure 3D**).

### **Phototoxicité cellulaire**

L'effet photo-toxique des deux [Ru(II)] a été évalué avec 3 lignées de cellules épithéliales dont deux bronchiques, les 16HBE et les CFBE, et une alvéolaire, les A549. Après avoir été mises en plaque puis incubées pendant 24h, les cellules ont été mises au contact de 50  $\mu\text{M}$  de [Ru(II)] dilué dans le milieu de culture cellulaire approprié puis irradiées pendant un cycle d'illumination (Cf Matériel et Méthodes). Le jour suivant, les cellules ont été lysées pour ensuite d'évaluer la viabilité cellulaire de chaque lignée 24h après traitement (**Figure S1**). Les

[Ru(II)] n'ont démontré, à la concentration la plus élevée testée dans cette étude (50  $\mu$ M), aucune toxicité avec ou sans illumination envers les trois lignées cellulaires testées.

## DISCUSSION

Actuellement, le rôle des barrières extracellulaires (biofilm et mucus) dans l'efficacité des traitements anti-infectieux est controversé. En effet, elles peuvent à la fois être délétères, en formant une barrière thérapeutique ou en modulant l'activité de nombreux antimicrobiens ; et elles peuvent être aussi une source de nouvelles stratégies antimicrobiennes [28–30]. De récentes études ont démontré que, de façon général, l'effet des antibiotiques est plus important dans un milieu classiquement utilisé, comme du LB (ou MHB), que dans des milieux synthétisés mimant le mucus retrouvé dans les poumons des patients CF, comme l'ASM [31]. En revanche, les raisons pour lesquelles les activités sont moins importantes dans ce milieu complexifié demeurent incertaines. Dans cette étude, l'effet inhibiteur du milieu ASM sur l'efficacité de la PDT peut agir à différents niveaux. En effet, il a été démontré précédemment que la transmittance de la source lumineuse était fortement diminuée lorsque celle-ci traverse un milieu complexe comme l'ASM (Cf Section Résultats, partie I, 1.1.) [27]. De plus, les tests de diffusions apportent un autre élément de réponse.

Donnelly et al ont démontré que l'efficacité de diffusion de PS classiquement utilisés pour des approches de PDT, comme le toluidine blue O (TBO) et porphine tetratosylate (TMP), est d'environ 50% à travers 3mm de milieu ASM [32]. Ces résultats ont été obtenus après 6h de diffusion dans une cellule de Franz, un dispositif adapté pour réaliser des tests de diffusion. Dans la présente étude, d'après les résultats obtenus, seul 30% des [Ru(II)] peuvent traverser efficacement une couche d'ASM de l'ordre de 1 mm. Une autre explication pourrait être également la variation de la photostabilité des PS dans ce milieu. Ce dernier contient de la mucine porcine qui pourrait altérer les propriétés des [Ru(II)], notamment en interagissant avec eux (**Figure S2**).

En effet, la présente étude a démontré que, dans les conditions expérimentales testées, les [Ru(II)] utilisés pourraient ne plus parvenir à produire de l'oxygène singulet dans ce milieu. Or, la détection de cette espèce radicalaire est complexe. Elle a été réalisée par utilisation d'une sonde chimique (SOSG), qui, à elle seule, ne permet pas de confirmer cette théorie. D'autres méthodes de détection pourraient compléter cette étude, comme par exemple, en utilisant (i)

d'autres sondes plus sensibles et/ou spécifiques, telles que la DPBF ou la ABDA [33] ou (ii) des méthodes basées sur la mesure de la phosphorescence de l'oxygène singulet par exemple [26,34]. Par ailleurs, utiliser des PS standardisé (comme un gold standard) pour ces tests faciliterait les mises au point de la démarche expérimentale. Concernant les [Ru(II)], greffer des polymères facilitant la pénétration dans le mucus, comme le PEG (polyéthylène glycol) ou des surfactants par exemple, serait une approche pertinente pour améliorer la PDT dans les barrières extracellulaires [35,36].

## MATERIELS ET METHODES

### Matériels

#### Molécules photosensibles [Ru(II)]

Les complexes du Ruthénium(II) polypyridiniques utilisés sont préparés selon le protocole suivant : 1 mg de [Ru(II)] est resuspendu en DMSO pur (dimethyl sulfoxide Hybri-Max™, SigmaAldrich) de façon à obtenir des solutions à 5 mM. Ces solutions sont conservées, pendant une semaine maximum à température ambiante et protégées de la lumière. Le premier complexe est [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Ruthenium-tris(1,10-Phenanthroline) dihexafluorophosphate, nommé [Ru(II)]1, et le second [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (Ruthenium-tris(2,2'-bipyridyl) dihexafluorophosphate), nommé [Ru(II)]2. Les lectures de densité optique (DO) et les lectures de fluorescence ont été réalisées à l'aide du lecteur de plaque Mithras2 LB943 (Berthold) comme décrit précédemment [27]. La spécificité de chaque lecture en point finale (absorbance et fluorescence) a été vérifiée avec des lectures de spectres (UV-VIS et fluorescence).

#### Cultures bactériennes

Les souches utilisées pour cette étude sont *S. aureus* RN4220 et *P. aeruginosa* Pa19660 (Schroeter) Migula (ATCC® 19660™), deux souches de laboratoire ne présentant pas de profil de résistance aux antibiotiques. Brièvement, pour chaque souche, des colonies isolées sont obtenues sur gélose agar Luria Bertani (LB) après étalement et incubation pendant 24h à 37°C. Les pré-cultures sont préparées en prélevant, à partir de ces boîtes, une colonie qui sera ensuite ajoutée dans 5mL de LB liquide puis incubée pendant 18-20h à 37°C sous agitation à 220rpm. Du milieu de culture mimant le mucus retrouvé chez les patients, nommé ASM (Artificial sputum medium) a été préparé comme décrit dans l'étude précédente [27].

## **Cultures cellulaires**

Trois lignées cellulaires épithéliales, dont deux bronchiques, les 16HBE et les CFBE, et une alvéolaire, les A549, ont été utilisées pour ce travail. Elles ont été cultivées en milieu Essentiel Minimum Eagle (EMEM, Lonza) pour les 16HBE et CFBE, et en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza) pour les A549. Chaque milieu a été complété avec 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% d'antibiotique de type Pénicilline-Streptomycine et 1% de L-glutamine. Ces cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits de façon à obtenir une confluence à 70% lors des tests, ce qui nécessite un ensemencement de 20 à 40 000 cellules/puits.

## **Méthodes**

### **Evaluation de la phototoxicité en condition planctonique**

Les solutions de [Ru(II)] ont été préparées à 50 $\mu$ M en eau et en ASM avant d'être ajoutées dans des plaques 96 puits transparentes (Sarstedt, Allemagne). Les inocula bactériens de *S. aureus* RN4220 et *P. aeruginosa* PA19660 sont ensuite préparés comme décrits précédemment [27]. Brièvement, 1mL de chaque culture de nuit est centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, les culots sont repris en NaCl 0,9%. La densité optique de chaque solution est ensuite réajustée de façon à obtenir des inocula à 10<sup>8</sup> CFU/mL. Puis, ces solutions sont diluées au 1000<sup>ème</sup> en NaCl 0,9% et en ASM de façon à obtenir des inocula à 10<sup>5</sup> CFU/mL dans ces deux milieux. Les inocula sont ensuite déposés dans les plaques contenant les solutions de [Ru(II)] à volume égal de façon à obtenir un mélange avec une densité bactérienne finale de 0,5.10<sup>5</sup> CFU/mL et 25 $\mu$ M de [Ru(II)], le tout en condition saline (NaCl 0,45%) et en ASM. Chaque condition est répliquée en 6 puits, de façon à utiliser trois conditions qui seront non-exposées et trois exposés à l'illumination (notées OFF et ON respectivement). Après 10 minutes d'incubation, un cycle d'irradiation de 45 minutes est appliqué, ce qui correspond à deux illuminations pendant 15 minutes avec une étape intermédiaire de 15 minutes à l'obscurité. Le système d'illumination utilisé correspond à celui décrit précédemment [27]. Après cette étape, l'efficacité de la PDT est évaluée selon 2 méthodes. L'une consiste à déposer sur une gélose LB agar carré des spots de 5 $\mu$ L de chaque

condition afin de qualifier un effet (nul, intermédiaire ou total). La seconde consiste à réaliser des cinétiques de croissance bactérienne en ajoutant 5  $\mu$ L de chaque condition dans une plaque contenant 195  $\mu$ L/puits de milieu LB. La plaque est ensuite insérée dans le Mithras2 LB943 afin de réaliser, toutes les 10 minutes, une étape d'agitation et une lecture de DO à 600 nm pendant un temps d'incubation minimum de 16h à 30°C.

### **Evaluation de la phototoxicité en condition biofilm**

Les tests anti-biofilm ont été réalisés comme décrit précédemment [27]. Brièvement, les inocula bactériens de *S. aureus* et *P. aeruginosa* ont été préparés à  $10^{7-8}$  CFU/mL comme dans la section précédente. Ensuite, une dilution au  $100^{\text{ème}}$  est réalisée de façon à obtenir des inocula à  $10^6$  CFU/mL. Ces derniers sont ensuite distribués dans une plaque 96 puits à fond rond (Costar, USA) et sont mixés avec les solutions de [Ru(II)] (concentration finale/puits : 50  $\mu$ M) et de ciprofloxacine (concentration finale/puits : 32  $\mu$ M) préparées en NaCl 0,45%. Après 10 minutes d'incubation, 50  $\mu$ L de milieu LB ou ASM sont ajoutés dans chaque puits et, après avoir filmé les plaques avec des membranes respirantes (Breathe-Easy® sealing membrane, Sigma-Aldrich), les plaques sont ensuite mises à incuber à 37°C en condition statique pendant 20h. Après cette étape, la partie planctonique est transférée dans une plaque 96 puits à fond noir (voir section suivante). Ensuite, la partie biofilm est illuminée selon le même protocole que les tests réalisés en planctonique. Après l'étape d'illumination, une méthode semi-quantitative est utilisée pour quantifier la charge bactérienne par dilution sérielle : chaque biofilm est resuspendu dans 100  $\mu$ L NaCl 0,9% puis dilué en série. 5  $\mu$ L de chaque dilution sont déposés sur gélose LB agar. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 18h avant de procéder au dénombrement bactérien.

### **Quantification du [Ru(II)]**

La quantification du [Ru(II)] a été déterminée (i) dans les milieux seuls par lectures de DO 455 nm et (ii) dans les biofilms par lecture de fluorescence selon les paramètres suivants :  $\lambda_{\text{excitation}} = 460 \pm 15$  nm et  $\lambda_{\text{émission}} = 590 \pm 22$  nm.

Dans le premier cas, des solutions à 50  $\mu$ M de [Ru(II)] dans le milieu ASM sont préparés dans des tubes eppendorf. En parallèle, ces solutions sont préparées en eau comme condition contrôle. Après 10 minutes d'incubation, les tubes sont centrifugés à 2000 g pendant 5 minutes

à 4°C. L'absorbance de la DO à 455nm du [Ru(II)] est mesurée dans les surnageants et dans les culots (resuspendus en eau). Pour chaque milieu, les valeurs sont normalisées par rapport à la condition milieu seul correspondante.

Après les tests anti-biofilm, les biofilms resuspendus ont été transférés dans une plaque 96 puits à fond noir. La fluorescence du [Ru(II)] a été mesurée pour chaque condition puis a été normalisée par rapport à celle de la condition biofilm seul (contrôle négatif). La fluorescence des [Ru(II)] dans les conditions sans biofilm correspond au contrôle positif. Une gamme de [Ru(II)] (quantités connues dans cette gamme) a été réalisée pour chaque complexe en LB et en ASM de façon à rapporter les valeurs de fluorescence obtenues à une quantité de [Ru(II)].

### **Quantification de $^1\text{O}_2$**

Dans les mêmes plaques ayant servies aux quantifications du [Ru(II)], la capacité des [Ru(II)] à produire de  $^1\text{O}_2$  au sein des différentes matrices (ASM et biofilm) a été évaluée. Pour cela 10 $\mu\text{L}$  de sonde Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, Fisher Scientific) sont ajoutés (i) dans les conditions « OFF » des plaques contenant les parties biofilms et (ii) dans celles contenant les surnageants et culots des tests PDT réalisés en ASM. Avant et après le cycle d'illumination, la fluorescence de la sonde SOSG a été lue selon les paramètres suivants :  $\lambda_{\text{excitation}} = 504 \pm 6 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 525 \pm 12 \text{ nm}$ .

### **Les tests de diffusion dans l'ASM**

Les tests de diffusion sont réalisés à partir d'un modèle de « transwell » avec des inserts possédant une membrane d'une porosité à 0.4  $\mu\text{m}$  (Sarstedt, Allemagne). Ces inserts sont déposés dans des plaques 24 puits contenant 800  $\mu\text{L}$  d'eau de façon à ce que la membrane soit au contact de l'eau. Pour chaque [Ru(II)], 100  $\mu\text{L}$  d'ASM sont déposés dans 3 inserts; 100  $\mu\text{L}$  d'eau sont ajoutés dans 3 autres. Ensuite, 100 $\mu\text{L}$  de [Ru(II)] 50  $\mu\text{M}$  préparés en eau sont ajoutés dans les inserts. L'absorbance de la DO à 455 nm a été lue avec le Mithras pour chaque solution de [Ru(II)] avant leur ajout dans les inserts. Après 4h de diffusion, l'absorbance à DO 455 nm est à nouveau lue dans 150  $\mu\text{L}$  prélevés de chaque compartiment. Après une étape de centrifugation à 2000 g pendant 5 minutes à 4°C, l'absorbance est à nouveau lue dans les surnageants et dans les culots resuspendus en eau. La quantification de [Ru(II)] a été réalisée à l'aide d'une gamme étalon comme décrits dans les essais de quantification en ASM. 25 $\mu\text{L}$  de

chaque « diffusat » sont ajoutés dans une plaque 96 puits où des inocula de *S. aureus* et *P. aeruginosa*, préparés à  $10^5$  CFU/mL en NaCl 0,9%, ont été préalablement déposés, comme décrit précédemment. Après une illumination standard, l'effet antimicrobien a été évalué par cinétique de croissance. Ensuite, la sonde SOSG (10 $\mu$ M/puits) a été ajoutée dans 100 $\mu$ L de chaque condition après diffusion. Comme précédemment, la fluorescence de la sonde SOSG a été mesurée après illumination.

### **Evaluation de la phototoxicité sur cellules**

La phototoxicité sur les lignées A549, 16HBE et CFBE a été vérifiée après ensemencement en plaque 96 puits puis incubation pendant 18h à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Une solution de [Ru(II)] est appliquée directement dans le milieu de culture de façon à obtenir une concentration de 50 $\mu$ M par puits. Après 10 minutes d'incubation, l'illumination a été réalisée comme décrit précédemment. Puis, les plaques ont été mises à incuber 24h à 37°C avant d'être lysées via l'ajout de 75 $\mu$ L/puits de tampon Passive Lysis Buffer 0,5X (Promega). La phototoxicité a ensuite été mesurée en mesurant la viabilité cellulaire à l'aide du kit Vialight (Lonza). Brièvement, 25 $\mu$ L de lysat sont mélangés à 50 $\mu$ L de réactif, puis, après 2 minutes d'incubation, la luminescence est mesurée.

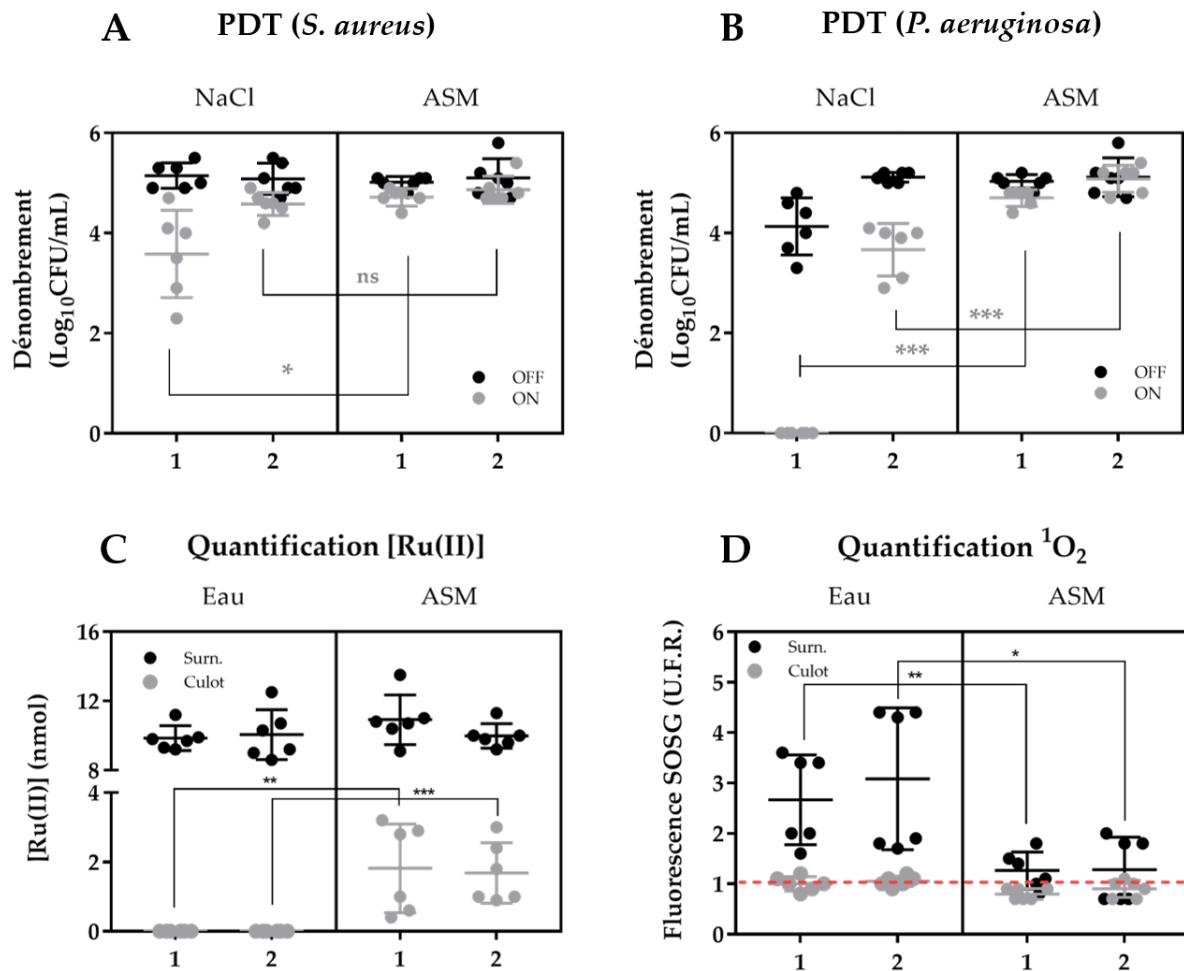
### **REMERCIEMENTS**

Ce projet a été financé par l'ANR/BMBF (TARGET-THERAPY; Tony Le Gall et Holger Schönherr; ANR grant number: ANR-20-AMRB-0009, RPV21103NNA; BMBF 834 Förderkennzeichen: 16GW0342), mais également par l'Association de Transfusion Sanguine et de Biogénétique Gaétan Saleün (France) et le "Conseil Régional de Bretagne" (France). Raphaëlle Youf est financée par le "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" (Paris, France).

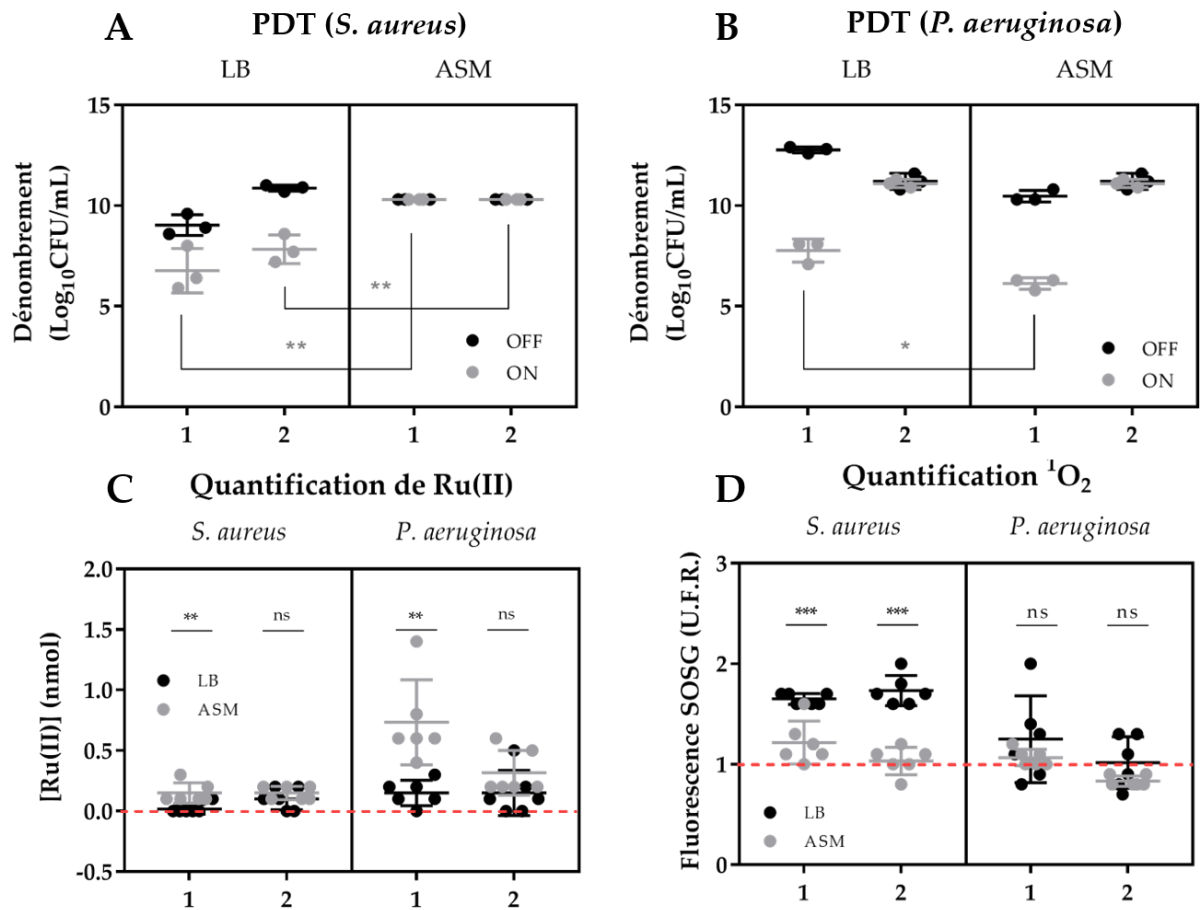
## REFERENCES

1. Castellani, C.; Assael, B.M. Cystic Fibrosis: A Clinical View. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 129–140, doi:10.1007/s00018-016-2393-9.
2. L, C.; P, V.; Dc, G. STRUCTURE, GATING, AND REGULATION OF THE CFTR ANION CHANNEL. *Physiological reviews* **2019**, *99*, doi:10.1152/physrev.00007.2018.
3. Ratjen, F.; Döring, G. Cystic Fibrosis. *Lancet* **2003**, *361*, 681–689, doi:10.1016/S0140-6736(03)12567-6.
4. Bossche, S.V. den; Broe, E.D.; Coenye, T.; Braeckel, E.V.; Crabbé, A. The Cystic Fibrosis Lung Microenvironment Alters Antibiotic Activity: Causes and Effects. *European Respiratory Review* **2021**, *30*, doi:10.1183/16000617.0055-2021.
5. Lin, Q. Cystic Fibrosis Acidic Microenvironment Determines Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation of *Pseudomonas Aeruginosa*. 29.
6. Jurado-Martín, I.; Sainz-Mejías, M.; McClean, S. *Pseudomonas Aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 3128, doi:10.3390/ijms22063128.
7. Lund-Palau, H.; Turnbull, A.R.; Bush, A.; Bardin, E.; Cameron, L.; Soren, O.; Wierre-Gore, N.; Alton, E.W.F.W.; Bundy, J.G.; Connett, G.; et al. *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Expert Review of Respiratory Medicine* **2016**, *10*, 685–697, doi:10.1080/17476348.2016.1177460.
8. Kamble, E.; Pardesi, K. Antibiotic Tolerance in Biofilm and Stationary-Phase Planktonic Cells of *Staphylococcus Aureus*. *Microb Drug Resist* **2021**, *27*, 3–12, doi:10.1089/mdr.2019.0425.
9. Mah, T.-F.; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G.C.; Stewart, P.S.; O'Toole, G.A. A Genetic Basis for *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance. *Nature* **2003**, *426*, 306–310, doi:10.1038/nature02122.
10. Simon-Soro, A.; Ren, Z.; Krom, B.P.; Hoogenkamp, M.A.; Cabello-Yeves, P.J.; Daniel, S.G.; Bitteringer, K.; Tomas, I.; Koo, H.; Mira, A. Polymicrobial Aggregates in Human Saliva Build the Oral Biofilm. *mBio* **2022**, *13*, e0013122, doi:10.1128/mbio.00131-22.
11. Geller, D.E. Aerosol Antibiotics in Cystic Fibrosis. *Respir Care* **2009**, *54*, 658–670, doi:10.4187/aarc0537.
12. Juntke, J.; Murgia, X.; Günday Türeli, N.; Türeli, A.E.; Thorn, C.R.; Schneider, M.; Schneider-Daum, N.; de Souza Carvalho-Wodarz, C.; Lehr, C.-M. Testing of Aerosolized Ciprofloxacin Nanocarriers on Cystic Fibrosis Airway Cells Infected with *P. Aeruginosa* Biofilms. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2021**, *11*, 1752–1765, doi:10.1007/s13346-021-01002-8.
13. Ghanem, R.; Roquefort, P.; Ramel, S.; Laurent, V.; Haute, T.; Le Gall, T.; Aubry, T.; Montier, T. Apparent Yield Stress of Sputum as a Relevant Biomarker in Cystic Fibrosis. *Cells* **2021**, *10*, 3107, doi:10.3390/cells10113107.
14. Morrison, C.B.; Markovetz, M.R.; Ehre, C. Mucus, Mucins and Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **2019**, *54*, S84–S96, doi:10.1002/ppul.24530.
15. Müller, L.; Murgia, X.; Siebenbürger, L.; Börger, C.; Schwarzkopf, K.; Sewald, K.; Häussler, S.; Braun, A.; Lehr, C.-M.; Hittinger, M.; et al. Human Airway Mucus Alters Susceptibility of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms to Tobramycin, but Not Colistin. *J Antimicrob Chemother* **2018**, *73*, 2762–2769, doi:10.1093/jac/dky241.
16. Dinwiddie, R. Anti-Inflammatory Therapy in Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **2005**, *4*, 45–48, doi:10.1016/j.jcf.2005.05.010.
17. Hassett, D.J.; Sutton, M.D.; Schurr, M.J.; Herr, A.B.; Caldwell, C.C.; Matu, J.O. *Pseudomonas Aeruginosa* Hypoxic or Anaerobic Biofilm Infections within Cystic Fibrosis Airways. *Trends Microbiol* **2009**, *17*, 130–138, doi:10.1016/j.tim.2008.12.003.
18. Suk, J.S.; Kim, A.J.; Trehan, K.; Schneider, C.S.; Cebotaru, L.; Woodward, O.M.; Boylan, N.J.; Boyle, M.P.; Lai, S.K.; Guggino, W.B.; et al. Lung Gene Therapy with Highly Compacted DNA Nanoparticles That Overcome the Mucus Barrier. *J Control Release* **2014**, *178*, 8–17, doi:10.1016/j.jconrel.2014.01.007.
19. Benov, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Med Princ Pract* **2014**, *24*, 14–28, doi:10.1159/000362416.
20. Vatansever, F.; de Melo, W.C.M.A.; Avci, P.; Vecchio, D.; Sadasivam, M.; Gupta, A.; Chandran, R.; Karimi, M.; Parizotto, N.A.; Yin, R.; et al. Antimicrobial Strategies Centered around Reactive Oxygen Species - Bactericidal Antibiotics, Photodynamic Therapy and Beyond. *FEMS Microbiol Rev* **2013**, *37*, 955–989, doi:10.1111/1574-6976.12026.

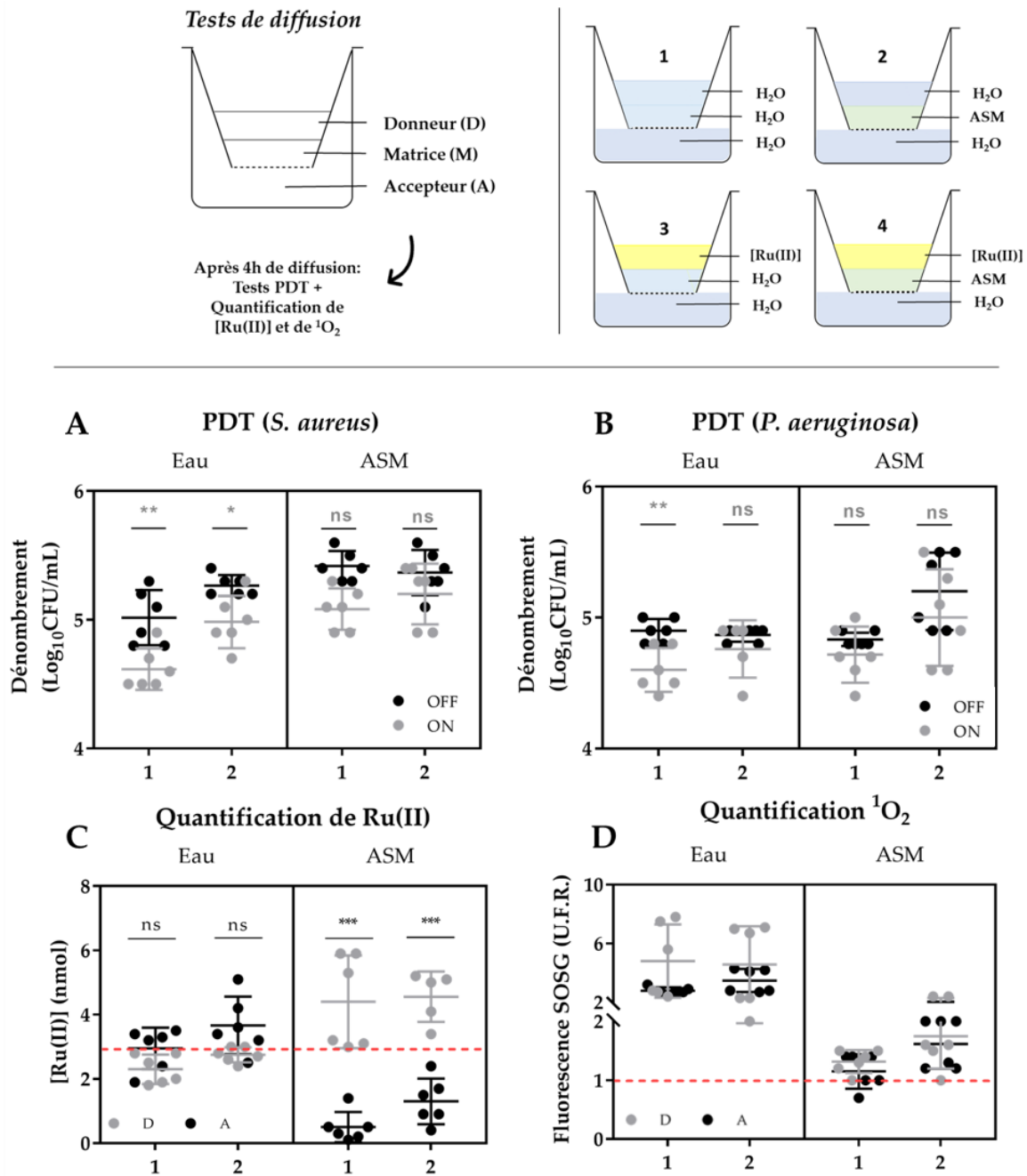
21. Youf, R.; Müller, M.; Balasini, A.; Thétiot, F.; Müller, M.; Hascoët, A.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1995, doi:10.3390/pharmaceutics13121995.
22. Abrahamse, H.; Hamblin, M.R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem J* **2016**, *473*, 347–364, doi:10.1042/BJ20150942.
23. Polat, E.; Kang, K. Natural Photosensitizers in Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Biomedicines* **2021**, *9*, 584, doi:10.3390/biomedicines9060584.
24. Alves, E.; Faustino, M.A.; Neves, M.G.; Cunha, A.; Tome, J.; Almeida, A. An Insight on Bacterial Cellular Targets of Photodynamic Inactivation. *Future Medicinal Chemistry* **2021**, *6*, 141–164.
25. Josefsen, L.B.; Boyle, R.W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitizers. *Metal-Based Drugs* **2008**, *2008*, 1–23, doi:10.1155/2008/276109.
26. Le Gall, T.; Lemerrier, G.; Chevreux, S.; Tücking, K.-S.; Ravel, J.; Thétiot, F.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Montier, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure-Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2229–2239, doi:10.1002/cmdc.201800392.
27. Youf, R.; Nasir, A.; Müller, M.; Thétiot, F.; Haute, T.; Ghanem, R.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1664, doi:10.3390/pharmaceutics14081664.
28. Egesten, A.; Herwald, H. The Extracellular Matrix: Reloaded Revolutions. *J Innate Immun* **2019**, *11*, 301–302, doi:10.1159/000500357.
29. Roy, R.; Tiwari, M.; Donelli, G.; Tiwari, V. Strategies for Combating Bacterial Biofilms: A Focus on Anti-Biofilm Agents and Their Mechanisms of Action. *Virulence* **2018**, *9*, 522–554, doi:10.1080/21505594.2017.1313372.
30. Mitri, C.; Xu, Z.; Bardin, P.; Corvol, H.; Touqui, L.; Tabary, O. Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies. *Front Pharmacol* **2020**, *11*, 1096, doi:10.3389/fphar.2020.01096.
31. Diaz Iglesias, Y.; Van Bambeke, F. Activity of Antibiotics against *Pseudomonas Aeruginosa* in an In Vitro Model of Biofilms in the Context of Cystic Fibrosis: Influence of the Culture Medium. *Antimicrob Agents Chemother* **2020**, *64*, e02204-19, doi:10.1128/AAC.02204-19.
32. Donnelly, R.F.; McCarron, P.A.; Cassidy, C.M.; Elborn, J.S.; Tunney, M.M. Delivery of Photosensitizers and Light through Mucus: Investigations into the Potential Use of Photodynamic Therapy for Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Cystic Fibrosis Pulmonary Infection. *J Control Release* **2007**, *117*, 217–226, doi:10.1016/j.jconrel.2006.11.010.
33. Entradas, T.; Waldron, S.; Volk, M. The Detection Sensitivity of Commonly Used Singlet Oxygen Probes in Aqueous Environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, *204*, 111787, doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.111787.
34. Ossola, R.; Jönsson, O.M.; Moor, K.; McNeill, K. Singlet Oxygen Quantum Yields in Environmental Waters. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 4100–4146, doi:10.1021/acs.chemrev.0c00781.
35. Kassab, G.; Diaz Tovar, J.S.; Souza, L.M.P.; Costa, R.K.M.; Silva, R.S.; Pimentel, A.S.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Lung Surfactant Negatively Affects the Photodynamic Inactivation of Bacteria-in Vitro and Molecular Dynamic Simulation Analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2022**, *119*, e2123564119, doi:10.1073/pnas.2123564119.
36. Anderski, J.; Mahler, L.; Mulac, D.; Langer, K. Mucus-Penetrating Nanoparticles: Promising Drug Delivery Systems for the Photodynamic Therapy of Intestinal Cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *129*, 1–9, doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.018.



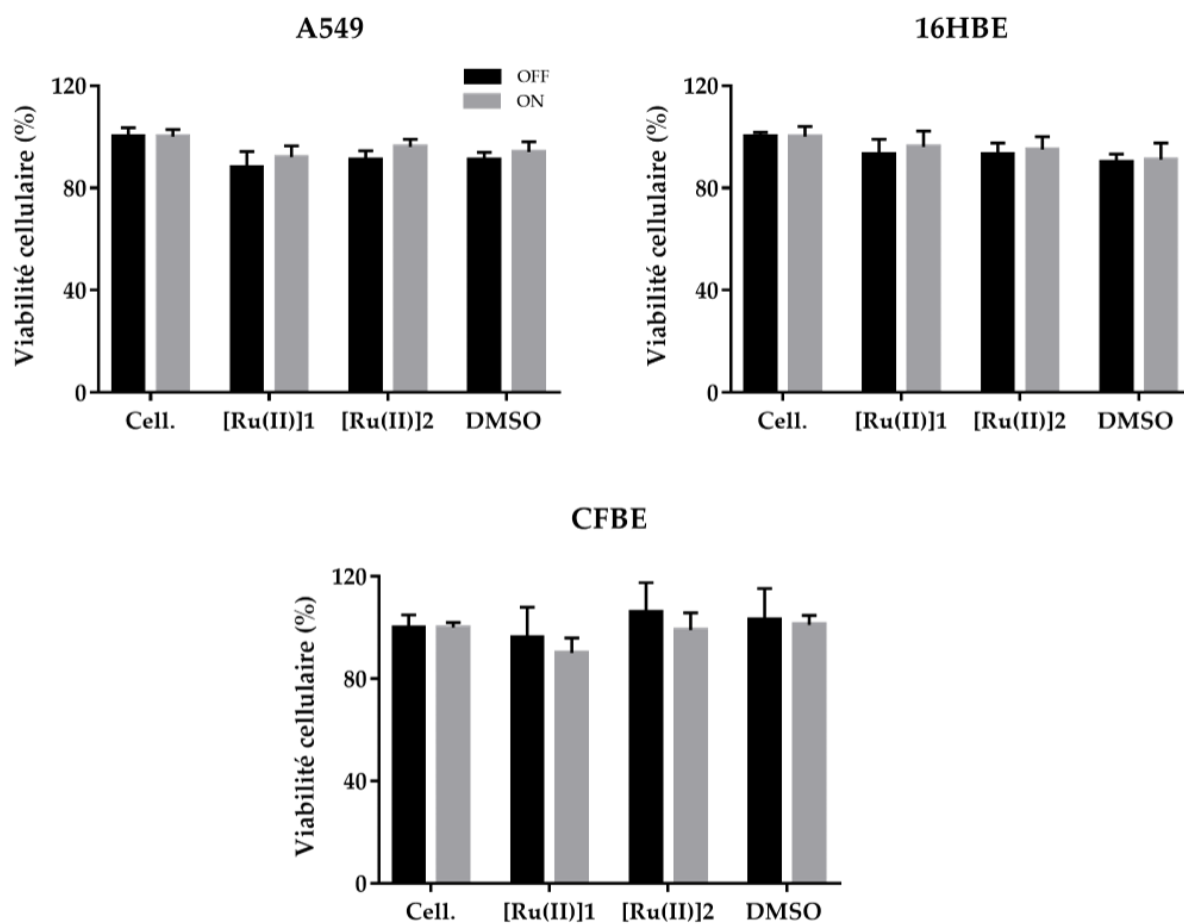
**Figure 1.** Comparaison de l'effet PDT des [Ru(II)] à 25 $\mu$ M en milieu NaCl et ASM contre *S. aureus* RN4220 (A) et *P. aeruginosa* Pa19 (B). Quantification du [Ru(II)] (C) et de l'oxygène singlet (D) après avoir incubé et centrifugé les PS dans les milieux eau et ASM. Les abscisses pour chaque graphique correspondent aux conditions [Ru(II)]1 (1) et [Ru(II)]2. La ligne rouge correspond au seuil de positivité. Pour chaque condition : N=2, n=3 avec analyse statistique réalisée par t-test : \*\*\*, p-value  $\leq$  0.001; \*\*, p-value  $\leq$  0.01 ; \*, p-value  $\leq$  0.05 ; ns, non significatif.



**Figure 2.** Dénombrément bactérien après formation d'un biofilm de 24h en présence de [Ru(II)]. L'énumération de *S. aureus* (A) et *P. aeruginosa* (B) a été réalisée avec (ON) et sans (OFF) illumination. Quantification des [Ru(II)] (C) et de l'oxygène singulet produit (D) après 24h de formation de biofilm en présence des PS. Les abscisses pour chaque graphique correspondent aux conditions [Ru(II)]1 (1) et [Ru(II)]2. La ligne rouge correspond au seuil de positivité. Pour chaque condition : N=2, n=3 avec analyse statistique réalisée par t-test : \*\*\*, p-value ≤ 0.001; \*\*, p-value ≤ 0.01; \*, p-value ≤ 0.05; ns, non significatif.

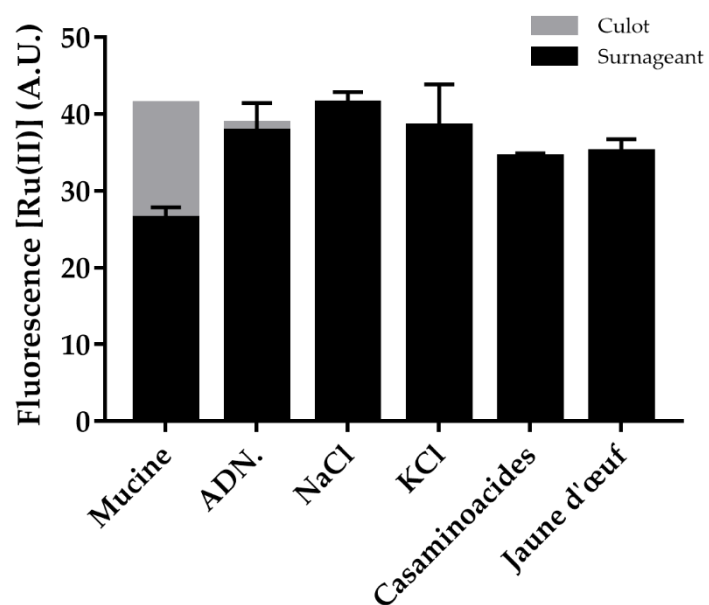


**Figure 3.** Schéma explicatif des tests de diffusions : diffusion d'une solution du compartiment donneur (eau 1,2 ou [Ru(II)] 3,4) vers un compartiment accepteur (eau 1,2,3,4) au travers d'une matrice (eau 1,2 ou ASM 3,4). Dénombrement bactérien après traitement PDT contre *S. aureus* RN4220 (A) et *P. aeruginosa* Pa19 (B) avec les [Ru(II)] issus des compartiments accepteurs. Quantification des [Ru(II)] (C) et de l'oxygène singulet produit (D) issus des compartiments donneurs (D) et accepteurs (A). Les abscisses pour chaque graphique correspondent aux conditions [Ru(II)]1 (1) et [Ru(II)]2. La ligne rouge correspond au seuil de positivité. Pour chaque condition : N=2, n=3 avec analyse statistique réalisée par t-test : \*\*\*, p-value  $\leq 0.001$ ; \*\*, p-value  $\leq 0.01$  ; \*, p-value  $\leq 0.05$  ; ns, non significatif.



**Figure S1.** Evaluation de la phototoxicité des [Ru(II)] envers les A549, les 16HBE et les CFBE. La viabilité cellulaire a été évaluée 24h après traitement lumineux (ON) ou non (OFF). Les valeurs de viabilité cellulaire en OFF et ON sont exprimées en pourcentage de viabilité rapportée aux conditions contrôles « Cell. » OFF et ON. Pour chaque condition : N=2, n=3 avec analyse statistique réalisée par t-test en comparant les conditions « Cell. ». Pour l'ensemble de ces tests, aucune différence significative n'a été observée.

## Test d'interaction avec les composants de l'ASM



**Figure S2.** Tests d'interaction réalisés avec le [Ru(II)]1 et les différents constituants du milieu ASM. La fluorescence du [Ru(II)]1 est reportée sur les fractions surnageants (noir) et culots (gris) après centrifugation des mélanges. N=1, n=3.

## 2. Du modèle *in vitro* au modèle *in vivo*

Comme évoqué dans l'introduction, le défi majeur rencontré lors d'essais PDT est d'identifier une voie d'administration du PS et de l'aérosol qui soit cohérente avec l'application ciblée. Dans cette partie, une étude préliminaire visant à tester la nébulisation d'un [Ru(II)] de référence dans un modèle *in vitro* et *ex vivo* a été réalisée.

### ***Nota Bene***

Le [Ru(II)] de référence sélectionné pour cette étude correspond au [Ru(II)]1 sélectionné dans les études précédentes. Sa dénomination reste la même pour l'étude qui suit. Les tests sur échantillons porcins ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec l'ANSES de Ploufragan.

## Résultats préliminaires de la délivrance de PS dans un modèle animal en vue d'une application de PDT antimicrobienne pulmonaire

### INTRODUCTION

Les études présentées dans la partie précédente (Cf Section Résultats, partie I,1.) ont été réalisées dans des conditions standardisées, *in vitro*. Les résultats de ces tests ont permis de mieux appréhender les limites présentes dans le microenvironnement pulmonaire des patients CF en vue d'une application chez l'animal. Les protocoles standardisés utilisés lors des essais *in vitro* est faite avec des doses connues de PS et d'énergie lumineuse pendant le traitement. Cependant, chez l'animal, ces deux critères sont difficiles à mettre en place. En effet, pour cibler efficacement les poumons dans un contexte CF, la voie d'administration du PS, mais aussi de la source lumineuse, doivent être optimisés. Dans ce travail, la capacité du [Ru(II)]1, utilisé dans les études précédente, à être délivré par aérosol et détecté sur échantillons *ex vivo*, a été évaluée.

Dans plusieurs études, la délivrance des PS au niveau pulmonaire a déjà été envisagée, notamment dans le traitement des cancers pulmonaires. A notre connaissance, au stade clinique, seuls le Photofrin® (porfimer sodique) et la HPPH® (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a) ont été utilisés comme PS dans ce cadre. Leur voie de délivrance privilégiée est la voie intraveineuse [1–3]. Cependant, d'autres modes d'administration des PS, au stade pré-clinique, sont utilisées, comme la nébulisation. Quelques études démontrent que cette voie de délivrance ne semble pas dégrader la structure de PS classiquement utilisés comme le Bleu de toluidine O (TBO) ou encore le Vert d'indocyanine (ICG) [4,5].

La délivrance de la lumière pour appliquer la PDT au niveau pulmonaire chez l'animal peut se faire via des systèmes intra et extracorporels. Ces derniers ont l'avantage d'illuminer une zone interne sans abîmer le tractus respiratoire [6]. Néanmoins, les systèmes intracorporels peuvent illuminer plus efficacement les zones pulmonaires profondes, difficiles d'accès, comme les bronches [7].

Cette partie aura pour objectif de résumer quelques résultats obtenus afin d'évaluer la capacité de complexes de Ruthénium (notés [Ru(II)]) à être délivrés par aérosol sur modèle *in vitro* puis *ex vivo*.

## **MATERIELS ET METHODES**

### **Matériels**

#### **Molécules photosensibles**

La molécule utilisée [Ru(II)]1 ([Ru(Phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>(PF<sub>6</sub><sup>-</sup>)<sub>2</sub>) pour cette étude est la même que précédemment [8] (Voir section Résultats, partie I,1.1. et I,1.2.). Globalement, 1 mg de [Ru(II)]1 a été dissous dans du DMSO de façon à obtenir une solution à 5mM. Cette dernière est conservée à température ambiante, à l'abris de la lumière et sur une durée inférieure à 7 jours.

#### **Nébuliseurs**

Trois types de nébuliseurs ont été sélectionnés pour réaliser cette étude : un pneumatique (le Pari LC Plus®, Pari), un à membrane vibrante (le Pari e-Flow®, Pari) et un ultrasonique (Air Q+ ®, Hylogy). Globalement, 5mL d'une solution d'eau (contrôle) ou de [Ru(II)] à 50 µM sont ajoutés dans le compartiment réservoir (R) de chaque nébuliseur.

#### **Lignées cellulaires**

Des tests de phototoxicité ont été réalisés sur les lignées cellulaires CFBE-luc +, des cellules bronchiques immortalisées issues de patients CF qui produisent de manière endogène la luciférase. Ces cellules sont entretenues comme décrit précédemment (Voir Section Résultats, partie I,1.1.). Brièvement, le milieu de culture complet utilisé est l'EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), supplémenté avec 10% de sérum de vœux fœtal, 1% d'antibiotique (Streptomycine, Pénicilline) et 1% de glutamate. Lors des tests de phototoxicité, 50 000 cellules/puits ont étéensemencées en plaque 96 puits. Après 24h d'incubation à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les tests de phototoxicité ont ensuite été réalisés (voir partie suivante).

#### **Prélèvements trachée-poumons porcins**

Des prélèvements trachée-poumons de porcs adultes ont été récupérés auprès de l'ANSES de Ploufragan. Afin de réaliser des explants de trachées, celles-ci ont été découpées de façon à obtenir plusieurs échantillons de taille identique (1 cm x 1cm). Au préalable, une plaque 6

puits a été préparée en ajoutant 2 mL/puits de milieu RPMI (Lonza) de façon à imbiber un morceau de compresse de gaze (1 cm x 1cm). Les explants ont été ajoutés directement sur les compresses immergées, l'épithélium orienté vers le haut, afin de maintenir une croissance en interface air-liquide. Les prélèvements n'ayant pas été utilisés pour la préparation d'explants ont été stockés dans du milieu RPMI le temps de l'expérience.

### **Souches bactériennes**

La souche *P. aeruginosa* ATCC 19660 a été utilisée pour cette étude. Cette bactérie est conservée sur gélose LB agar et régulièrement repiquée sur ce même milieu afin d'obtenir des colonies fraîchement isolées. Pour la réalisation de pré-culture, une colonie isolée a été ensemencée dans 5 mL de milieu LB avant d'être incubée à 37 °C pendant 18h sous agitation (220 rpm). Une fois obtenus, les inocula ont été préparés à 10<sup>5</sup> CFU/mL en NaCl (0,9%) comme décrit précédemment [8]

## **METHODES**

### **Propriétés du [Ru(II)] après aérosol (*in vitro*)**

Les aérosols ont été réalisés pour ces tests avec les trois nébuliseurs présentés dans le Matériel (**Figure 1**). Pendant l'aérosolisation du [Ru(II)], les nébulisateurs ont été collectés dans un tube collecteur (C) placé au bout des systèmes d'aérosol. Après l'aérosolisation, 200µL de chaque compartiment (A et R) ont été déposés en plaque 96 puits afin d'évaluer les propriétés physiques des [Ru(II)] avant et après la nébulisation par lecture de spectres UV-VIS et de fluorescence (Mithras LB, Berthold). Ensuite, 25 µL de chaque compartiment ont été déposés en plaque 96 puits contenant 25µL de *P. aeruginosa* ATCC 19660 à 10<sup>5</sup> CFU/mL en NaCl (0,9%) par puits. Les mix ont ensuite été illuminés comme décrit précédemment [8]. Puis, 5 µL de chaque mélange ont été ajoutés dans une plaque 96 puits contenant 195 µL de LB/puits afin de réaliser une cinétique de croissance à 30°C en réalisant des lectures de DO600 et des agitations toutes les 10 minutes pendant 24h. A l'issue de celle-ci, le temps de virage (« Start Growth Time », SGT), qui correspond au temps nécessaire aux bactéries pour atteindre une DO600 fixée à 0,1, a été relevé pour chaque condition. Chaque valeur de SGT obtenue a été rapportée à celles déterminées à partir d'une gamme contrôle d'inoculum (de 10<sup>2</sup> à 10<sup>5</sup> CFU/mL). Ainsi,

la corrélation entre le SGT et la charge bactérienne peut être ensuite établie afin de déterminer, pour chaque condition, les réductions logarithmiques bactériennes.

### **Propriétés du [Ru(II)] après aérosol *ex vivo***

Une boîte d'une dimension de dimension 126 x 84 mm x 50 mm a été utilisée pour recouvrir la surface des plaques 6 puits contenant les explants de porcs. Au sommet de celle-ci, le nébuliseur Pari e-Flow a été déposé dans un emplacement prévu à cet effet. La fluorescence du [Ru(I)] aérosolisé sur les explants a ensuite été visualisée à 470 nm avec le NightOWL II LB983 NC320 (Berthold Technologies, Germany).

Concernant les aérosols de [Ru(II)] réalisés sur les ensembles trachée-poumons de porcs, les organes ont été posés à plat dans un bac. Le Pari e-Flow a été placé en haut de la trachée puis les 10 minutes d'aérosolisation se sont déroulés à l'horizontal comme décrit dans le paragraphe précédent. La fluorescence a été mesurée sur plusieurs plans de façon à estimer jusqu'où le composé a été nébulisé.

## **RESULTATS**

Premièrement, la capacité de [Ru(II)] à être aérosolisé sous forme de microgouttelettes a été évaluée. Pour cela, trois types de nébuliseurs ont été sélectionnés : le Pari LC plus (Pari), le Pari e-Flow (Pari) et l'Air Q+ (Hylogy) (**Figure 1A**). Après aérosolisation de [Ru(II)], les microgouttelettes ont été collectées (tube collecteur C) de façon à comparer les spectres de fluorescence (**Figure 1B**) et d'absorbance (**Figure 1C**) avant et après le processus. La superposition des spectres UV-VIS au niveau de la Q-band et de la bande de Soret confirment que les complexes ont théoriquement bien toléré le processus d'aérosolisation. Cependant, le signal de fluorescence du [Ru(II)] après aérosolisation avec le pneumatique est plus faible.

Par ailleurs, la capacité des complexes à conserver leur activité phototoxique bactérienne a été déterminée. Pour cela, après avoir mixé  $10^5$  CFU/mL en NaCl (0,9%) d'inoculum de *P. aeruginosa* Pa19660 avec le [Ru(II)] (collecté après aérosol dans le tube collecteur (C) et dans le réservoir (R)), les mélanges ont été irradiés puis des cinétiques de croissance ont été réalisées (**Figure 2A** et **2B**). Une fois aérosolisé, le [Ru(II)] est toujours en capacité de pouvoir agir sur *P. aeruginosa* (p-value  $\leq 0,001$ ). Cependant, le [Ru(II)] restant dans le réservoir est globalement moins efficace que celui aérosolisé, et cela, indépendamment du nébuliseur choisi. Les

résultats n'ont pas permis de discriminer les nébuliseurs entre eux car leur capacité à aérosoliser efficacement le [Ru(II)]1 semble être similaire. L'e-Flow a été sélectionné pour la suite de l'étude car le rendement du volume de [Ru(II)] aérosolisé est important et sa portabilité est mieux adaptée.

Ensuite, le [Ru(II)]1 a été visualisé après aérosolisation sur des explants de porcs. Sa fluorescence a été détectée sur la partie épithéliale de chaque explant (**Figure 3**). En comparaison au témoin (aérosol d'eau), la fluorescence du complexe sur les explants semble être homogène et bien distinguée du bruit de fond. De plus, l'intensité mesurée sur chaque explant est comprise dans la gamme en composé préalablement réalisée comme contrôles positifs de détection de fluorescence (10 à 100  $\mu$ M).

Par ailleurs, l'intensité de fluorescence du [Ru(II)] après aérosol a été mesurée dans un ensemble trachée-poumon. De la fluorescence a été détectée du haut de la trachée jusqu'au milieu du poumon (**Figure 4**). Ces données apportent une information qualitative quant à la présence du [Ru(II)] dans les poumons, car les méthodes de détection de fluorescence *in vivo* peuvent être limitées par plusieurs facteurs en lien avec les tissus. Ces derniers peuvent notamment freiner l'absorption et la transmittance du signal lumineux émise par le NightOwl pour détecter la fluorescence. De plus, leur auto-fluorescence dans plusieurs domaine du spectre lumineux limite les champs d'applications.

## DISCUSSION

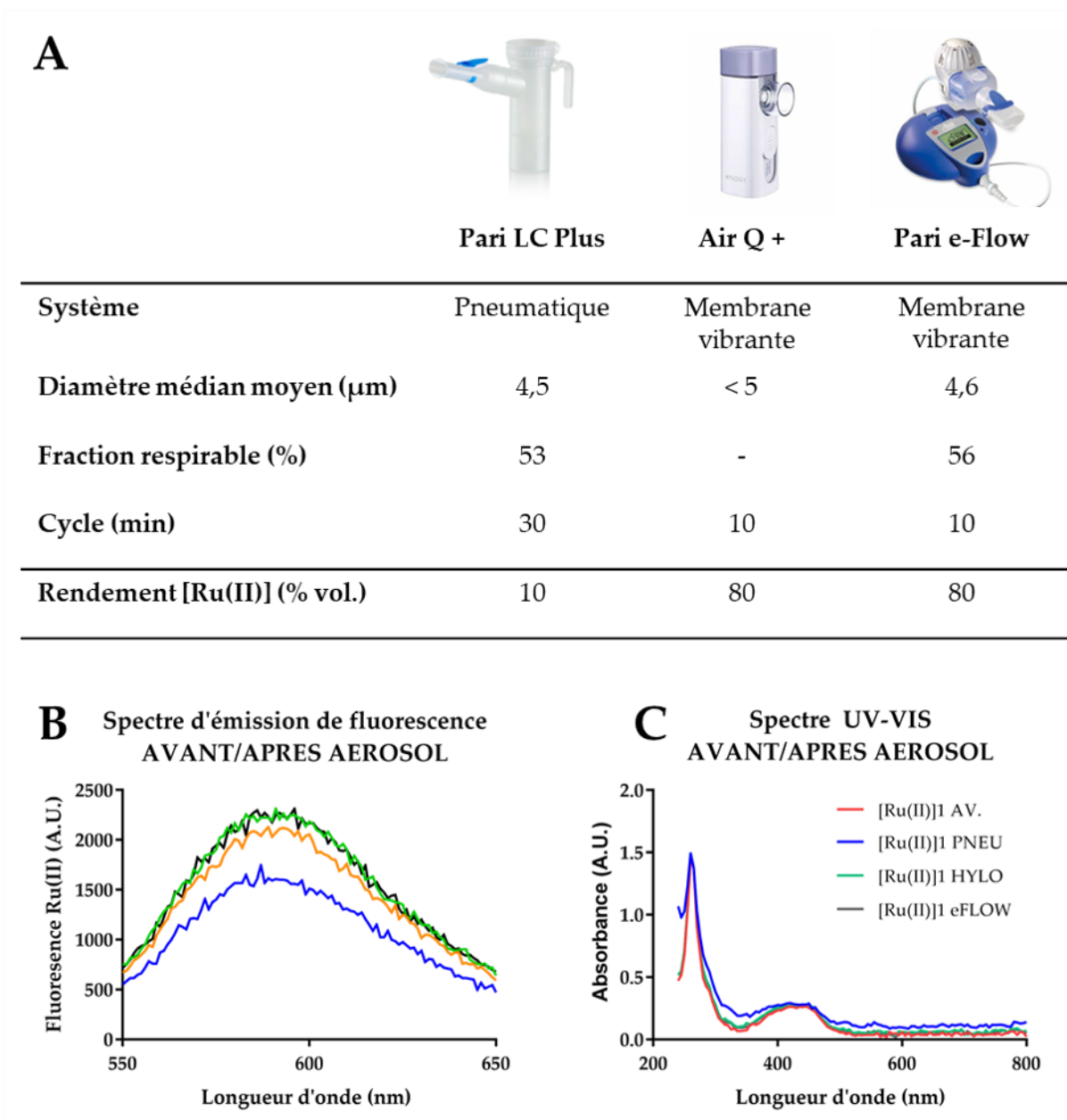
Ces résultats encourageants permettent de démontrer la faisabilité de la délivrance de [Ru(II)] par aérosolisation avec des nébuliseurs classiquement utilisés par les patients CF. Cette étude a été réalisée avec un complexe de référence, [Ru(II)]1. Cependant, la capacité d'aérosolisation de [Ru(II)] optimisés pour cette technique, par ajout d'adjuvants comme des liposomes classiquement utilisés pour l'aérosolisation d'antibiotiques par exemple, serait un réel avantage pour augmenter significativement la fraction inhalable [5].

De plus, même si la fluorescence a pu être visualisée avec le système d'imagerie NightOWL II LB983 NC320, des techniques complémentaires permettraient de quantifier plus justement la fraction inhalable du composé. La spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif, ou

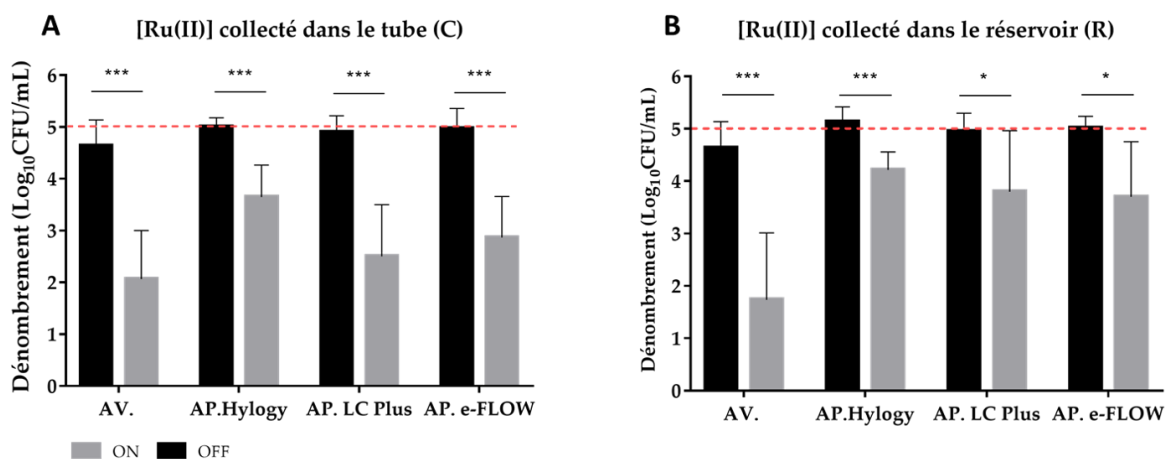
ICP-MS, permettrait de détecter l'ion Ruthénium(II) dans l'ensemble du tractus respiratoire, et cela, même avec échantillons très peu concentrés [9].

Des études complémentaires sont en cours au laboratoire afin d'estimer l'innocuité de ces différents échantillons par (i) analyse de coupes histologiques et (ii) estimation par RT-qPCR du niveau de stress oxydatif dans l'épithélium porcin. Globalement, le modèle porcin présente un avantage important en comparaison à des modèles plus standard comme la souris : l'anatomie et la taille des organes est plus proche de celle de l'homme. Cependant, mettre en place un modèle PDT porcin au laboratoire serait compliqué, notamment dans le cadre de la mucoviscidose car l'accessibilité des modèles CF porcins est restreinte. De plus, ils sont des modèles d'étude très fragiles et peu adaptés pour l'étude des infections bronchopulmonaires.

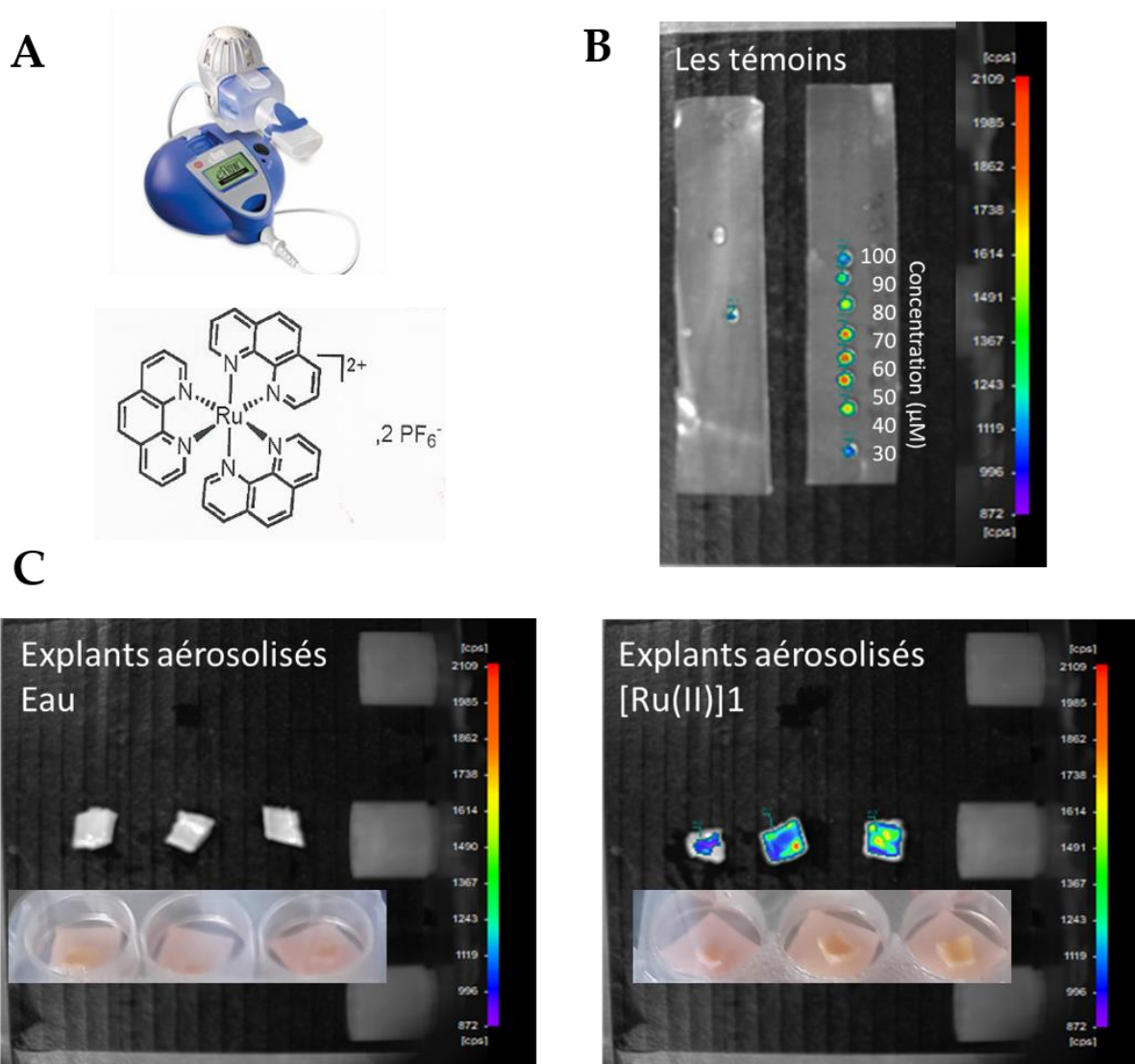
Enfin, avec l'aide d'une entreprise spécialisée dans le domaine de l'optique, un modèle de délivrance de la lumière a été conceptualisé et sera discuté davantage plus tard dans ce manuscrit (Cf Section Discussion).



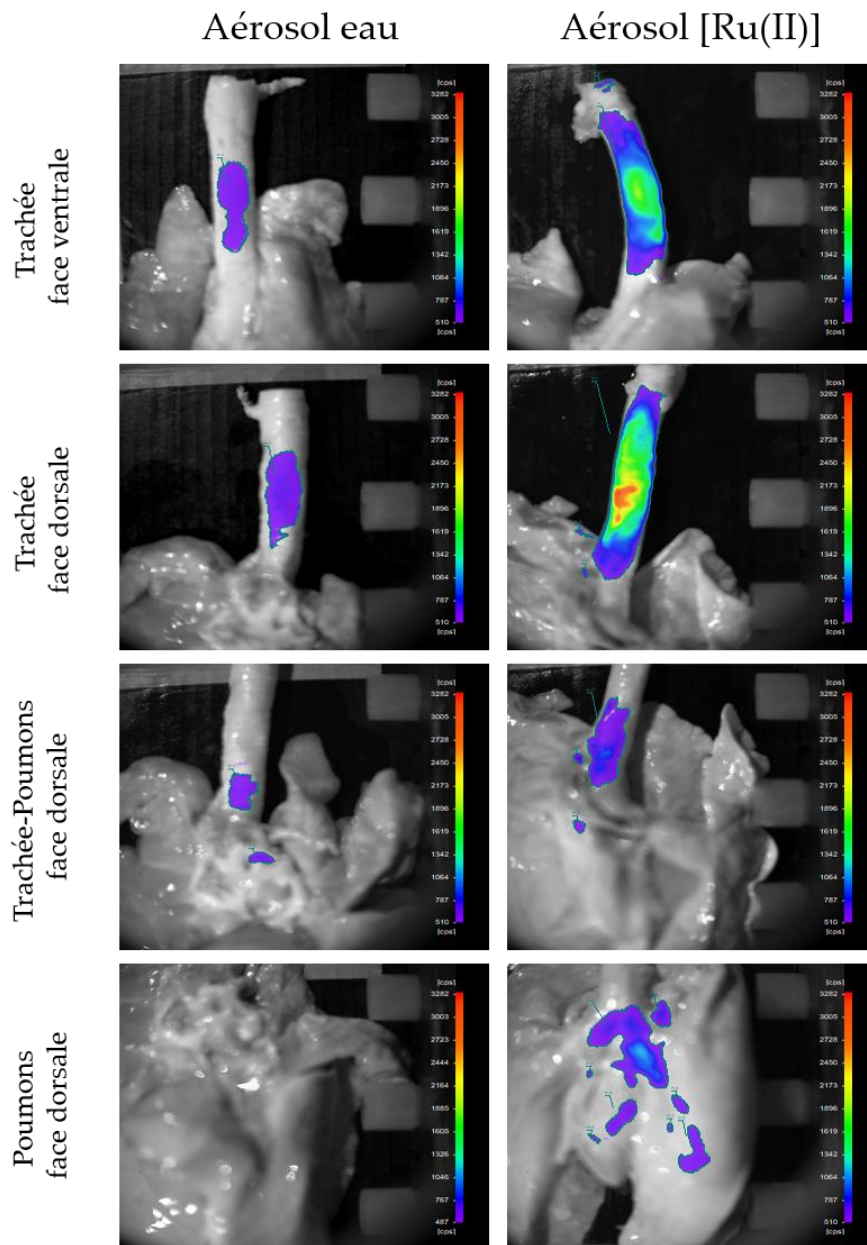
**Figure 1. Présentation des nébuliseurs utilisés lors de cette étude.** (A) Caractéristiques des nébuliseurs. (B) Réalisation des spectres de fluorescence et (C) UV-VIS avant (AV) et après nébulisation du [Ru(II)]1 avec le Pari LC Plus (Pneu), l'Air Q+ (Hylo) et le Pari e-Flow (e-Flow). Data représentées en moyenne  $\pm$  écart-type de 3 réplicats (représentatif de N=2). Diamètre aérodynamique massique médian : permet d'estimer la zone de dépôt de l'aérosol dans les voies aériennes. Fraction respirable : pourcentage estimé de particules délivrées dans les voies aériennes. Les chiffres de ces deux paramètres sont ceux renseignés par les fournisseurs des nébuliseurs. Le rendement correspond au pourcentage de volume récupéré dans le tube collecteur après l'aérosol de [Ru(II)]1.



**Figure 2. Effet PDT du [Ru(II)]1 après aérosol par dénombrement bactérien (*P. aeruginosa*).** Le [Ru(II)] est testé avant (AV.) et après nébulisation dans le tube collecteur (A) et dans le réservoir (B) avec les trois nébuliseurs. Hylogy : nébulisation de [Ru(II)] avec l’Air Q+. LC Plus : nébulisation de [Ru(II)] avec Le Pari LC Plus. E-Flow : nébulisation de [Ru(II)] avec le Pai e-Flow. Pour chaque condition : N=2, n=3 avec analyse statistique réalisée par t-test : \*\*\*, p-value ≤ 0.001; \*\*, p-value ≤ 0.01 ; \*, p-value ≤ 0.05 ; ns, non significatif.



**Figure 3. Visualisation de la délivrance de [Ru(II)]1 par aérosol sur les explants de porcs.** (A) Utilisation du Nébuliser e-Flow et du complexe [Ru(II)]1 pour les tests ex vivo. (B) Visualisation de la fluorescence ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) d'une gamme d'intérêt de [Ru(II)] avec le système d'imagerie NightOWL II LB983 NC320. (C) Détection de la fluorescence après un aérosol d'eau (témoin, à gauche) et du [Ru(II)]1 (à droite) sur des explants de porcs ( $n=3$ ). La gamme de fluorescence permettant la détection du [Ru(II)] sur explant a été définie entre 872 et 2109 cps (taux de comptage).



**Figure 4. Visualisation du [Ru(II)] aérosolisé avec l'e-Flow dans un prélèvement trachée-poumons de porcs sur différents plans. Du haut vers le bas de l'image : traçage de la fluorescence dans la trachée, au niveau de la carène puis dans les poumons. Un aérosol d'eau a été réalisée comme témoin (images colonnes de gauche). La gamme de fluorescence permettant la détection du [Ru(II)] a été définie entre 510 et 3282 cps (taux de comptage).**

## Références

1. University of Florida Multi-Center, Randomized Trial of Photodynamic Therapy Versus Argon Plasma Coagulation for Lung Cancer With Endobronchial Obstruction; [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), 2019;
2. Mayo Clinic An Evaluation of the Effectiveness of Photodynamic Therapy (PDT) Compared to Surgical Resection in Early Stage Roentgenographically Occult Lung Cancer.; [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), 2012;
3. Roswell Park Cancer Institute A Phase II Study of Photodynamic Therapy (PDT) Using 2-[1-Hexyloxyethyl]-2 Devinyl Pyropheophorbide-a (HPPH) for Treatment of Advanced Obstructing Endobronchial Lung Cancer; [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), 2014;
4. Cassidy, C.M.; Tunney, M.M.; Magee, N.D.; Elborn, J.S.; Bell, S.; Singh, T.R.R.; Donnelly, R.F. Drug and Light Delivery Strategies for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) of Pulmonary Pathogens: A Pilot Study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2011**, 8, 1–6, doi:10.1016/j.pdpdt.2010.12.007.
5. Kassab, G.; Geralde, M.C.; Inada, N.M.; Achilles, A.E.; Guerra, V.G.; Bagnato, V.S. Nebulization as a Tool for Photosensitizer Delivery to the Respiratory Tract. *Journal of Biophotonics* **2019**, 12, e201800189, doi:10.1002/jbio.201800189.
6. Geralde, M.C.; Leite, I.S.; Inada, N.M.; Salina, A.C.G.; Medeiros, A.I.; Kuebler, W.M.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Pneumonia Treatment by Photodynamic Therapy with Extracorporeal Illumination - an Experimental Model. *Physiological Reports* **2017**, 5, e13190, doi:10.14814/phy2.13190.
7. Baran, T.M.; Foster, T.H. Comparison of Flat Cleaved and Cylindrical Diffusing Fibers as Treatment Sources for Interstitial Photodynamic Therapy. *Med Phys* **2014**, 41, 022701, doi:10.1118/1.4862078.
8. Youf, R.; Nasir, A.; Müller, M.; Thétiot, F.; Haute, T.; Ghanem, R.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemercier, G.; Montier, T.; et al. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. *Pharmaceutics* **2022**, 14, 1664, doi:10.3390/pharmaceutics14081664.
9. Klose, M.H.M.; Theiner, S.; Kornauth, C.; Meier-Menches, S.M.; Heffeter, P.; Berger, W.; Koellensperger, G.; Keppler, B.K. Bioimaging of Isosteric Osmium and Ruthenium Anticancer Agents by LA-ICP-MS. *Metallomics* **2018**, 10, 388–396, doi:10.1039/C8MT00012C.

## II. Stratégies combinatoires à la PDT antimicrobienne

---

Envisager un traitement pour les patients CF qui couvre l'ensemble des symptômes liés à la maladie serait pertinent. Dans ce sens, l'utilisation des modulateurs de CFTR a pour avantage d'agir sur plusieurs d'entre eux [187]. Cependant, même pour ces patients, l'antibiothérapie doit continuer d'être administrée. Le plus souvent, elle est utilisée en bi ou trithérapie de façon à augmenter l'effet antibactérien et minimiser l'apparition des résistances [188,189].

Pour cette raison, une stratégie de PDT antimicrobienne pourrait être combinée aux traitements existants, en particulier l'antibiothérapie. Il s'agit d'estimer la possibilité de combiner leur effets (sans effet d'interférence réciproque) afin d'obtenir des synergies d'action.

### 1. PDT antimicrobienne et antibiothérapie

#### INTRODUCTION

Actuellement, les antibiotiques sont les seules molécules préconisées pour lutter contre les infections bronchopulmonaires bactériennes chez les patients CF. Optimiser et réduire leur utilisation sont deux stratégies prises en considération pour lutter contre l'émergence de résistances associées. Les trois principaux anti-*S. aureus* utilisés chez les patients CF (les linézolidés, les glycopeptides et les  $\beta$ -lactamines de type m $\acute{e}$ ticilline) sont particulièrement sujets à l'apparition de celles-ci. En combinaison à la PDT, des effets synergiques avec le linézolide, la vancomycine ou encore la m $\acute{e}$ ticilline ont pu être démontrés [190–192]. Par ailleurs, sur des souches multirésistantes de *S. aureus* et *P. aeruginosa*, la PDT peut induire une diminution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et faire ainsi évoluer le profil de résistance d'intermédiaire (I) à sensible (S) comme démontré sur les tétracyclines et  $\beta$ -lactamines [193]. Les combinaisons PS-antibiotiques ont été de nombreuses fois étudiées dans la littérature [194–196] et ont été détaillées dans la revue présentée précédemment (Cf Section Introduction, partie I, 2.3.). L'intérêt d'une PDT combinée à l'antibiothérapie dans le contexte des infections bronchopulmonaires chez les patients CF reste complexe à évaluer.

En effet, par Feng et al [197], ont recensé 66 combinaisons PDT-antibiotiques appliquées contre des pathogènes identiques à ceux pouvant coloniser les poumons des patients CF. D'après leur analyse, seules 40% d'entre elles ont témoigné d'un effet bénéfique (additif/synergique) sur ces bactéries en comparaison avec le traitement seul (**Table 8**). De plus, ces essais de traitement combinés sont réalisés en simultané ou en différé (PDT avant antibiotique), ce qui ne permet pas de comparer et d'établir des corrélations parmi toutes les combinaisons listées.

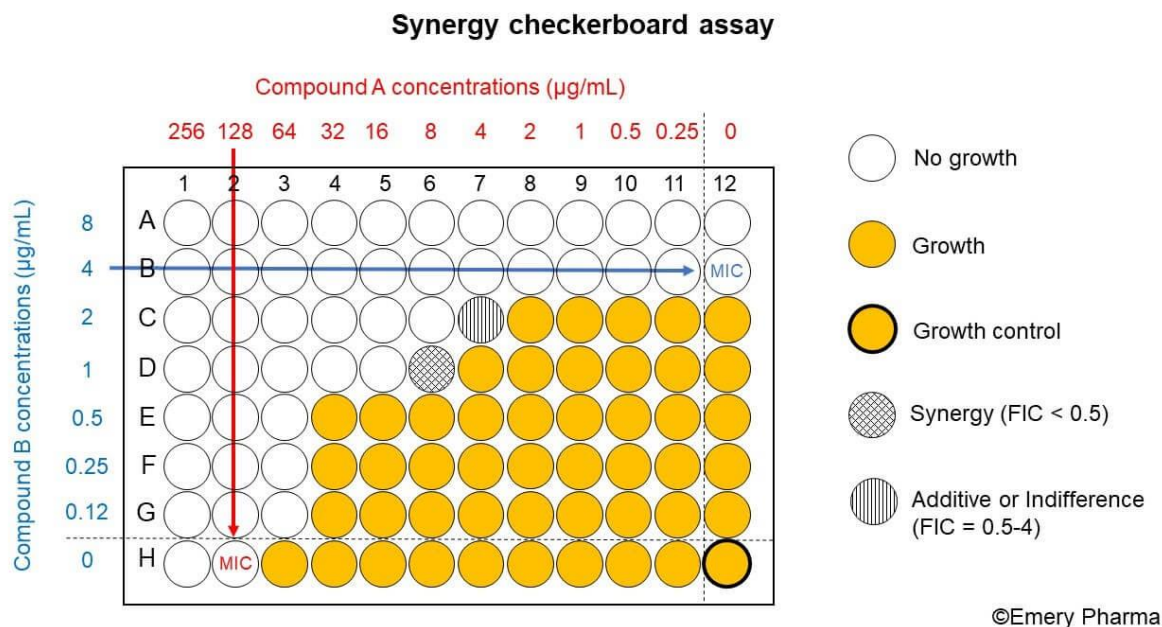
Le positionnement de la [Ru(II)]-PDT vis-à-vis de l'antibiothérapie sera étudié sur des souches cliniques CF selon deux approches. La première vise à voir l'effet d'une combinaison d'un PS de référence ([Ru(II)]1) avec un antibiotique de référence (la ciprofloxacine). La seconde aura pour intérêt d'évaluer l'effet d'un traitement [Ru(II)]-PDT sur le long terme et les apparitions possibles de résistance aux antibiotiques et à ce propre traitement.

**Table 8. Datas bibliographiques reprenant les combinaisons antibiotique - PDT réalisées sur des espèces d'intérêt** | Ces dernières comprennent les principales bactéries retrouvées dans les poumons des patients CF, comme évoqué dans l'introduction (Cf Section Introduction, partie II, 2.3.). Légende : \* Ordre : PDT → AB : PDT réalisée avant utilisation de l'antibiotique (AB). \*\* Synergie : nombre de résultats démontrant une synergie d'action sur le nombre total de PS testé. (Synthèse d'après la revue systématique de [197])

Antibiotique	Souche	Ordre*	PS (longueur d'onde d'illumination)	Synergie**
Polymyxine B	<i>S. aureus</i>	Simultané	Porphyrine cationique (380-700nm) ; Chlorin-e6 (380-700nm) ; MB (630 nm)	+ (2/3)
	<i>P. aeruginosa</i>	Simultané	Porphyrine cationique (380-700nm) ; Chlorin-e6 (380-700nm) ; MB (630 nm)	+ (3/3)
Ceftazidime	<i>P. aeruginosa</i>	PDT → AB	Endogenous PS (400-525nm) ; MB (635nm) ; TMP (635nm)	+ (1/3)
	<i>B. cepacia</i>	PDT → AB	MB (635nm)	+ (1/3)
Méropénem	<i>P. aeruginosa</i>	PDT → AB	PS endogène (400-525nm) ; MB (635nm) ; TMP (635nm)	+ (1/3)
	<i>B. cepacia</i>	PDT → AB	MB (635nm)	+ (1/3)
Vancomycine	<i>S. aureus</i>	PDT → AB	ALA (633 nm) ; (Deutero-)porphyrin (360-430nm) ; MB (635nm) ; TMP (635nm)	+ (2/3)
	<i>S. aureus</i>	Simultané	MB (660nm) ; Porphyrine (510nm) ; TAPP (380-700nm)	+ (1/3)
Chloramphénicol	<i>S. aureus</i>	Simultané	Tetra-Py + -Me (380-700nm) ; MB (380-700nm) ; TAPP (380-700nm)	+ (2/3)
	<i>B. cepacia</i>	PDT → AB	MB (380-700nm)	+ (1/1)
Amikacine	<i>M. fortuitum</i>	PDT → AB	MB (560-780nm)	+ (1/1)
Acide fusidique	<i>S. aureus</i>	PDT → AB	(Deutero-)porphyrin (360-430nm) ; MB (635nm) ; TMP (635nm)	- (0/3)
Gentamicine	<i>S. aureus</i>	PDT → AB	ALA (630 nm) ; Deuteroporphyrin (360-430nm)	+ (1/2)
	<i>S. aureus</i>	Simultané	MB (625nm) ; RB (515 nm) ; TB (630nm) ; 9-ITMPo (635nm)	+ (4/4)
	<i>P. aeruginosa</i>	PDT → AB	PS endogène (405nm)	+ (1/1)
	<i>P. aeruginosa</i>	Simultané	PS endogène (532nm)	+ (2/2)
Kanamycine	<i>S. aureus</i>	Simultané	Porphyrine cationique (380-700nm) ; RB (380-700nm)	+ (1/2)
Linézolide	<i>S. aureus</i>	PDT → AB	MB (660nm) ; TMP (635nm) ; TB (630nm)	+ (2/4)
	<i>S. aureus</i>	Simultané	MB (625nm)	+ (1/2)
Minocycline	<i>S. aureus</i>	Simultané	PS endogène (400-525nm)	- (0/1)
	<i>P. aeruginosa</i>	Simultané	PS endogène (400-525nm)	- (0/1)
Muciporine	<i>S. aureus</i>	PDT → AB	MB (660nm) ; TMP (635nm)	- (0/2)
Tétracycline	<i>S. aureus</i>	Simultané	Porphyrine cationique (380-700nm) ; PS endogène (400-525nm)	- (0/2)
	<i>P. aeruginosa</i>	Simultané	PS endogène (400-525nm)	- (0/1)
Tobramycine	<i>P. aeruginosa</i>	PDT → AB	MB (635nm) ; TMP (635nm)	- (0/2)
	<i>B. cepacia</i>	PDT → AB	MB (635nm)	+ (1/1)
	<i>S. aureus</i>	Simultané	TAPP (380-700nm)	+ (1/1)
Ciprofloxacine	<i>S. aureus</i>	Simultané	PS endogène (940nm)	+ (1/1)
	<i>B. cepacia</i>	PDT → AB	MB (635nm)	+ (1/1)
	<i>M. fortuitum</i>	PDT → AB	MB (560-780nm)	+ (1/1)
Quinolone	<i>S. aureus</i>	PDT → AB	Porphyrine (400-800nm)	+ (1/1)
Rifampicine	<i>S. aureus</i>	PDT → AB	(Deutero-)porphyrin (360-430nm)	- (0/1)

## METHODOLOGIE ET RESULTATS

Pour répondre au premier objectif, des tests de combinaison ont été effectués par la méthode de « Checkerboard Assay », une méthode visant à étudier les synergies entre différents agents antimicrobiens (**Figure 25**).



**Figure 25.** Principes du "Checkerboard Assay" couramment employé pour évaluer les synergies entre deux antibiotiques donnés | Exemple de méthodologie (EmeryPharma®) avec deux composés d'intérêt (A et B). Les notions de « FIC » seront expliquées par la suite

La méthodologie consiste à utiliser des doses croissantes d'un antimicrobien seul (ici, ciprofloxacine) et en combinaison avec un autre (ici, [Ru(II)]) sur des bactéries d'intérêt, soit deux souches *S. aureus* (RN4220 et N315) ainsi que deux (*P. aeruginosa* Pa19 et PaH). Après la préparation des gammes de composés,  $10^5$  CFU/mL des inocula de ces souches sont ajoutés avant d'effectuer un traitement lumineux comme réalisé précédemment [186].

Des cinétiques de croissance ont permis d'obtenir une vision globale de l'effet de la combinaison testée. Un effet combiné est observé (par repiquage mais aussi par cinétique) chez les souches sensibles *S. aureus* RN4220 et *P. aeruginosa* Pa19 (**Figure 26**). Les souches MDR *S. aureus* N315 et *P. aeruginosa* PaH sont résistantes aux deux traitements, qu'ils soient appliqués individuellement ou en combinaison. Ces résultats démontrent que la combinaison testée peut être intéressante contre les souches sensibles. En revanche, les souches MDR ne réagissent pas au traitements d'intérêts, qu'ils agissent seul ou en combinaison.

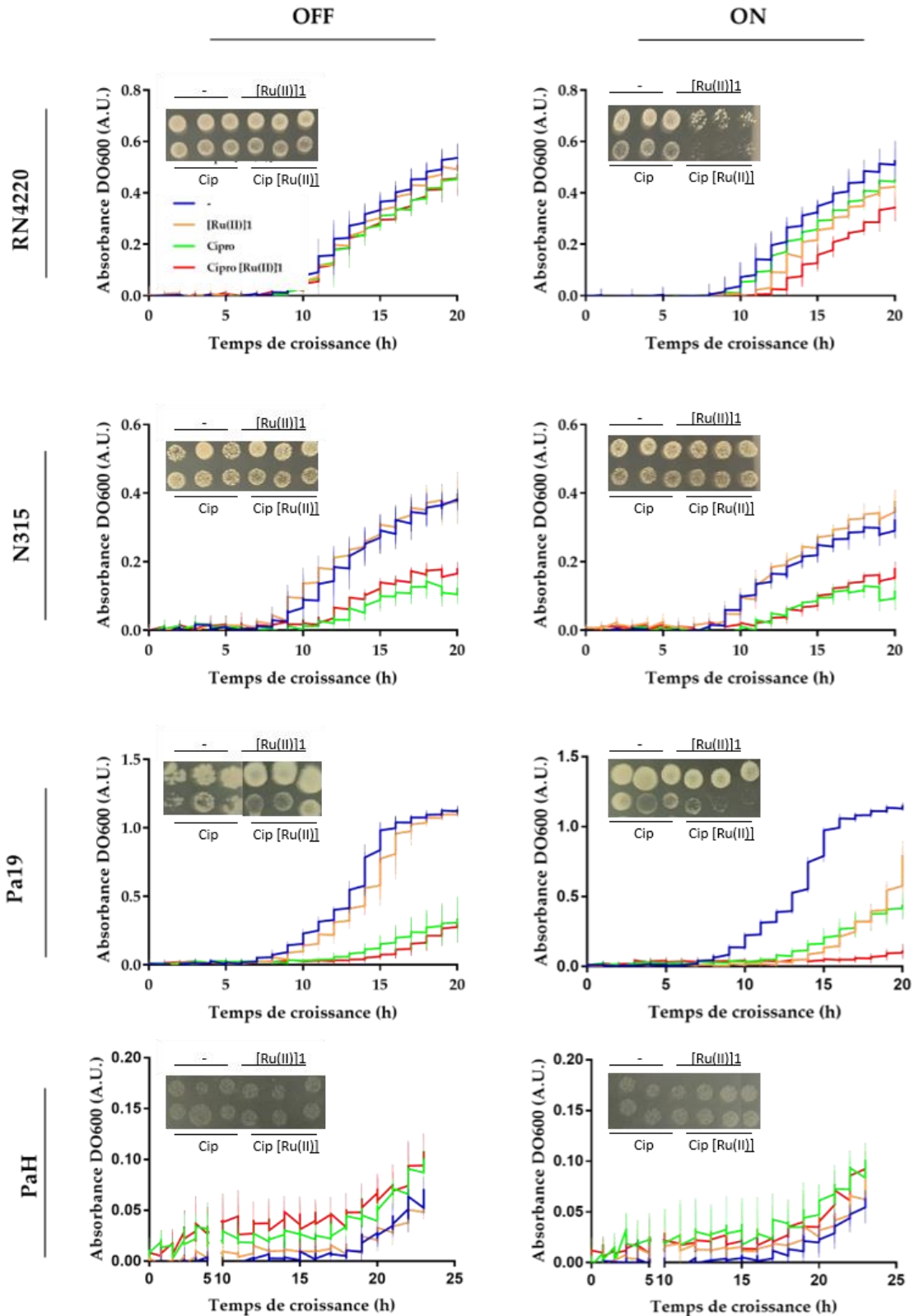
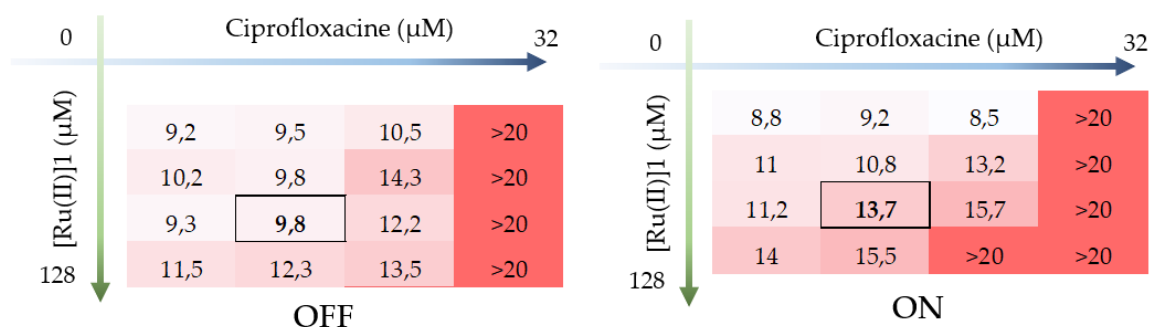


Figure 26. Cinétiques de croissance (sur 20-24h) des souches *S. aureus* (RN4220 et N315) et *P. aeruginosa* (Pa19 et PaH) après le « Checkerboard Assay » | Les bactéries ont été traitées avec la ciprofloxacine et/ou le [Ru(II)]1 avec et sans irradiation lumineuse (ON et OFF). Cip : ciprofoxacine

Une méthode complémentaire est proposée afin d'évaluer plus précisément quel est l'effet de la combinaison, à savoir un effet synergique, antagoniste ou encore additif. Pour cela, « les temps de virage »<sup>17</sup> (TV) ont été relevés pour chaque condition après les cinétiques de croissance (**Figure 27**).



**Figure 27. Exemple de temps de virage (h) obtenus à la suite d'un « checkerboard assay » avec *S. aureus* RN4220**  
 | Les dose testées de [Ru(II)]1 sont de 0, 32, 64 et 128 μM (du bas vers le haut). Les doses testées de Ciprofloxacin sont de 0, 8, 16 et 32 μM (de gauche à droite). Ces valeurs correspondent au temps nécessaire pour que la bactérie atteigne une DO de 0,1 de croissance après traitement lumineux (OFF (gauche) ON (à droite)) en présence de ciprofloxacin et/ou [Ru(II)]1.

De ce fait, les variables (TV) permettent d'identifier les concentrations minimales inhibitrices (CMI). En effet, si le TV de la condition testée est supérieur au TV du contrôle, alors cette condition correspond à une CMI. Ces dernières sont déterminées pour chaque composé (CMI Cip et CMI [Ru(II)]1) indépendamment, et l'un en combinaison avec l'autre (CMI Mix Cip et CMI Mix [Ru(II)]1). Ces valeurs permettent de calculer la concentration inhibitrice fractionnelle (CIF) de chaque molécule (*Equations (2 et 3)*). L'index CIF résulte de la somme de ces deux ratios (*Equation (4)*).

$$\text{Equations (2 et 3)} : \text{CIF Cip} = \frac{\text{CMI Mix Cip}}{\text{CMI Cip}} \text{ et } \text{CIF [Ru(II)]1} = \frac{\text{CMI Mix [Ru(II)]1}}{\text{CMI [Ru(II)]1}}$$

$$\text{Equation (4)} : \text{Index CIF} = \text{CIF Cip} + \text{CIF [Ru(II)]1}$$

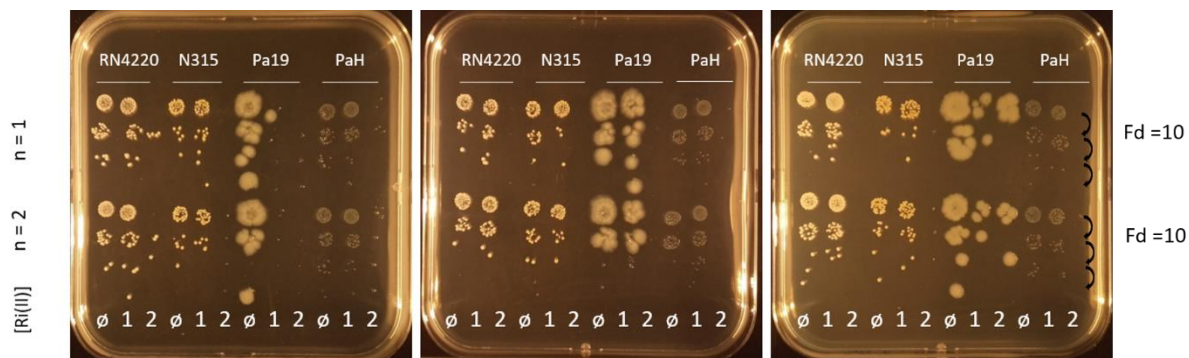
Selon la valeur obtenue, l'activité antimicrobienne issue de la combinaison est synergique (CIF < 0,5), antagoniste (CIF > 4) ou additive (0,5-4). En théorie, pour valider l'action synergique d'un PS sur un antibiotique, le CIF devrait être validé uniquement en « ON », pour apprécier l'effet de la PDT et non du PS sans lumière. Par exemple, dans le cadre de la combinaison

<sup>17</sup> Les temps de virage : heures nécessaires pour que les croissances bactériennes puissent atteindre une DO seuil (ici à DO 0,1)

([Ru(II)]-Cip) illustrée précédemment (**Figure 26**), l'index de CIF calculé est de 0,5. D'après ces différents seuils, l'effet observé de la combinaison semble être additif et non synergique. Il serait intéressant de tester d'autres antibiotiques pour compléter cette étude afin d'établir des corrélations entre les index obtenus et la nature des antibiotiques testés. Dans le cadre des infections bronchopulmonaires chez les patients CF, il y a un intérêt à combiner la PDT avec des antibiotiques dont le taux d'apparition de résistances est élevé. Dans le cas de la ciprofloxacine, ce taux n'est pas négligeable [198]. De plus, des effets synergiques entre cet antibiotique et d'autres PS que les [Ru(II)] ont déjà été rapportés dans la littérature [199,200].

Au-delà des antibiotiques, d'autres molécules antimicrobiennes peuvent être combinés à la PDT comme les peptides antimicrobiens. Le pexiganan ou l'aurein, par exemple, ont prouvé leur potentialisation sur la PDT [201,202]. Cependant, il est souvent rapporté dans la littérature que l'efficacité de ces molécules peut être altérée par de multiples facteurs physico-chimiques, incluant les variations de température, pH ou encore la salinité [203]. Dans la partie précédente (Cf Section Résultats, partie I, 1.1.) l'étude réalisée a démontré que les PS pouvaient également être sensibles à certains de ces paramètres. Certains PS issus d'organismes marins pourraient être davantage adaptés pour tolérer ces variations [204]. L'environnement marin est une source d'organismes exposés à de fortes variations physico-chimiques; de nouvelles molécules thérapeutiques pourraient en être extraites et se révéleraient particulièrement intéressantes pour ces applications combinatoires [205–207].

Par la suite, l'efficacité de la PDT sur le long-terme a été évaluée pendant 8 cycles consécutifs (réalisés avec 24 h d'intervalle entre chaque cycle). Pour cela, avant le premier cycle, des cultures de nuit de *S. aureus* (RN4220 et N315) et *P. aeruginosa* (Pa19 et PaH) ont été centrifugées, lavées puis resuspendues en NaCl 0,45% après avoir lu la DO600 de façon à réajustée la charge de l'inoculum à  $10^5$  CFU/mL pour chaque souche. Après irradiation des souches en présence de [Ru(II)]1 (5  $\mu$ M) et [Ru(II)]2 (1  $\mu$ M), tous les mix sont dilués en cascades puis repiqués sur gélose LB agar (**Figure 28**) et sur gélose longue conservation. Le volume restant est ensuite ajouté dans 5mL de LB et sont mis à incuber pendant 18h à 37°C sous agitation (220 rpm). Le lendemain, le même protocole est réalisé à partir de ces cultures, le tout sur une durée de 8 jours consécutifs. Les repiquages réalisés sur gélose LB agar après irradiation (ON) permettent d'évaluer l'efficacité des [Ru(II)] dans le temps (**Figure 28**).



**Figure 28. Evaluation de la capacité des [Ru(II)]1 et 2 à conserver leur phototoxicité dans le temps** | Chaque photo illustre l'effet PDT ([Ru(II)] + ON) après 2 (photo 1), 4 (photo 2), et 8 (photo 3) cycles de traitement (à raison d'un cycle toutes les 24h). Chaque condition est dupliquée (n1 et 2) et diluée en série (Facteur dilution (Fd) : 10) quatre fois pour visualiser la charge bactérienne restante après traitement. Légende : Ø : sans [Ru(II)] ; 1 : avec [Ru(II)]1 et 2 : avec [Ru(II)]2.

La faible concentration utilisée en [Ru(II)]1 ne permet de visualiser d'effet PDT, peu importe le cycle. En revanche, [Ru(II)]2 a conservé son efficacité tout le long de la manipulation.

L'impact des cycles successifs de PDT sur le résistome<sup>18</sup> a ensuite été évalué. Pour cela, des antibiogrammes ont été réalisés par le HIA (Hôpital d'Instruction des Armées de Percy) à J0, J1 et J8 (correspondant aux cycles 0, 1 et 8) afin de détecter les éventuelles variations sur les phénotypes de résistances de chaque souche au cours des 8 jours. Aucune variation n'a été observée sur les antibiogrammes (données non présentées, réalisées par le HIA), ce qui suggère que la PDT répétée sur une longue durée n'impacte pas le résistome des souches testées. De plus, la tolérance bactérienne à la PDT sur le long terme a été évaluée. Pour cela, toutes les lectures de DO à 600 nm sur les 8 jours ont été collectées afin de déterminer l'index de croissance (IC) (Equation (5)).

$$\text{Equation (5) : IC} = \text{DO600}([\text{Ru(II)}]1) / \text{DO600}(\text{Contrôle})$$

Par exemple, à J1, si les souches « contrôle » et « traitée » ont repoussé de la même façon alors le rapport est égal à 1. À mesure de l'application des cycles, si le rapport est toujours égal à 1, alors il n'y a pas « d'effet long terme » observé. Plus le rapport est faible, plus la capacité de la souche à pouvoir repousser après traitement est faible (**Figure 29**). La principale chose notable à la suite de ce test est que, au bout de 5 cycles de PDT à base de [Ru(II)]2, la souche PaH n'a pas bien supporté le traitement (IC < 0,04). Pour trois autres souches testées avec ce complexe,

<sup>18</sup> Résistome : ensemble des résistances gènes de résistances (endogènes ou acquises) pour un ou plusieurs antibiotiques donné(s)

aucune variation d'IC n'a été observé. Ces tests pourraient être reproduits en utilisant des doses de [Ru(II)]1 plus importantes afin de voir si un effet long-terme sur PaH avec ce PS peut également être observé.

On peut en déduire que, à l'issue d'un certain nombre de cycles, il est possible de déclencher un effet PDT sur une souche qui, au premier traitement, ne semblait pas être sensible.

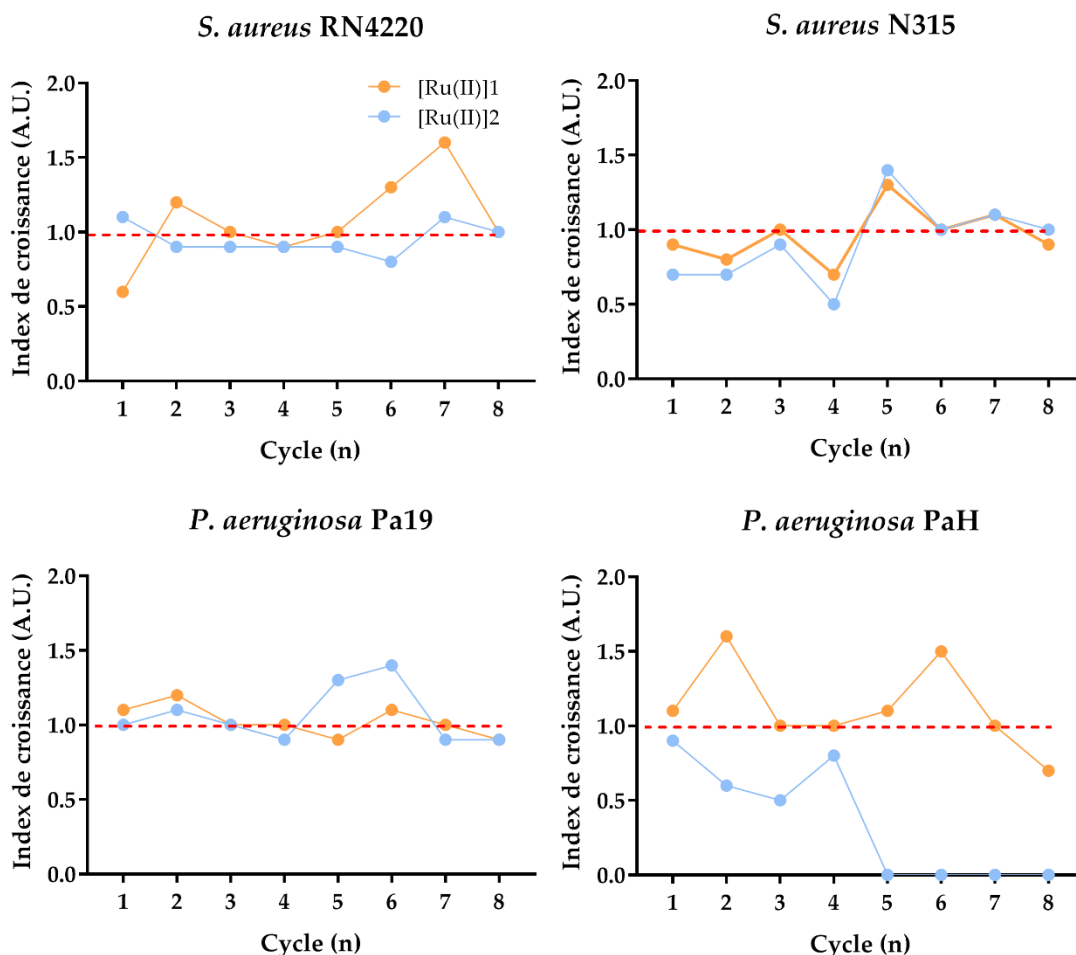


Figure 29. Evaluation de l'index de croissance (IC) après 8 cycles consécutifs de PDT contre les quatre souches d'intérêt.

Ces tests ont mis en avant une des limites de l'application PDT avec l'utilisation de [Ru(II)] comme PS : l'effet observé est davantage bactériostatique que bactéricide. En effet, malgré les traitements consécutifs avec le [Ru(II)]2, des souches testées (hormis PaH) peuvent repousser normalement d'un cycle à l'autre. Ceci traduit un effet transitoire du traitement. Tester cette approche avec davantage de souches cliniques et avec des PS autres que les [Ru(II)] serait pertinents pour mieux comprendre l'effet à long terme d'une PDT antimicrobienne dans le contexte de la mucoviscidose.

## 2. PDT antimicrobienne et thérapie génique

Dans le cadre des infections bronchopulmonaires chez les patients CF, combiner les thérapies antimicrobiennes entre elles permettrait, sur le long terme, de réduire l'utilisation des antibiotiques et ainsi, limiter la propagation des résistances associées. Cependant, les infections ne sont pas les seules manifestations pulmonaires à impacter les capacités respiratoires des patients. L'idée de combiner une approche antimicrobienne à une approche à visée curative serait intéressant. Utiliser des formulations permettant d'obtenir les activités de transferts de gènes aux activités antimicrobiennes serait une stratégie combinatoire pertinente dans l'objectif de réduire les infections tout en augmentant la quantité de *CFTR* fonctionnel.

### *Nota bene*

L'étude suivante a pour objectif de mettre en avant l'intérêt de liposomes fonctionnalisés dans une approche combinatoire incluant une thérapie génique et une application antibactérienne. Le potentiel des lipides cationiques comme agents de transfection a été démontré dans un certain nombre d'études réalisées dans le cadre d'une collaboration de l'équipe GTCA et celle du Pr. Paul-Alain Jaffres (UMR CNRS 6521)[140]. Des techniques de fonctionnalisation telles que la « réaction-click » peuvent permettre d'obtenir des vecteurs compatibles pour d'autres approches que le transfert de gènes. À notre connaissance, l'idée de les fonctionnaliser avec des molécules photosensibles pour obtenir des formulations transfectantes et antimicrobiennes par PDT n'a pas été rapporté dans la littérature.



Research article

# Click Chemistry Functionalized Cationic Amphiphiles: Interest for Multimodal Applications Including Eukaryotic Cell Transfection and Antimicrobial Photodynamic Inactivation

Raphaëlle Youf <sup>1</sup> et al.

<sup>1</sup> INSERM, Univ Brest, EFS, UMR 1078, GGB-GTCA, 29200 Brest, France

<sup>2</sup> Univ Brest, CNRS, CEMCA UMR 6521, 6 Avenue Victor Le Gorgeu, 29238 Brest, France

<sup>3</sup> CHRU de Brest, Service de Génétique Médicale et Biologie de la Reproduction, Centre de Référence des Maladies Rares "Maladies Neuromusculaires", 29200 Brest, France

\* Correspondence: e-mail@e-mail.com; Tel.: (optional; include country code; if there are multiple corresponding authors, add author initials)

**Abstract:** Click chemistry is a powerful method to graft various moieties on a chemical backbone, thereby allowing implementing multiple properties in a single molecular scaffold. Here, a previously reported lipophosphoramidate (BSV36) was used to prepare a series of liposomes clicked with either a thioamide-1,8 naphthalimide or a nitroaniline moiety, this being done before or after liposome preparation. The various liposomes thus obtained could display – separately or in combination – multiple properties, i.e. fluorescence, NO release, and ROS generation. They were used to conduct a series of assays highlighting their potential to photo-inactivate clinical bacterial strains, to tag bacteria via fluorescence detection, and to deliver DNA into human-derived cell lines. Importantly, these activities may be cumulatively obtained, without any obvious reciprocal interference. This work thus opens up further perspectives for the use of multimodal nanovesicles for various biomedical applications, especially the treatment of recalcitrant infections in the context of genetic diseases such as cystic fibrosis.

**Keywords:** antibacterial; fluorescence; gene therapy; NO release; ROS generation; theranostic

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.;

Lastname, F. Title. *Int. J. Mol. Sci.*

2022, 23, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

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



**Copyright:** © 2022 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

Liposomes are versatile carriers and platforms useful for many biomedical applications, in as diverse fields as vaccination, dermatology, and gene delivery to cite only few. Our team has a long standing expertise working with cationic lipids, especially lipophosphoramidates. In a previous work, we have reported that liposomes prepared with arsonium-containing lipophosphoramidates were capable to achieve gene transfer into eukaryotic cells while killing bacteria in their surrounding medium [1]. These “all-in-one” liposomes were shown active – *per se* – meaning without carrying any biocide component and only due to their chemical composition and formulation. A detailed structure-activity relationship study pointed out the respective importance on the activities studied of the different parts of amphiphiles i.e. the polar headgroup, the linker and the hydrophobic domain. It is noteworthy here that ammonium-containing lipophosphoramidates were found inefficient (up to 200  $\mu$ M) against the bacteria investigated, highlighting the prime importance of the cation in the polar headgroup.

Implementation of several properties in a given molecular scaffold may be done following different chemical strategies, including via click reaction, for bioconjugation joining moieties used as substrates with specific biomolecules. This has been successfully used in very different settings, notably for decorating liposomes. For instances, Khalil et

al. reported the incorporation of lipophilic phosphonodithioesters in phospholipid formulations via metal free coupling [2]. The synthesis of cationic amphiphilic compounds was also reported through the use of the phosphonodithioester-amine coupling reaction. It was shown that this versatile reaction can occur at room temperature without the aid of any catalyst; it was used to bind a lipid moiety to a polar head group and the resulting amphiphiles were shown efficient to perform gene delivery in cell lines [3]. Yet, click reaction could be used for implementing many other, including photochemical, properties.

Photodynamic therapy shows great promise for therapeutic applications in many clinical settings [4,5]. It may be achieved using different types of so-called photosensitizers (PS), for inducing the generation of reactive oxygen species (ROS). For instance, we have recently reported the potential of Ruthenium(II) complexes for obtaining antibacterial effects towards clinically relevant bacterial strains, namely *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Apart these specific PS, other compounds can also release biocidal molecular species, in particular nitric oxide (NO) also useful for NO antimicrobial therapy. Naphthalimide derivatives have been reported in multiple instances for sensor applications, due to interesting fluorescence properties [6]. It may also behave as a PS although, to our knowledge, that used in the present study (i.e. thioamide-1,8 naphthalimide) has been scarcely used for PDT purposes yet.

In the present work, we report on the use of the ammonium-containing lipophosphoramidate BSV36 to prepare a series of liposomes functionalized via click chemistry with either or both of thioamide-1,8 naphthalimide and nitroaniline. They were characterized as regard (i) their physicochemical and photophysical properties, (ii) gene transfer activity into human cell lines, and (iii) phototoxic effects towards Gram(+) and Gram(-) bacterial strains or eukaryotic cells. Finally, we examined whether eukaryotic cell transfection and antimicrobial photodynamic inactivation could be obtained using a same liposomal preparation.

## 2. Results

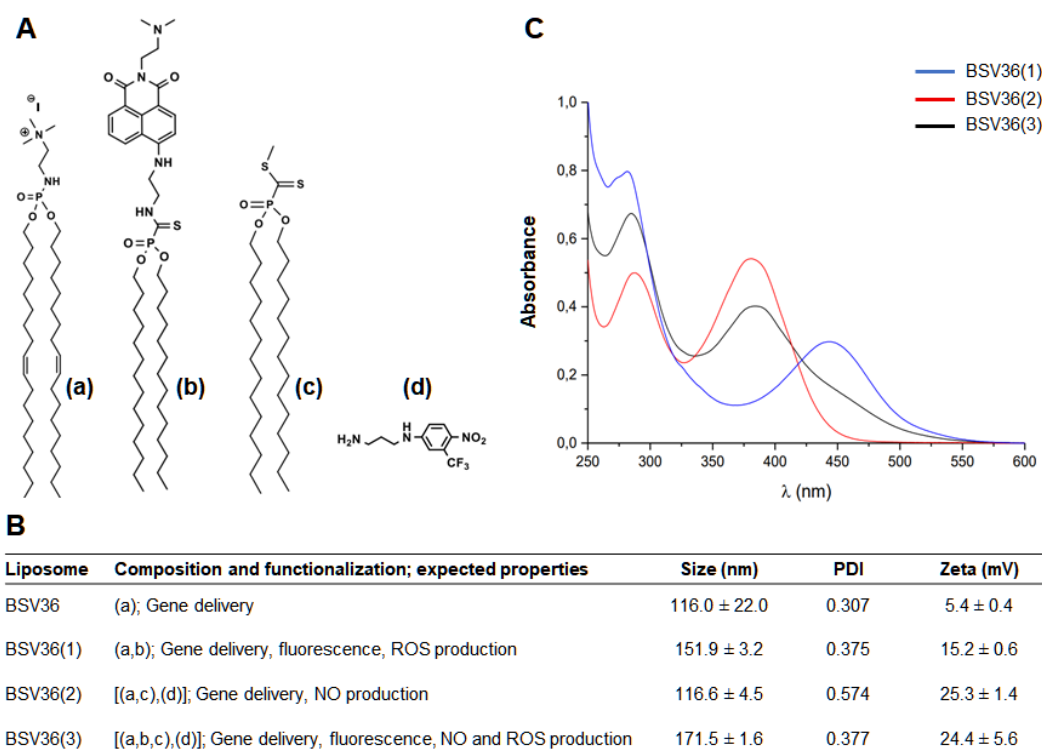
### *Liposomal preparations and physicochemical characterizations*

In this study, the BSV36 cationic lipid was used as a benchmark compound for preparing “bare” (non-functionalized) liposomes and three derived click chemistry functionalized liposomes, hereafter noted BSV36, BSV36(1), BSV36(2), and BSV36(3), respectively (Figure 1A).

Liposomes were prepared using the thin lipid film hydration method, as previously reported [7,8]. For preparing BSV36(1) and BSV36(3), BSV36 was first mixed with the thioamide-1,8 naphthalimide lipid (b) before preparation of the lipid film. BSV36(2) and BSV36(3) were obtained after liposome formation, following functionalization via click reaction engaging the dithioester of (c) with the nitroaniline (d).

Beside gene delivery ability provided by BSV36, the various functionalized BSV36-based liposomes were expected to exhibit additional properties, i.e. fluorescence (BSV36(1)), NO release (BSV36(2)), ROS generation (BSV36(1)), or all at once (BSV36(3)) (Figure 1B).

Following preparation of liposomes, they were characterized by dynamic light scattering (DLS) to determine their respective size, polydispersity index (PDI) and zeta potential. The distribution of sizes and zeta potential varied from 116.0 to 171.5 nm and 5.4 to 25.3 mV, respectively (Figure 1B), with repeatable values and acceptable PDI. Considering UV-visible absorption, three different peaks could be observed that could be ascribed to either BSV36 ( $\lambda$  max ~280 nm), the nitroaniline moiety ( $\lambda$  max ~385 nm) or the 1,8 naphthalimide grafting ( $\lambda$  max ~450 nm), respectively (Figure 1C).



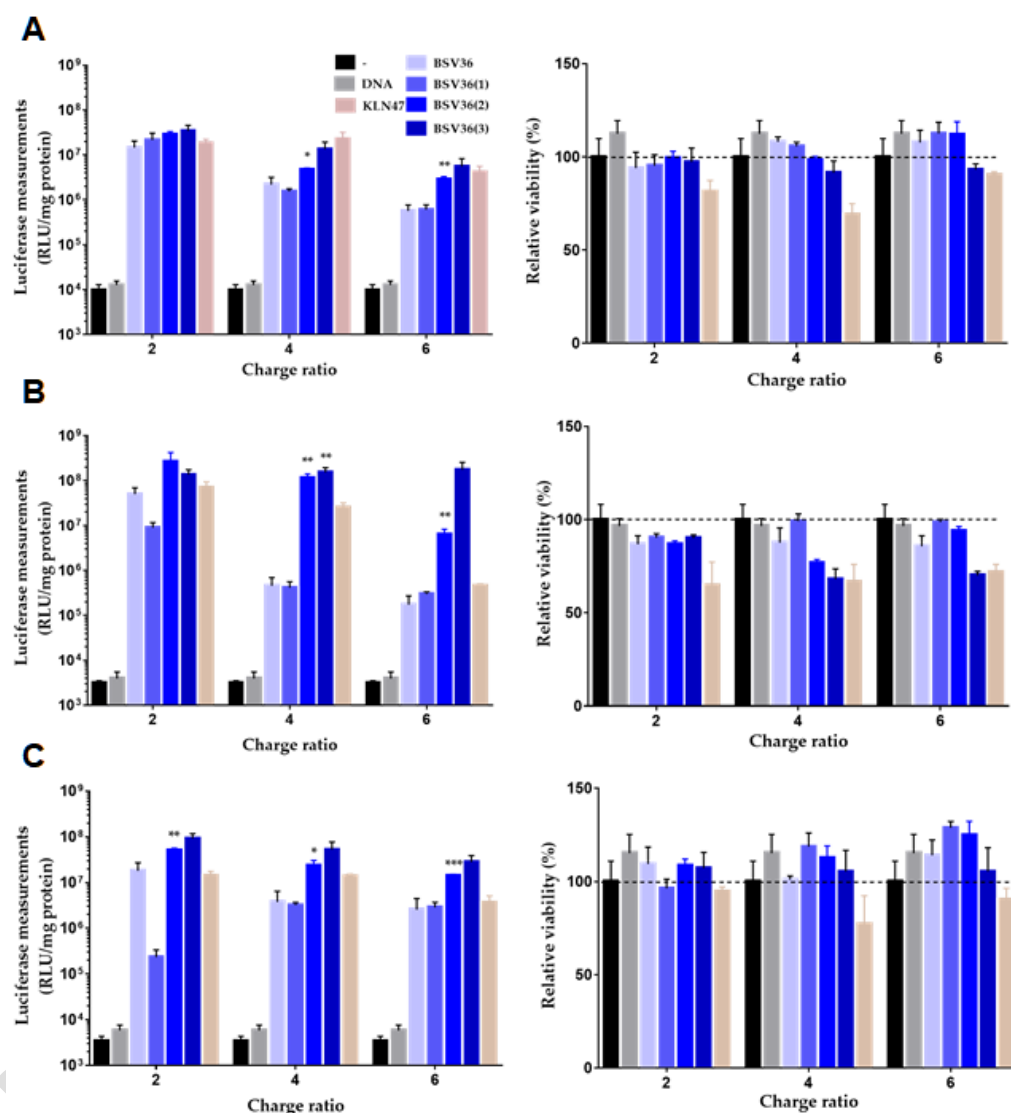
**Figure 1.** Individual compounds (A) and their combinations in liposomes characterized via DLS (B) and UV-visible spectrophotometry (C). (a) BSV36, (b) thioamide-1,8 naphthalimide lipid, (c) dithioester lipid, (d) nitroaniline. Liposomal formulations were first prepared by mixing (a), (b), and/or (c) and using the thin lipid film hydration method. An additional step consisted to click react (d) with (c) to obtain either BSV36(2) and BSV36(3).

### Transfection assays

Every liposome formulation was mixed with a fixed amount (i.e. 0.25 µg) of luciferase-encoding pDNA (pGM144 [9]) in order to form lipoplexes characterized with different positive to negative charge ratios (which corresponds to the positive charges provided by trimethyl-ammonium headgroup in BSV36 to the negative charges provided by the pDNA). After complexation for 30 min at room temperature, these mixtures were used to conduct several assays.

First, samples were subjected to agarose gel electrophoresis. For all tested BSV36-based liposomes, the results demonstrated that the pDNA was fully compacted within liposomes, regardless their compositions and the CR tested (**Figure S1**).

Second, complexes were added to the culture medium of various cell lines growing as adherent monolayers. After 24 h of transfection, cells were lysed to proceed to luciferase assay, viability test and protein dosage. The well-documented lipophosphoramidate KLN47 was used as a positive control in transfection experiments (**Figure 2**) Except at CR2 with A549 and CFBE, BSV36(1)-based lipoplexes were potent to transfect cells, as efficiently as BSV36-based lipoplexes. BSV36(2) and BSV36(3) demonstrated comparable or even significantly better transfection efficiencies in comparison to BSV36.



**Figure 2.** Transfection efficiency and viability assay of BSV36-based lipoplexes as determined using 16HBE (A), A549 (B) and CFBE (C) cell lines. Transfection efficiency are expressed by normalizing luciferase signal to protein content (in the unit of RLU/mg). Viability are expressed relative to untreated cells (in %; the dashed horizontal line specifies 100% cell viability). KLN47 was used as a positive control; (a) (b) and (c) correspond to p-values  $\leq 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively (comparison with BSV36-based lipoplexes). “-” and “DNA” stand for untreated cells and cells mixed with naked (uncomplexed) DNA, respectively.

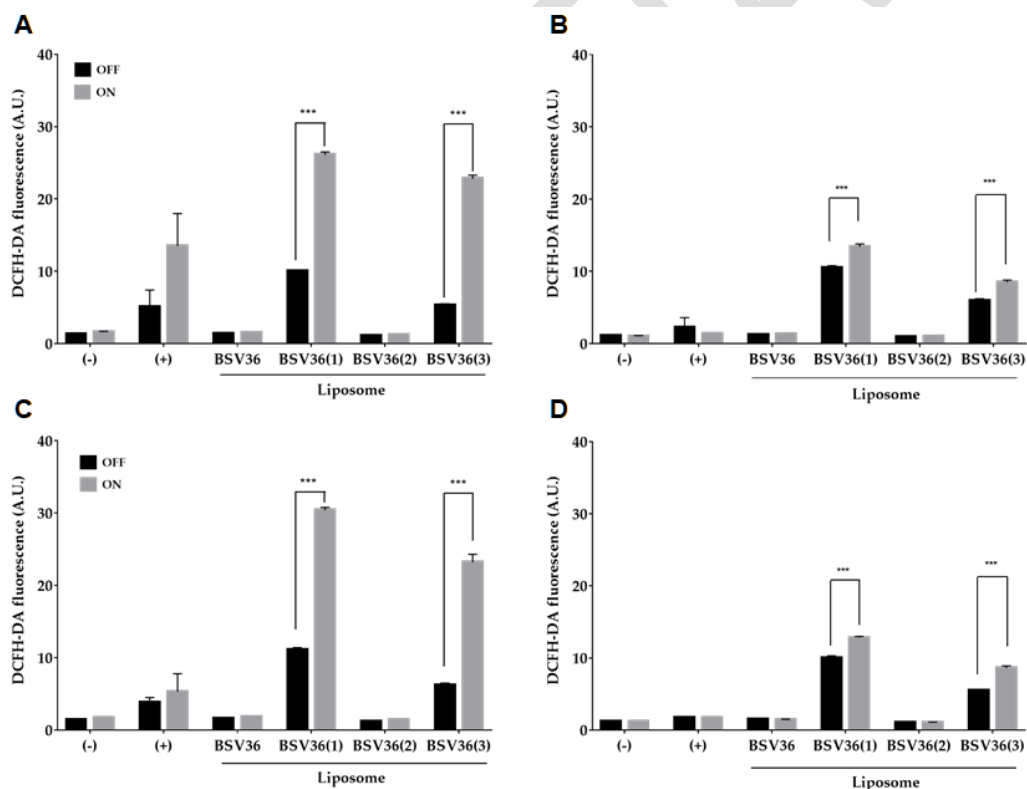
As for cell viability, it was noticeable that all the liposomes evaluated did not show any strong detrimental effect; even for the highest CR tested, viability indeed remained above 75% that of untreated cells. This highlighted the ability of this family of compounds to achieve safe and efficient gene delivery into the cell lines evaluated, in accordance with previous findings [7,8].

#### Photophysical assays

Photophysical assays were conducted for assessing the ability of the various BSV36-based liposomes to release NO or to induce the generation of singlet oxygen or intracellular ROS

As for singlet oxygen, the measurements performed using the SOSG dye showed that none of the liposomes evaluated could generate any detectable amounts of this reactive oxygen species (Figure S2).

DCFH-DA is a cell-permeable probe that can be converted in strongly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) in the presence of intracellular ROS. The latter were dosed after light treatment of either *S. aureus* (RN4220 and N315) or *P. aeruginosa* (PA19660 and PAH) incubated in the presence of the various liposomes. First, BSV36 and BSV36(2) were not capable to produce any detectable intracellular ROS in any of the experimental condition investigated. On the contrary, upon light treatment, BSV36(1) and BSV36(3) induced the obvious production intracellular ROS, which was about 2 times more important in *S. aureus* strains than in *P. aeruginosa* strains (Figure 3). These results demonstrated that the 1,8 naphthalimine moiety in the two abovementioned liposomes provided photosensitive properties that can lead to induce intracellular photodamages in bacteria. They also suggested that the DCFH-DA probe is insensitive to the NO released by BSV36(2) and BSV36(3) upon light irradiation.

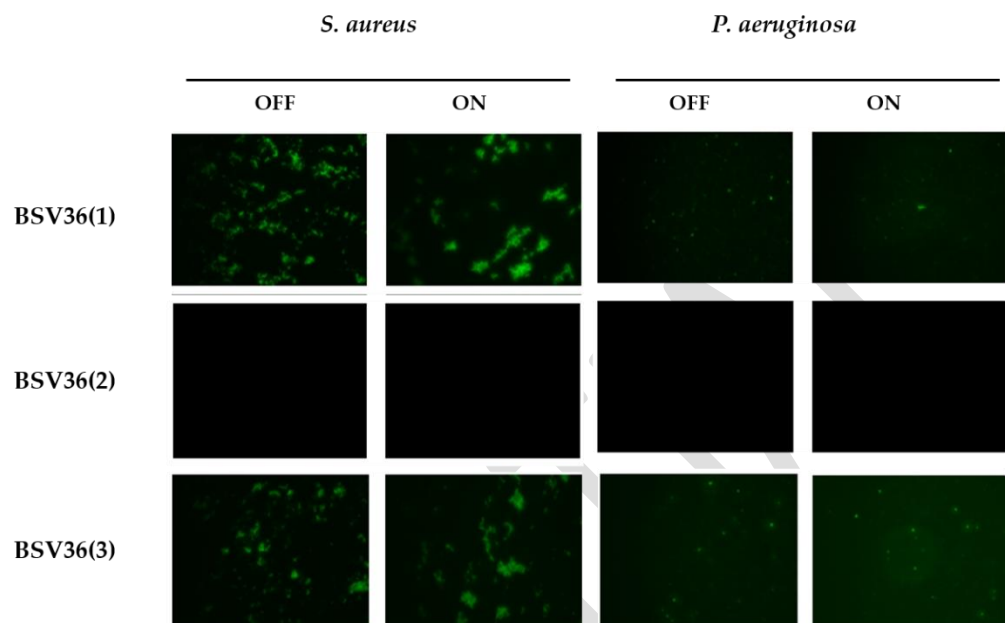


**Figure 3.** Intracellular ROS production generated by BSV36-based liposomes in bacteria after DCFH-DA assimilation. Experiments were realized for *S. aureus* (RN4220 (A) and N315 (C)) and *P. aeruginosa* (PA19660 (B) and PAH (D)) strains. Negative controls (-) are non-exposed bacteria to BSV36. Positive controls (+) are bacterial lysates obtained by mixing bacteria with 30 vol. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### Fluorescence assay

The fluorescence of BSV36-based liposomes was evaluated in the absence or presence of bacteria. As expected, BSV36(2) did not yield any detectable fluorescence in any condition. Considering BSV36(1) and BSV36(3), no fluorescence spot could be detected in the absence of bacteria whereas, in the presence of *S. aureus*, highly fluorescent aggregates could be detected (Figure 4). Some fluorescent spots could also be observed in the presence of *P. aeruginosa*, although they were more discrete and weaker. No difference could

be noticed whether a light treatment was applied or not. These results highlight that liposomes containing a thioamide-1,8 naphthalimide lipid (herein BSV36(1) and BSV36(3)) may be useful for the detection of specific bacterial species.

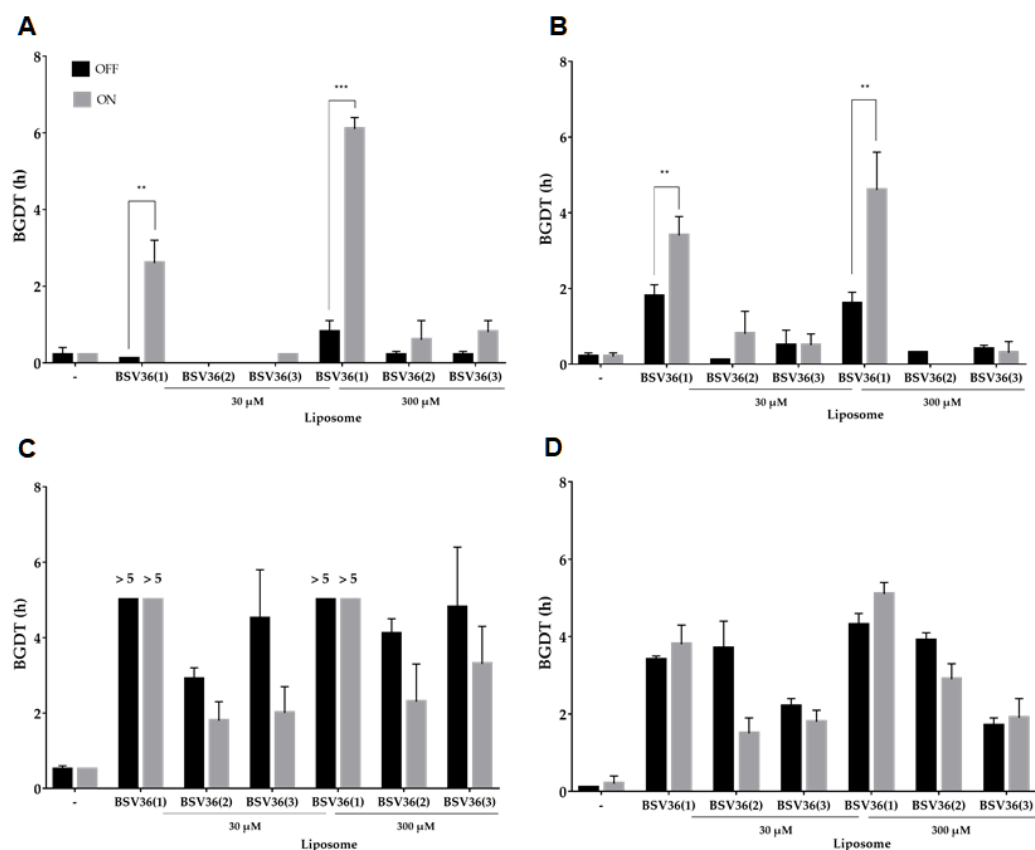


**Figure 4.** Detection of bacteria using BSV36-based liposomes by fluorescence microscopy imaging. Liposomes were tested at the dose of 300  $\mu$ M. Bacteria alone (without any liposome) are non-fluorescent (not shown), which is also the case when they are mixed with BSV36(2). Note that the microscope field of view are different for each image.

#### Antibacterial assay

Antibacterial phototoxic effects towards *S. aureus* (RN4220 and N315) and *P. aeruginosa* (PA19660 and PAH) were evaluated for two concentrations (i.e. 300  $\mu$ M and 30  $\mu$ M) of the various BSV36-based liposomes. Every condition was prepared in 6 replicates, including 3 samples non-exposed to light (OFF) and 3 samples subjected to light treatment (as described in Materials and Methods section). The bacterial growth decay time (BGDT), i.e. the bacterial growth delay between a given treated condition to that of a control (untreated) condition, was used to assess antimicrobial effects (see **Figure S3** and Materials and Methods for more details about calculations).

In all cases (**Figure 5**), BSV36 derivatives bearing a NO donor moiety (i.e. BSV36(2) and BSV36(3)) did not induce any noticeable antibacterial phototoxic effect, although these formulations were shown efficient for NO production (see Photophysical assays section). Furthermore, the toxicity of these liposomes appeared to decrease upon light treatment, although this effect could not be ascertained from a statistical point of view. On the contrary, BSV36(1) displayed, at low and high doses, a strong phototoxicity against *S. aureus*. Complementary experiments allowed to point out the contribution of the 1,8 naphthalimine moiety in the antibacterial effect observed (**Figure S4**). All BSV36-based liposomes exhibited a toxicity independent of light against both *P. aeruginosa* strains. Other tests using *E. coli* further shown that antibacterial effects were mostly directed against *S. aureus* strains (**Figure S5**), thus highlighting a specificity for these formulations and in accordance with the general higher sensitivity of Gram(+) bacteria as previously reported [1]. To be further detailed.

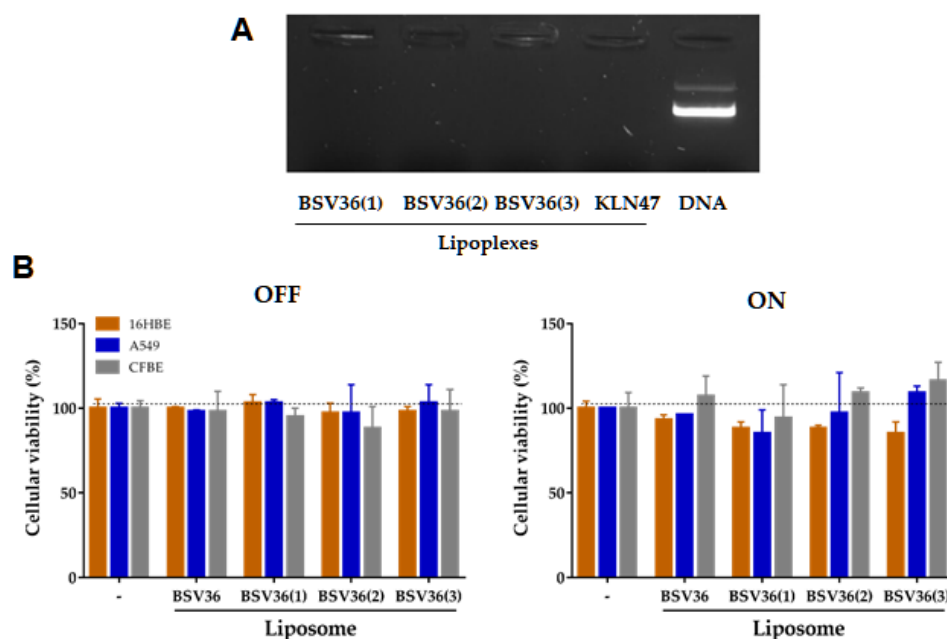


**Figure 5.** Antibacterial effect after treatment of bacteria with BSV36 liposomes upon (ON) light treatment, compared with corresponding liposomes kept in the dark (OFF). Results are reported for *S. aureus* RN4220 and N315 (A and B, respectively) and *P. aeruginosa* PA19660 and PAH (C and D, respectively). The sign “-” stands for untreated bacteria.

#### Potential for a combinatory approach

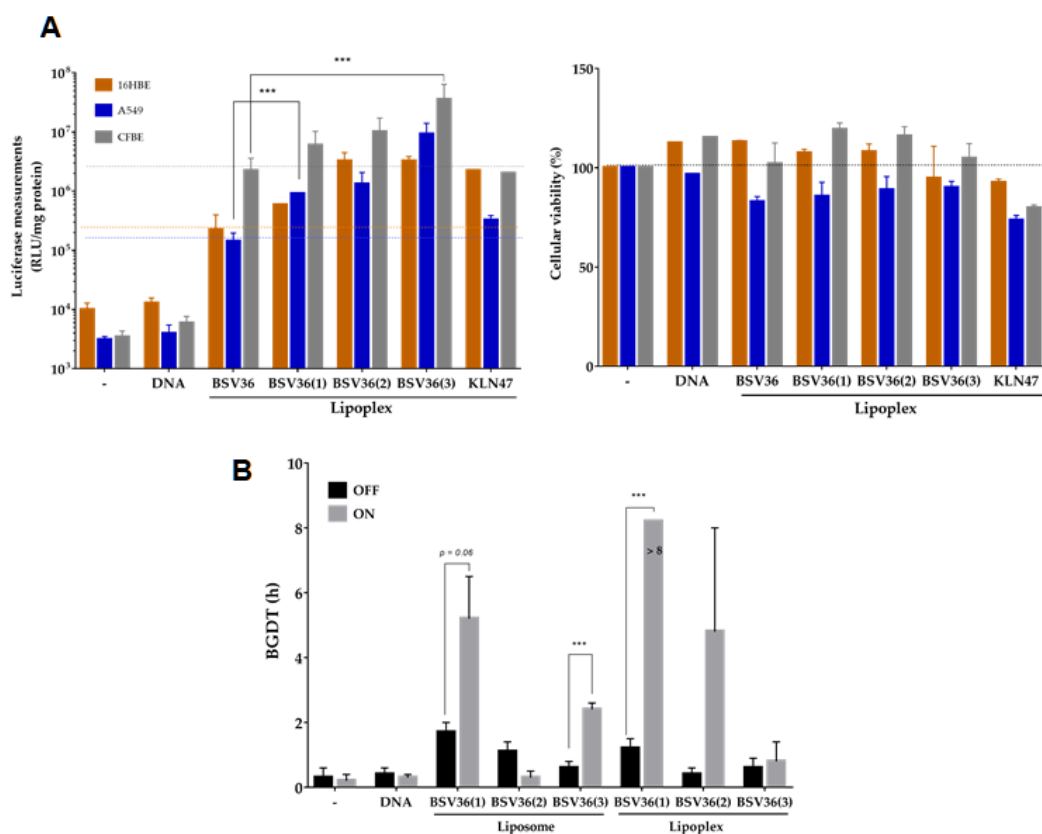
To lay the basis of a combinatory – gene transfer and antimicrobial – approach using BSV36-based liposomes, parameters related to light safety and therapeutic window (TW) were first determined.

Firstly, the possible impact of light on the stability of lipoplexes was evaluated. Briefly, lipoplexes prepared at CR8 were exposed to light treatment and subjected to electrophoresis, as previously described. The results suggested that light irradiation did neither induce any obvious DNA degradation nor complex dissociation (Figure 6A). Secondly, the viability of cells incubated with BSV36-based liposomes either kept in the dark or treated by light was evaluated. It is first noteworthy that light alone did not induce detectable toxicity for any cell line (Figure 6B). Furthermore, whatever the tested liposome, viability was measured above 80%, thus further attesting the excellent safety profile of the formulations assayed.



**Figure 6.** Safety of BSV36-based liposomes towards DNA (A) and cells (B). Lipoplexes were subjected to light irradiation before being assayed using agarose gel electrophoresis. Cells were exposed to the various liposomes (at the dose of 30  $\mu$ M) and were either kept in the dark (left panel) or exposed to light (right panel) before evaluation of their viability. The horizontal dashed line specifies 100% cell viability.

Then, we wonder whether BSV36-based liposomes could be effective to achieve both antibacterial activity and safe gene transfection in eukaryotic cells. It was indeed noted that the range of effective concentrations in our previous assays may allow using liposomes for these two purposes. To clearly assess the existence of a therapeutic window when using the liposomes for antibacterial and gene transfection assays, we performed complementary tests at the dose of 30  $\mu$ M. This dose, previously used in antibacterial assay (see previous section), was indeed also that tested in our abovementioned transfection assay, since cells transfected with lipoplexes prepared at CR8 were actually exposed to such liposome concentration. As shown in **Figure 7A**, the results obtained showed that, for all the cell lines considered, BSV36 yielded similar or even better transfection efficiencies compared to BSV36. Furthermore, viability values do not seem to be drastically decreased at this CR. The mixtures CR8 were also tested as standard antibacterial assay by using *S. aureus*. BSV36(1) conserve its phototoxic properties when its mixed at CR8 (**Figure 7B**). Surprisingly, the inverse effect was observed for BSV36(3). These results underlined the potential of BSV36(1) for combinatory strategies.



**Figure 7.** Transfection efficiency, cell viability (A) and bacterial photo-inactivation (B) of the various BSV36-based lipoplexes formed at CR8. The cells and bacteria evaluated were ... and *S. aureus* RN4220, respectively. The sign “-” stands for cells or bacteria alone. The horizontal dashed lines with different colors specify the signal intensity measured with non-functionalized (bare) BSV36-based liposomes or lipoplexes.

### 3. Discussion

In this study, the ammonium-containing lipophosphoramidate BSV36 was used a platform to prepare a series of derived liposome formulations. The reason for choosing that specific cationic lipid were at least twice, i.e. (i) its already demonstrated efficiency to deliver DNA into various cell lines [7] and (ii) its inefficiency to inactivate bacteria (up to 200  $\mu$ M, [1]). The latter was though relevant for the present study since we reasoned it would allow to better highlight the contribution of liposome functionalization(s) the antibacterial effect measured.

In the bioassays conducted, eukaryotic and bacterial strains were used for also some intended reasons. All eukaryotic cells (i.e. 16HBE, A549 and CFBE) originated from the lung epithelium, which may be the site of pulmonary infections in various medical conditions, especially in patients with cystic fibrosis (ref). Related to the latter, we investigated *S. aureus* and *P. aeruginosa*, which are both major pathogens responsible for severe complications in these patients. Thus, our results may show some relevance in the specific context of pneumonia, which is characterized with multiple issues where poly-functional scaffolds may be particularly suitable to provide adequate integrated solutions. Beyond this, the investigation of antibiotic alternatives such as antimicrobial photodynamic therapy is a requisite to counter the looming antimicrobial resistance pandemic responsible for recalcitrant bacterial infections caused by antibiotic resistant strains.

NO producing formulations were found very effective to release NO in detectable amounts under specific experimental settings. However, no antibacterial effect attributable to NO could be found. It has been shown that NO could exert either benefic or toxic effects, depending on the concentration and the localization where it is realized (erf). In

the specific context of cystic fibrosis, inhaled NO has been reported to play a key role in patients [10], accounting for their clinical status while providing a mean for beneficial therapeutic outcomes [11]...

Assays were done to determine the utility of some lipoplexes at one given dose to achieve, separately, gene transfer and antibacterial activities. The results actually showed the possibility to do so, thus demonstrating that a therapeutic window can be found for such nano-assemblies. Additional studies should be done, in particular in a simultaneous assay mixing bacteria and eukaryotic cells [1], under similar condition occurring in the lungs of patients especially with cystic fibrosis.

Considering the antibacterial inefficiency of BSV36 liposomes, it is suggested that it may be useful to use antibacterially effective, cationic lipids, especially arsonium-containing lipophosphoramides [1]. Indeed, designing formulations like those reported herein in which KLN47 for instance would be used instead of BSV36 may allow achieving stronger antibacterial effects, via multiple mechanisms of actions, thus also limiting the risk of resistance emergence. Future studies may allow supporting such assumption.

#### 4. Materials and Methods

##### *Photophysical properties*

Size and Zeta potential measurements were performed at 25 °C by using the Zetasizer Nano ZS (Malvern). Briefly, 50 µM of each formulation were prepared in Milli-Q water in a final volume of 1 mL from stock solutions containing 25 mM of BSV36. Then, 800 µL of these solutions were transferred in Malvern DTS1060 cuvettes for size (n=3) and zeta potential (n=3) measurements.

UV-visible and fluorescence emission spectra were determined for a final liposome concentration of 600 µM (200 µL/well) in Milli-Q water. All fluorescence and absorbance measurements were conducted by using the Mithras2 LB 943 (Berthold Technology).

##### *Bacteria and eukaryotic cell lines*

Two strains of *S. aureus*, i.e. RN4220 [12] and N315 [13], and two strains of *P. aeruginosa*, i.e. the *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC® 19660™, herein noted PA19660) and the cystic fibrosis originating PAH [1], were used for conducting antibacterial tests. Bacterial inocula were prepared with Luria Bertani (LB) broth and grown at 37 °C under 220 rpm. Cellular tests were performed using four human epithelial cell lines, namely the human bronchial epithelial cell line 16HBE 14o-, the human cystic fibrosis bronchial epithelial cell line CFBE 41o-, the adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell line A549 (ATCC CCL-185) and the human lung adenocarcinoma cell line Calu-3 (ATCC HTB-55). Culture media were EMEM (for 16HBE and CFBE) and DMEM (for A549 and Calu-3), each supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic and 1% L-glutamine. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Around 20,000 to 40,000 cells per wells (corresponding to cellular confluence of 80%) were seeded into a 96-well plate depending on cell lines growth rate. They were incubated at 37 °C the day before conducting a transfection assay.

##### *Light treatment*

Each formulation was added in the 96-well plate containing cells (prepared as described in the previous section) or bacteria (10<sup>5</sup> CFU/mL in Saline) to achieve a final concentration of 30 µM. Every condition was replicated/reproduced in 6 wells: 3 unexposed (OFF) and 3 exposed (ON) to light treatment. Irradiation protocol was performed by positioning the plate in the center of the illumination area (IA) obtained at the bottom (at 25 cm) of a UV lamp emitting light at 415 nm (ref). The power of the light emitted was ... mW. Every illumination consisted of two successive illumination steps for a period of 30 min interspaced with 30 min under ambient light.

##### *Photochemical reaction*

Singlet oxygen and intracellular ROS production were evaluated using SOSG and DCFH-DA probes, respectively, as previously described [5]. Briefly,  $10^8$  CFU/mL of each bacteria were mixed with  $10 \mu\text{M}$  of DCFH-DA probe during 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. Then, after a centrifugation step, pellets were suspended with solutions containing  $300 \mu\text{M}$  of BSV36-based liposomes before light treatment, as previously described. Fluorescence was measured following the manufacturer's recommendations.

#### *Evaluation of cellular and bacterial phototoxicity*

Following 24 h of light-treatment, phototoxicity was evaluated in cellular and bacterial assay. For cellular phototoxicity, the culture medium was removed from every well and passive lysis buffer (PLB) was mixed to the Vialight buffer (Lonza, Basel, Switzerland) (ref). For bacterial phototoxicity, the effect was estimated, as previously described [5,14], by firstly dropping each condition on a LB agar plate then by inoculating the same volume in a 96-wellplate containing  $195 \mu\text{L}$ /well of LB liquid medium. The agar plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  during 24h. The 96-wellplate was introduced into the Mithras2 LB943 microplate reader (Berthold) for at least 16 h at  $30^\circ\text{C}$ , stirring and OD readings (at 600 nm) being repeated every 10 min.

For assessing antibacterial effects, we considered the bacterial growth decay time (BGDT), which was defined as the growth delay of bacteria in a given treated condition compared to that of a control (untreated) condition. For this determination, the start growth time (SGT) was defined as the time from which a bacterial growth reaches an optical density threshold (i.e. reaching a turbidity considered sufficient to reflect an actual growth). Thus, the following formula was used to calculate the BGDT:

$$BGDT = SGT(Test) - SGT(Control)$$

Eq. (1) with *Cnt*, control (in then absence of any liposomes) condition and *Test*, test (in the presence of a given liposome) condition, both being determined with samples either exposed (ON) or non-exposed (OFF) to light treatment.

#### *Fluorescence microscopy*

Briefly, bacterial inoculum containing  $10^9$  CFU/mL were mixed with  $30 \mu\text{M}$  of a given liposomal solution. After light treatment,  $15 \mu\text{L}$  of this mixture were mounted between slide and coverslip before analyzing fluorescence via fluorescence microscopy (ref). The interactions between the formulations and bacteria were evaluated by measuring the fluorescence intensity using excitation and emission wavelengths at 450-480nm and 500-550nm, respectively.

#### *Transfection assays*

Liposomes were sonicated for 10 min at  $38^\circ\text{C}$  before mixing with  $0.25 \mu\text{g}$  of the luciferase-encoding pDNA pGM144 [9]. Each formulation was tested at different charge ratios (CRs) from 2 to 8 with DNA in water. The reference compounds BSV36 and KLN47 were tested in parallel. All mixtures were incubated at room temperature for 30 min, then DNA complexation was checked by electrophoresis in 0.8% agarose gel at 100 V, 90 mA for 20 min. Upon migration, the gel stained with ethidium bromide was visualized using a UV transilluminator (ref). Prior to complexation evaluation, in cell lines' plate, the complexes were added in wells. Following 24 h of incubation at  $37^\circ\text{C}$ , the medium was removed and the lysis were lysed as previously described. Luciferase and total proteins quantification were determined on lysates to evaluate transfection efficiencies by using the Luciferase Assay System (Promega) and the BC assay kit (Uptima), respectively. Cell viability was determined by using the Vialight Plus Cell Proliferation and cytotoxicity assay (Lonza), using Mithras2 LB 943 system (Berthold), following to the manufacturer's guideline. Data were expressed as relative light units (RLU) per milligram of total protein (mean  $\pm$  SD with  $n = 3$ ) for transfection efficiencies, whereas for viability assays, results were expressed as a percentage of untreated cells.

### Statistical analysis

For every assay, tests were done in technical triplicates ( $n = 3$ ) and the results correspond to the mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD). Data were statistically compared by using a Student t-test processed with Prism software version 6.00 (GraphPad, San Diego, 300 CA, USA). Statistically significant differences were denoted as follows: \*, p-value  $\leq 0.05$ , \*\*, p-value  $\leq 0.01$  and \*\*\*, p-value  $\leq 0.001$ .

### 3. Conclusions

This study allowed drawing several conclusions, as follows: (i) Compared with the non-functionalized BSV36 liposomes, BSV36(1)/(2)/(3) showed in most cases as good *in vitro* transfection activities and were well-tolerated by all the cell lines tested. This showed that the functionalization of BSV36 liposomes did not alter transfection ability. (ii) BSV36(1) could exert phototoxic effects towards bacteria while BSV36(2) and BSV36(3) were much less or not at all efficient from that point of view. This highlighted the predominant role of the head 1,8-Naphtalimide, showing that both fluorescence and ROS generation may be preserved after grafting on an amphiphile. Only weak effect were measured due to NO release, which may result from an insufficient release to exert an antibacterial effect and/or some interference due the presence of amphiphilic compounds. (iii) It is possible to use BSV36-based liposomes at phototoxic doses for bacteria that are tolerable for eukaryotic cells. Finally (iv), BSV36(1) could retain phototoxic effects on bacteria even when complexed with a pDNA. A therapeutic window can be found to achieve both antibacterial and transfection activities with same liposomal preparations. In conclusion, this study shows that click chemistry functionalized lipoplexes could exert multiple effects at once, in particular for delivering DNA in eukaryotic cells while killing pathogenic bacteria. This study thus serves as a further demonstration of the utility of click chemistry to implement multiple properties in a liposome platform useful for multimodal, including theranostic, applications.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

**Author Contributions:** For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript." Please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

**Funding:** This work was supported by a grant from ANR/BMBF (TARGET-THERAPY; PIs: Tony Le Gall and Holger Schönherr; ANR grant number: ANR-20-AMRB-0009, RVP21103NNA; BMBF Förderkennzeichen: 16GW0342). Financial supports were also obtained from the "Association de Transfusion Sanguine et de Biogénétique Gaétan Saleün" (France) and the "Région Bretagne" (France). Raphaëlle Youf and Alexis Hocquign are recipient of a PhD fellowship from the French "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" (Paris, France).

**Institutional Review Board Statement:** not applicable

**Informed Consent Statement:** not applicable

**Acknowledgments:** In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there are no conflict of interest, no competing interests and nothing to disclose.

## References

1. Le Gall, T.; Berchel, M.; Le Hir, S.; Fraix, A.; Salaün, J.Y.; Férec, C.; Lehn, P.; Jaffres, P.-A.; Montier, T. Arsonium-Containing Lipophosphoramides, Poly-Functional Nano-Carriers for Simultaneous Antibacterial Action and Eukaryotic Cell Transfection. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, doi:10.1002/adhm.201200478.
2. Khalil, M.; Hocquigny, A.; Berchel, M.; Montier, T.; Jaffrès, P.-A. Phosphonodithioester-Amine Coupling as a Key Reaction Step for the Design of Cationic Amphiphiles Used for Gene Delivery. *Molecules* **2021**, *26*, 7507, doi:10.3390/molecules26247507.
3. Khalil, M.; Fouque, D.J.D.; Berchel, M.; Fraix, A.; Dupont, A.; Sortino, S.; Memboeuf, A.; Jaffrès, P.-A. Phosphonodithioester-Amine Coupling in Water: A Fast Reaction to Modify the Surface of Liposomes. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 6392–6396, doi:10.1039/D1OB01078F.
4. Youf, R.; Müller, M.; Balasini, A.; Thétiot, F.; Müller, M.; Hascoët, A.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1995, doi:10.3390/pharmaceutics13121995.
5. Youf, R.; Nasir, A.; Müller, M.; Thétiot, F.; Haute, T.; Ghanem, R.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1664, doi:10.3390/pharmaceutics14081664.
6. Mahata, S.; Kumar, S.; Dey, S.; Mandal, B.B.; Manivannan, V. A Probe with Hydrazinecarbothioamide and 1,8-Naphthalimide Groups for “Turn-on” Fluorescence Detection of Hg<sup>2+</sup> and Ag<sup>+</sup> Ions and Live-Cell Imaging Studies. *Inorganica Chimica Acta* **2022**, *535*, 120876, doi:10.1016/j.ica.2022.120876.
7. Picquet, E.; Le Ny, K.; Delépine, P.; Montier, T.; Yaouanc, J.J.; Cartier, D.; des Abbayes, H.; Férec, C.; Clément, J.C. Cationic Lipophosphoramidates and Lipophosphoguanidines Are Very Efficient for in Vivo DNA Delivery. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1051–1053.
8. Le Gall, T.; Loizeau, D.; Picquet, E.; Carmoy, N.; Yaouanc, J.J.; Burel-Deschamps, L.; Delepine, P.; Giamarchi, P.; Jaffres, P.A.; Lehn, P.; et al. A Novel Cationic Lipophosphoramidate with Diunsaturated Lipid Chains: Synthesis, Physicochemical Properties, and Transfection Activities. *J Med Chem* **2010**, 1496–1508.
9. Hyde, S.C.; Pringle, I.A.; Abdullah, S.; Lawton, A.E.; Davies, L.A.; Varathalingam, A.; Nunez-Alonso, G.; Green, A.M.; Bazzani, R.P.; Sumner-Jones, S.G.; et al. CpG-Free Plasmids Confer Reduced Inflammation and Sustained Pulmonary Gene Expression. *Nature biotechnology* **2008**, *26*, 549–551.
10. Groot, K.M. de W.; Ent, C.K. van der Nitric Oxide in Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **2005**, *4*, 25–29, doi:10.1016/j.jcf.2005.05.008.
11. Bentur, L.; Gur, M.; Ashkenazi, M.; Livnat-Levanon, G.; Mizrahi, M.; Tal, A.; Ghaffari, A.; Geffen, Y.; Aviram, M.; Efrati, O. Pilot Study to Test Inhaled Nitric Oxide in Cystic Fibrosis Patients with Refractory Mycobacterium Abscessus Lung Infection. *Journal of Cystic Fibrosis* **2020**, *19*, 225–231, doi:10.1016/j.jcf.2019.05.002.
12. Nair, D.; Memmi, G.; Hernandez, D.; Bard, J.; Beaume, M.; Gill, S.; Francois, P.; Cheung, A.L. Whole-Genome Sequencing of Staphylococcus Aureus Strain RN4220, a Key Laboratory Strain Used in Virulence Research, Identifies Mutations That Affect Not Only Virulence Factors but Also the Fitness of the Strain. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 2332–2335, doi:10.1128/JB.00027-11.
13. Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Nagai, Y.; et al. Whole Genome Sequencing of Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Lancet* **2001**, *357*, 1225–1240.
14. Le Gall, T.; Lemerrier, G.; Chevreux, S.; Tücking, K.-S.; Ravel, J.; Thétiot, F.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Montier, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure-Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2229–2239, doi:10.1002/cmdc.201800392.

Research article

Supporting information

**Click Chemistry Functionalized Cationic Amphiphiles: Interest for Multimodal Applications Including Eukaryotic Cell Transfection and Antimicrobial Photodynamic Inactivation**

Table of content

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

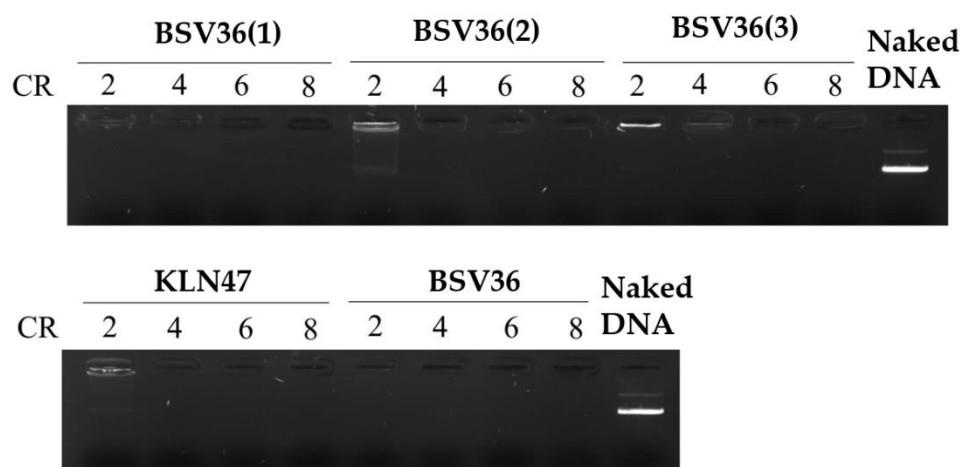
470

471

472

CONFIDENTIAL

473



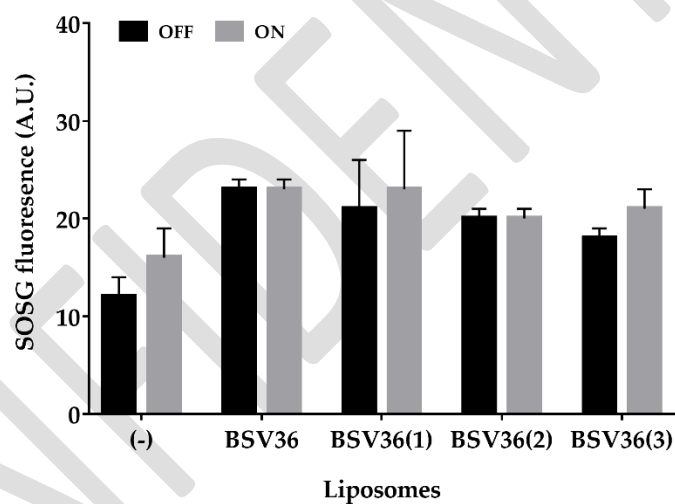
474

**Figure S1.** Gel electrophoresis of complexes prepared by mixing BSV36-based liposomes with pGM144 at CRs ranging from 2 to 8 in water.

475

476

477



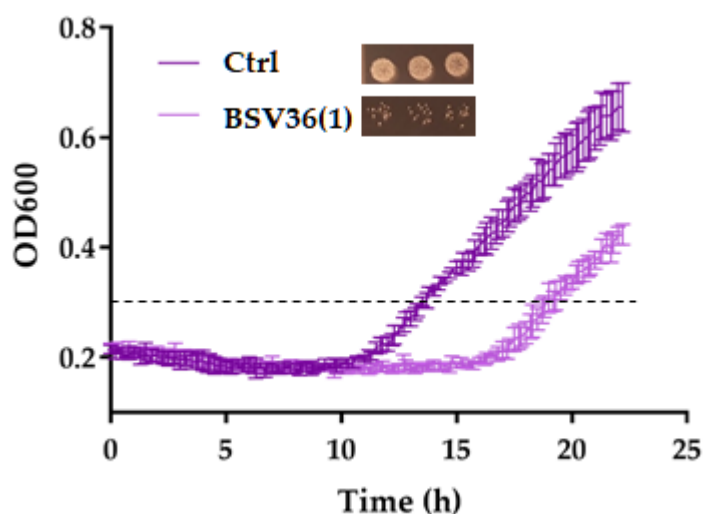
478

**Figure S2.** Quantification of singlet oxygen production upon light irradiation of the various liposomes.

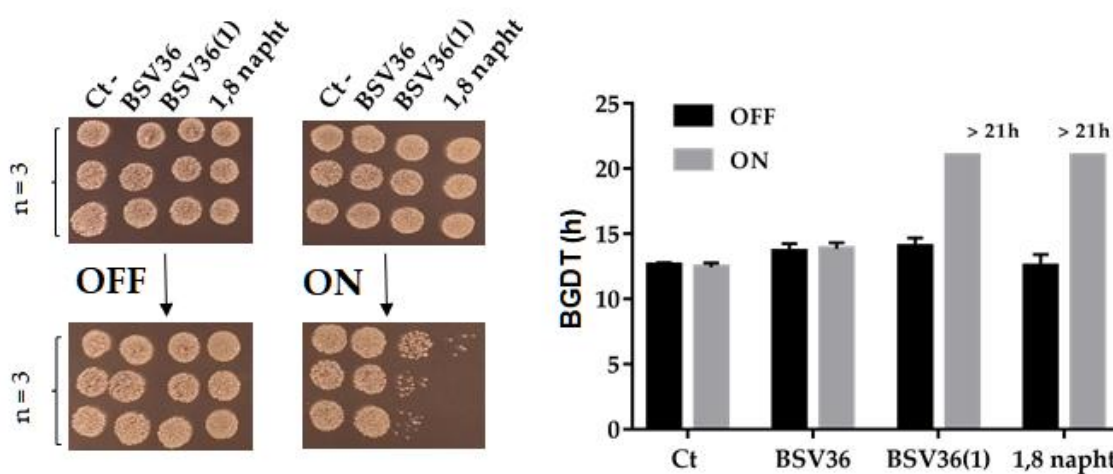
479

480

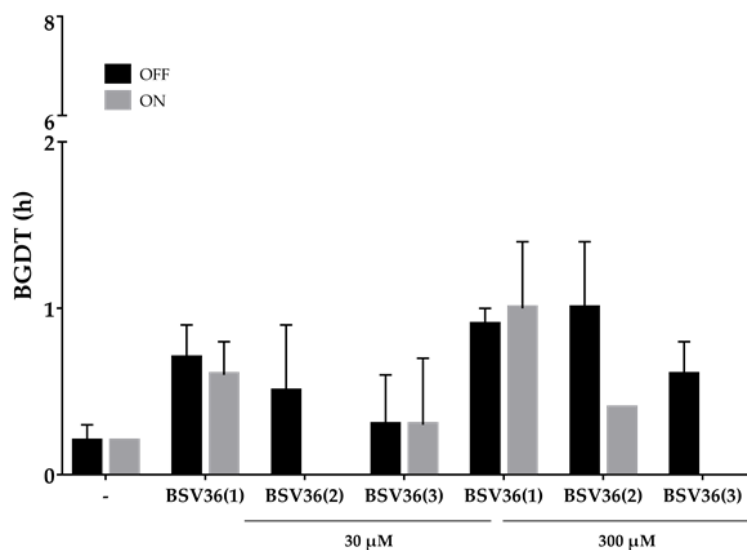
481



**Figure S3.** Example of growth curves achieved following incubation of *S. aureus* RN4220 in the absence of presence of a liposomal formulation and after a light treatment was applied. The start growth time (SGT) corresponds to the time from which OD600 reaches a defined threshold (here set at 0.3). The inset shows the reduction of bacterial density in the treated condition which is consistent with the delayed bacterial growth evidenced. “Ctrl” corresponds to bacteria that were not mixed with any liposome.



**Figure S4.** Demonstration of the role of 1,8 naphthalimine in the photodynamic antibacterial effect of BSV36(1). The bacterial strain evaluated was *S. aureus* RN4220. “Ct-” corresponds to bacteria that were not mixed with any liposome.



**Figure S5.** Antibacterial effect after treatment of *E. coli* with BSV36 liposomes upon (ON) light treatment, compared with corresponding liposomes kept in the dark (OFF).

492

493

494

495

CONFIDENTIAL

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Une discussion vient finaliser ce manuscrit afin de repositionner le sujet d'étude dans la thématique générale du laboratoire et de faire le lien entre le travail réalisé et la poursuite des travaux à ce sujet. Enfin, des perspectives d'applications de la PDT seule ou en combinaison dans le cadre des infections bronchopulmonaires seront évoquées.

## I. Remise en contexte du sujet

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été menés sous la direction de Dr Tony Le Gall au laboratoire UMR INSERM 1078, dans l'équipe GTCA « *Gene Transfert and Combined therapeutic Approaches* », dirigée par Pr. Tristan Montier. Dans cette équipe, les thérapies à visée curative, dont la thérapie génique, sont les principaux sujets d'étude. Dans le contexte de la Mucoviscidose, cette thérapie a pour objectif de restaurer une quantité de protéine CFTR fonctionnelle. Cependant, les infections respiratoires bronchopulmonaires pourraient compromettre son efficacité. Afin d'y remédier, apporter une dimension antimicrobienne à cette stratégie serait pertinent. De façon générale, l'application de la PDT a été envisagée sous deux approches combinatoires. La première consisterait à combiner séquentiellement une approche antimicrobienne à une application de thérapie génique ; la deuxième serait d'utiliser des nanoparticules permettant de répondre aux deux approches à la fois.

## II. Synthèse des travaux réalisés

Tout d'abord, l'objectif des études présentées dans ce manuscrit était de fournir des éléments de réponse à la problématique générale suivante : « La PDT est-elle une alternative thérapeutique envisageable pour lutter contre les infections bronchopulmonaires retrouvées chez les patients CF ? ». Son intérêt clinique dans plusieurs modèles infectieux a été décrit dans la revue précédemment mentionnée (Cf Section Introduction, partie I, 2.3.). Lors d'une première étude valorisée en 2018 par Le Gall T. et al, un criblage de PS de type Ruthénium(II) polypyridyl ([Ru(II)]) avait permis d'identifier des candidats intéressants permettant la photo-inactivation de souches CF (*S. aureus* et *P. aeruginosa*). Sur la base de ces travaux, des essais de

PDT avec des PS d'intérêt ont été réalisés dans des conditions expérimentales se rapprochant de celles retrouvées chez les patients CF afin d'évaluer la compatibilité de la PDT dans le contexte physiopathologique (Cf Section Résultats, partie I, 1.1.). Cette étude témoigne de l'importance de la structure chimique du [Ru(II)] sur l'efficacité PDT. En effet, le greffage de ligand de type T-Fluorenyl confère une meilleure efficacité face à l'ensemble des différentes conditions physicochimiques et microbiologiques testées, exceptée face à la présence de biofilm. Malgré une étape d'illumination plus longue et une concentration en PS augmentée lors des tests antibiofilm, l'efficacité PDT de [Ru(II)]<sub>2</sub> est fortement réduite en comparaison au [Ru(II)]<sub>1</sub>. Par ailleurs, l'étude réalisée sur le devenir des [Ru(II)] dans les matrices extracellulaires de type biofilm et ASM a mis en avant leur faible capacité à diffuser et à conserver leurs propriétés dans ces milieux (Cf Section Résultats, partie I, 1.2). Ces paramètres limitants mettent en lumière la nécessité d'utiliser des [Ru(II)] davantage optimisés en terme de synthèse chimique. Ce travail se poursuit dans le cadre d'un projet ANR (2021-2024, porté par Dr Tony Le Gall en France et Pr Holger Schönherr en Allemagne) visant à développer des systèmes polymériques optimisés à base de complexes de Ruthénium et susceptibles de contourner les limitations identifiées avec les complexes « nus » utilisés lors de cette thèse. L'encapsulation des [Ru(II)] dans des nanoparticules basées sur des substances polymériques comme l'acide polyactique (PLA) ou encore du polyéthylène glycol (PEG) a déjà été mentionnée comme étant une bonne stratégie pour augmenter les propriétés photoactives des [Ru(II)] [208–210].

### III. Complexification du modèle d'étude

Les études *in vitro* réalisées dans le cadre de la PDT antimicrobienne se font majoritairement en utilisant des modèles bactériens en monoculture planctonique [10,63]. Cependant, les infections chroniques affectant les zones du corps communiquant avec l'environnement extérieur, comme la peau ou les poumons, sont souvent polymicrobiennes et associées au développement de biofilm [211]. La mise en place de modèles adaptés à ces spécificités a déjà été évoqué dans certaines applications PDT [212,213], autres que les infections bronchopulmonaires. Ces dernières, chez les patients CF, sont particulièrement complexes à reproduire dans un modèle. Au cours de cette thèse, des cultures polymicrobiennes de *S. aureus* et *P. aeruginosa* ont été optimisées sur des temps de croissance courts car la compétition

entre ces deux espèces menait inévitablement à l'éradication de *S. aureus*. Imiter le microbiome pulmonaire à l'échelle *in vitro* indépendamment d'un hôte rend difficile cette cohabitation inter-espèce.

Une autre piste d'optimisation pour complexifier le modèle d'étude est de prendre en compte l'épithélium pulmonaire. La plupart du temps, l'innocuité des PS est vérifiée par des tests de viabilité sur cellules eucaryotes en condition immergée indépendamment des tests sur bactéries. Néanmoins, quelques études ont mis en avant l'intérêt de la PDT pour photo-inactiver des pathogènes intracellulaires, comme *S. aureus* au sein des macrophages [214]. Dans le contexte CF, le développement de coculture est particulièrement complexe en raison (i) du fort degré d'infectiosité des pathogènes CF vers les cellules eucaryotes, (ii) du manque de recul pour définir les conditions de culture cohérentes (densité cellulaire et bactériennes, milieu, phénotype) et (iii) du manque de méthodologie pour visualiser indépendamment la viabilité cellulaire de celle des bactéries. Dans la première étude réalisée au cours de cette thèse (Cf Section Résultats, partie I, 1.1.), des tests de tolérance à la PDT ont été réalisés sur des cellules cultivées en interface air-liquide. Cette stratégie a déjà fait l'objet d'une étude similaire par Biel M. avec un dispositif commercial (EpiAirway™) [215].

D'autres modèles plus pertinents comme les « lung-on-a-chip » pourraient être utilisés afin de mimer au plus proche l'épithélium pulmonaire au format d'une puce où celui-ci est vascularisé et est alimenté par un système microfluidique. Ce dispositif a pour avantage de contrôler les paramètres environnementaux mais aussi d'imiter une réponse immunitaire proche de celle déclenchée par les microorganismes [216,217]. Ce type de prototype permet de limiter le recours aux modèles animaux, notamment les modèles murins qui sont, les plus représentés dans le cadre de la PDT (Cf Section Introduction, partie I, 3.4.). D'autres petits modèles *in vivo*, intermédiaires au modèle murin, comme les insectes ou les larves de poissons, ont fait l'objet de plusieurs études [218,219]. Par exemple, les larves Zebrafish ont un intérêt majeur pour réaliser des études de dosimétrie (Cf Section Introduction, partie I, 3.5.). En effet, ce modèle est transparent et donc relativement adapté pour étudier les effets doses de la lumière [220,221]. Par ailleurs, *Galleria mellonella* est un modèle intéressant pour étudier, après infection puis traitement PDT, l'efficacité antimicrobienne et la réponse immunitaire innée associée [222]. Vérifier l'innocuité du traitement (à la fois du PS mais également de sa voie

d'administration) dans ce type de modèle permettrait de valider une première étape avant de procéder à des tests sur rongeurs.

Comme alternative à ces solutions, des pré-tests de délivrance de [Ru(II)]1 par aérosol ont été réalisés sur un modèle porcin à l'échelle *ex vivo*. Cette étude, très préliminaire, est une preuve de concept pour vérifier la capacité d'un [Ru(II)] de référence à (i) pouvoir être nébulisé et (ii) à être détecté à même un tissu. Les résultats ont démontré, après aérosol, que le [Ru(II)]1 a conservé ses propriétés photophysiques et antimicrobiennes, peu importe le type de nébuliseur utilisé. Par ailleurs, sa fluorescence est détectable dans le modèle *ex vivo* jusqu'au poumon. À la suite de ces essais, plusieurs techniques pourraient venir compléter cette approche afin de déterminer la taille médiane des molécules nébulisées et la fréquence inhalable. Des dispositifs comme des impacteurs, par exemple, sont adaptés pour évaluer ces paramètres [223,224]. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si le [Ru(II)]1 aérosolisé est toujours en capacité de produire de l'oxygène singulet.

La délivrance de PS, mais aussi de source lumineuse, sont deux défis majeurs pour exercer une PDT dans les zones pulmonaires. Le choix de la source lumineuse peut s'avérer être moins critique dans un modèle porcin que dans un modèle murin au vu de la différence de largeur de la trachée (environ 1,5 cm chez le porc et 1,5 mm chez la souris). Cependant, à l'avenir, un modèle murin sera développé. Dans ce sens, une collaboration avec l'entreprise Evosens (Lannion, Bretagne) nous a permis de conceptualiser un système photonique compatible pour les deux modèles. Des pré-tests ont été réalisés sur souris sacrifiées de façon à évaluer les dimensions et le degré de flexibilité de la fibre optique à fabriquer pour atteindre efficacement les poumons (**Figure 30**).

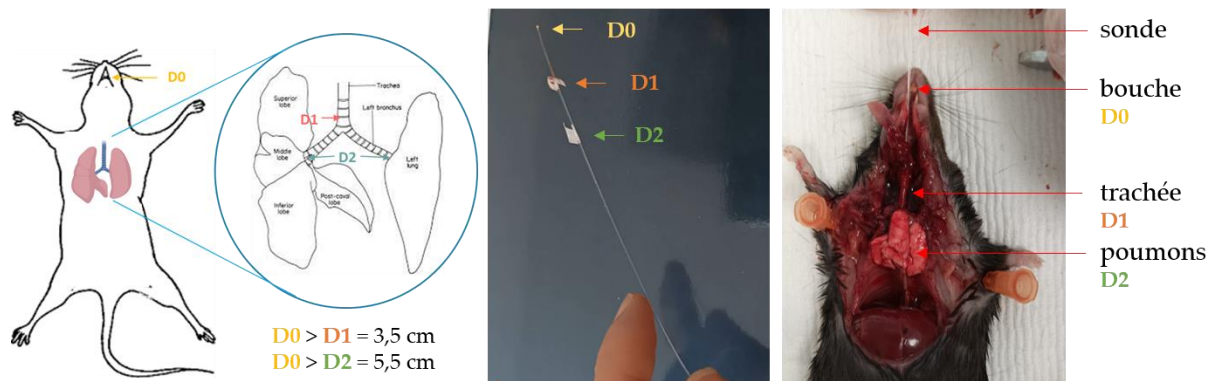


Figure 30. Mise au point d'une intubation trachéale avec une fibre optique (Evosens (R)) chez la souris.

Les dimensions requises de fibre en partant de la bouche (D0) pour atteindre (i) la carène (bifurcation) trachéale (D1) est de 3,5 cm et (ii) les bronches secondaires (D2), de 5,5 cm. De plus, afin de permettre une respiration aisée de l'animal pendant l'intubation, la largeur ne doit pas excéder 0,5 mm, et la gaine ne doit pas être trop flexible, ni trop rigide. Avant de réaliser un aérosol de [Ru(II)] suivi d'une illumination, des tests de dosimétrie (c'est-à-dire la dose lumineuse administrable) devront être réalisés dans le but (i) d'identifier les paramètres d'illumination qui couvre au maximum la surface des poumons et (ii) de limiter l'effet photo-toxique de l'illumination. Par ailleurs, détecter de l'oxygène singulet dans les poumons après aérosolisation puis illumination du [Ru(II)] confirmerait une délivrance efficace à la fois du PS et de la lumière [225].

#### IV. Autres intérêts de la PDT dans la Mucoviscidose

Afin d'évaluer la compatibilité d'une stratégie PDT en vue de traiter les infections bronchopulmonaires, (i) l'impact du microenvironnement pulmonaire a été étudié sous plusieurs aspects (Cf Section Résultats, partie I, 1.) puis (ii) les approches combinatoires ont été considérées (Cf Section Résultats, partie II). Dans le cadre de la Mucoviscidose, ces dernières doivent être considérées pour plusieurs raisons. En effet, malgré les essais cliniques prometteurs des différentes thérapies chez les patients CF, celles-ci sont rarement exclusives ; la plupart du temps, la thérapie testée s'additionne aux traitements déjà administrés chez le patient (antibiothérapie, mucolytiques...). Par ailleurs, plusieurs revues ont déjà évoqué la PDT non pas comme étant une potentielle thérapie alternative à l'antibiothérapie, mais comme une solution venant en complément de celle-ci [10,70]. Quelques études ont néanmoins

démontré une incompatibilité entre la PDT et des agents utilisés dans les traitements liés aux pneumonies, comme les surfactants pulmonaires [226]

Au cours de cette thèse, la fonctionnalisation de nanoparticules (BSV36), pour répondre à la fois à une approche de transfert de gènes et une approche antimicrobienne, a été considérée (Cf Section Résultats, partie 2.1.). Le BSV36 a déjà démontré, dans plusieurs études publiées par l'équipe GTCA, son potentiel en tant qu'agent de transfection. Sa fonctionnalisation a été réalisée avec des molécules photosensibles ayant pour objectif de produire des espèces réactives multiples (ERM) après illumination [227]. Ces dernières sont obtenues à l'issue d'excitation lumineuse soit de la naphthalimide (production de ROS) soit de la nitroaniline (production d'Oxide Nitrique (ON)). Les ROS intracellulaires produits par la naphthalimide ont été détectés via la sonde DCFH-DA, ce qui ne permet pas d'affirmer qu'il s'agisse à proprement parler d'un mécanisme PDT, puisque la production de ROS, indépendamment d'une cellule, ne peut être vérifiée avec la sonde utilisée. De plus, cette molécule ne produit pas d'oxygène singulet comme l'ont démontré les résultats de quantification de fluorescence avec la sonde SOSG. Par ailleurs elle peut induire une phototoxicité par des mécanismes d'action qui sont encore mal définis [228]. La production d'oxide nitrique (ON), quant à elle, a été vérifiée par analyse ampérométrique (résultats non présentés) ; cependant, ces espèces ne produisent aucune phototoxicité sur les souches testées. En dehors de l'effet antimicrobien, les thérapies lumineuses productrices d'ERM (des ROS comme de l'ON) peuvent s'avérer très pertinentes dans le cadre de divers traitements pour la Mucoviscidose. En effet, plusieurs études ont mis en avant l'intérêt de la PDT pour booster le transfert de gènes et l'assimilation d'antibiotiques via un processus d'« internalisation photochimique » [221,229]. Par ailleurs, plusieurs essais cliniques sont en cours d'évaluation dans le cadre de la nébulisation d'ON en vue de lutter contre les infections bronchopulmonaires. Ces espèces, faisant parties des défenses naturelles pulmonaires, sont produites en faible quantité chez ces patients, en raison du dysfonctionnement de la protéine CFTR. Plusieurs études ont suggéré que les modulateurs de CFTR comme l'ivacaftor, ayant pour intérêt de restaurer les fonctions de CFTR, pouvaient augmenter la fraction exhalée en ON après plusieurs semaines de traitement [230,231]. Restaurer l'activité de CFTR tout en apportant des molécules photosensibles productrices d'ON pourrait permettre d'obtenir des concentrations intrapulmonaires de ce gaz similaires à ceux présents chez un patient sain.

D'autres combinaisons thérapeutiques basées sur la PDT pourraient être testées dans le cadre de la Mucoviscidose. Précédemment, l'étude réalisée sur l'impact du microenvironnement pulmonaire sur la PDT (Cf Section Résultats, partie I, 1.1.) a souligné la problématique du mucus. L'idée d'utiliser des molécules à action mucolytique avant un traitement PDT serait un moyen de contourner ce problème. Dans ce sens, il y aurait un double intérêt à prétraiter les poumons avec la N-acétyl cystéine (NAC) (Cf Section Introduction, partie II, 2.4.) ; car, après avoir diminué la quantité de mucus dans les voies respiratoires avant traitement PDT, son action pourrait limiter le stress oxydatif donnant lieu à des effets de photosensibilisation liés à la production de ROS [174]. Ces derniers sont particulièrement présents chez les patients CF à cause, notamment, de l'inflammation [232]. Or, la PDT peut induire une réponse inflammatoire locale par production de cytokines pro-inflammatoires [233,234]; ce qui pourrait être délétère pour des patients CF car l'environnement pulmonaire est déjà inflammé, notamment à cause d'une bronchiectasie avancée. Cependant, de nombreuses applications ont démontré qu'elle possède des propriétés immunomodulatrices (Cf Section Introduction, partie I, 2.2). Il a été mentionné, notamment, dans des applications de « cicatrisation des plaies », que la PDT peut stimuler la prolifération, la migration et la différenciation des cellules résidentes de la peau et favoriser ainsi la réépithélialisation, l'angiogenèse et le remodelage tissulaire [222]. Chez les patients CF, le dysfonctionnement de CFTR affecte la réparation épithéliale des voies respiratoires. Chiu et al ont suggéré récemment que, à la suite d'un essai d'une ICG-PDT, la production de ROS et d'oxygène singulet pourrait favoriser la migration cellulaire et la cicatrisation des plaies cutanées par l'activation du CFTR [235]. Par ailleurs, la curcumine, un PS utilisé que récemment pour la PDT antimicrobienne [10], a démontré dans plusieurs études sa capacité à potentialiser l'activité du CFTR [236]. Ainsi, le choix du PS peut être déterminant pour que la PDT puisse couvrir d'autres champs d'applications qu'une approche antimicrobienne.

Cette discussion encourage davantage le développement des approches PDT dans le cadre de la Mucoviscidose comme stratégie antimicrobienne complémentaire qu'en tant que réelle alternative à l'antibiothérapie. De plus, ses propriétés multimodales pourraient renforcer l'efficacité d'autres traitements émergents ou agir sur d'autres dimensions de la maladie que les infections bronchopulmonaires.

# CONCLUSION

---

L'antibiothérapie a considérablement augmenté la qualité et l'espérance de vie des patients atteints de Mucoviscidose. En revanche, l'efficacité sur le long terme des antibiotiques est remise en question en raison de la multiplication des résistances à ces traitements. Par comparaison, leurs éventuelles alternatives thérapeutiques ne sont pas aussi bien maîtrisées et n'ont pas suffisamment de recul sur le plan clinique. La PDT a néanmoins démontré à plusieurs reprises des résultats prometteurs en vue de traiter des infections difficiles à éradiquer. Ce travail de thèse aura permis d'identifier les avantages et inconvénients de cette stratégie mais aussi d'apporter des pistes d'optimisations pour la rendre plus pertinente. En plus de leur propriété antimicrobienne, certains PS, mériteraient, comme évoqué dans la discussion, d'être considérés pour leurs activités complémentaires dans le cadre de la Mucoviscidose (stratégies combinatoires).



# BIBLIOGRAPHIE

---

1. Grzybowski, A.; Sak, J.; Pawlikowski, J. A Brief Report on the History of Phototherapy. *Clin Dermatol* **2016**, *34*, 532–537, doi:10.1016/j.clindermatol.2016.05.002.
2. Gunaydin, G.; Gedik, M.E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. *Front Chem* **2021**, *9*, 686303, doi:10.3389/fchem.2021.686303.
3. Darrigol, O. *A History of Optics from Greek Antiquity to the Nineteenth Century*; OUP Oxford, 2012; ISBN 978-0-19-964437-7.
4. McDonagh, A.F. Phototherapy: From Ancient Egypt to the New Millennium. *J Perinatol* **2001**, *21 Suppl 1*, S7–S12, doi:10.1038/sj.jp.7210625.
5. Finsen, N.R. The Red Light Treatment of Small-Pox. *Br Med J* **1895**, *2*, 1412–1414, doi:10.1136/bmj.2.1823.1412-a.
6. Møller, K.I.; Kongshoj, B.; Philipsen, P.A.; Thomsen, V.O.; Wulf, H.C. How Finsen's Light Cured Lupus Vulgaris. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **2005**, *21*, 118–124, doi:10.1111/j.1600-0781.2005.00159.x.
7. Bhagwat, M.S.; Buzurovic, I.M.; Damato, A.L.; Friesen, S.A.; Hansen, J.L.; O'Farrell, D.A.; Sugar, E.N.; Cormack, R.A. *Technical Aspects of Brachytherapy*; Springer Publishing Company, 2021; ISBN 978-1-62070-082-2.
8. Stokowski, L.A. Fundamentals of Phototherapy for Neonatal Jaundice. *Advances in Neonatal Care* **2011**, *11*, S10–S21, doi:10.1097/ANC.0b013e31822ee62c.
9. VON TAPPEINER, H. Ueber Wirking Der Photodynamischen (Fluoreszierenden) Stoffe Auf Protozoan Und Enzyme. *Dtsch Arch Klin Med* **1904**, *80*, 427–487.
10. Youf, R.; Müller, M.; Balasini, A.; Thétiot, F.; Müller, M.; Hascoët, A.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemercier, G.; Montier, T.; et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1995, doi:10.3390/pharmaceutics13121995.
11. Foote, C.S. DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTOSENSITIZED OXIDATION. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, *54*, 659–659, doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x.
12. Ogilby, P.R. Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181, doi:10.1039/b926014p.
13. Hamblin, M.R.; Abrahamse, H. Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism? *Antibiotics* **2020**, *9*, 53, doi:10.3390/antibiotics9020053.
14. Alves, E.; Faustino, M.A.; Neves, M.G.; Cunha, A.; Tome, J.; Almeida, A. An Insight on Bacterial Cellular Targets of Photodynamic Inactivation. *Future Medicinal Chemistry* **6**, 141–164.
15. Wiehe, A.; O'Brien, J.M.; Senge, M.O. Trends and Targets in Antiviral Phototherapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 2565–2612, doi:10.1039/C9PP00211A.
16. Sharma, S.K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y.-Y.; St. Denis, T.G.; Hamblin, M.R. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? *Isr J Chem* **2012**, *52*, 691–705, doi:10.1002/ijch.201100062.

17. Allison, R.R. Photodynamic Therapy: Oncologic Horizons. *Future Oncology* **2014**, *10*, 123–124, doi:10.2217/fon.13.176.
18. Li, X.; Lovell, J.F.; Yoon, J.; Chen, X. Clinical Development and Potential of Photothermal and Photodynamic Therapies for Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2020**, *17*, 657–674, doi:10.1038/s41571-020-0410-2.
19. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *106*, 1098–1107, doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049.
20. Wang, S.; Wang, X.; Yu, L.; Sun, M. Progress and Trends of Photodynamic Therapy: From Traditional Photosensitizers to AIE-Based Photosensitizers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2021**, *34*, 102254, doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102254.
21. Zhang, J.; Ramu, V.; Zhou, X.-Q.; Frias, C.; Ruiz-Molina, D.; Bonnet, S.; Roscini, C.; Novio, F. Photoactivable Ruthenium-Based Coordination Polymer Nanoparticles for Light-Induced Chemotherapy. *Nanomaterials (Basel)* **2021**, *11*, 3089, doi:10.3390/nano11113089.
22. Maldonado-Carmona, N.; Marchand, G.; Villandier, N.; Ouk, T.-S.; Pereira, M.M.; Calvete, M.J.F.; Calliste, C.A.; Žak, A.; Piksa, M.; Pawlik, K.J.; et al. Porphyrin-Loaded Lignin Nanoparticles Against Bacteria: A Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy Application. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 606185, doi:10.3389/fmicb.2020.606185.
23. Maldonado-Carmona, N.; Ouk, T.-S.; Calvete, M.J.F.; Pereira, M.M.; Villandier, N.; Leroy-Lhez, S. Conjugating Biomaterials with Photosensitizers: Advances and Perspectives for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *Photochem Photobiol Sci* **2020**, *19*, 445–461, doi:10.1039/c9pp00398c.
24. Mfouo-Tynga, I.S.; Dias, L.D.; Inada, N.M.; Kurachi, C. Features of Third Generation Photosensitizers Used in Anticancer Photodynamic Therapy: Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2021**, *34*, 102091, doi:10.1016/j.pdpdt.2020.102091.
25. Josefsen, L.B.; Boyle, R.W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitizers. *Metal-Based Drugs* **2008**, *2008*, 1–23, doi:10.1155/2008/276109.
26. Q Mesquita, M.; J Dias, C.; P M S Neves, M.G.; Almeida, A.; F Faustino, M.A. Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23102424.
27. Chiarelli, A.M.; Maclin, E.L.; Low, K.A.; Fantini, S.; Fabiani, M.; Gratton, G. Low-Resolution Mapping of the Effective Attenuation Coefficient of the Human Head: A Multidistance Approach Applied to High-Density Optical Recordings. *Neurophotonic* **2017**, *4*, 021103, doi:10.1117/1.NPh.4.2.021103.
28. Algorri, J.F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J.M. Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 3484, doi:10.3390/cancers13143484.
29. Cios, A.; Ciepielak, M.; Szymański, Ł.; Lewicka, A.; Cierniak, S.; Stankiewicz, W.; Mendrycka, M.; Lewicki, S. Effect of Different Wavelengths of Laser Irradiation on the Skin Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 2437, doi:10.3390/ijms22052437.
30. Brancalion, L.; Moseley, H. Laser and Non-Laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med Sci* **2002**, *17*, 173–186, doi:10.1007/s101030200027.
31. Kim, M.M.; Darafsheh, A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* **2020**, *96*, 280–294, doi:10.1111/php.13219.

32. Konig, K. Multiphoton Microscopy in Life Sciences. *J Microsc* **2000**, *200*, 83–104, doi:10.1046/j.1365-2818.2000.00738.x.
33. Dolmans, D.E.J.G.J.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 380–387, doi:10.1038/nrc1071.
34. Kessel, D.; Luo, Y.; Deng, Y.; Chang, C.K. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* **1997**, *65*, 422–426, doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb08581.x.
35. Yang, D.; Lei, S.; Pan, K.; Chen, T.; Lin, J.; Ni, G.; Liu, J.; Zeng, X.; Chen, Q.; Dan, H. Application of Photodynamic Therapy in Immune-Related Diseases. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2021**, *34*, 102318, doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102318.
36. Kessel, D.; Reiners, J.J. Photodynamic Therapy: Autophagy and Mitophagy, Apoptosis and Paraptosis. *Autophagy* **2020**, *16*, 2098–2101, doi:10.1080/15548627.2020.1783823.
37. Biel, M.A. Photodynamic Therapy Treatment of Early Oral and Laryngeal Cancers. *Photochem Photobiol* **2007**, *83*, 1063–1068, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00153.x.
38. Hopper, C.; Kübler, A.; Lewis, H.; Tan, I.B.; Putnam, G. MTHPC-Mediated Photodynamic Therapy for Early Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Cancer* **2004**, *111*, 138–146, doi:10.1002/ijc.20209.
39. Nyst, H.J.; Tan, I.B.; Stewart, F.A.; Balm, A.J.M. Is Photodynamic Therapy a Good Alternative to Surgery and Radiotherapy in the Treatment of Head and Neck Cancer? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2009**, *6*, 3–11, doi:10.1016/j.pdpdt.2009.03.002.
40. Litle, V.R.; Luketich, J.D.; Christie, N.A.; Buenaventura, P.O.; Alvelo-Rivera, M.; McCaughan, J.S.; Nguyen, N.T.; Fernando, H.C. Photodynamic Therapy as Palliation for Esophageal Cancer: Experience in 215 Patients. *Ann Thorac Surg* **2003**, *76*, 1687–1692; discussion 1692-1693, doi:10.1016/s0003-4975(03)01299-2.
41. Sibille, A.; Lambert, R.; Souquet, J.-C.; Sabben, G.; Descos, F. Long-Term Survival after Photodynamic Therapy for Esophageal Cancer. *Gastroenterology* **1995**, *108*, 337–344, doi:10.1016/0016-5085(95)90058-6.
42. Overholt, B.F.; Lightdale, C.J.; Wang, K.K.; Canto, M.I.; Burdick, S.; Haggitt, R.C.; Bronner, M.P.; Taylor, S.L.; Grace, M.G.A.; Depot, M.; et al. Photodynamic Therapy with Porfimer Sodium for Ablation of High-Grade Dysplasia in Barrett's Esophagus: International, Partially Blinded, Randomized Phase III Trial. *Gastrointest Endosc* **2005**, *62*, 488–498, doi:10.1016/j.gie.2005.06.047.
43. Wolfsen, H.C.; Hemminger, L.L.; Wallace, M.B.; Devault, K.R. Clinical Experience of Patients Undergoing Photodynamic Therapy for Barrett's Dysplasia or Cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **2004**, *20*, 1125–1131.
44. Wu, H.; Minamide, T.; Yano, T. Role of Photodynamic Therapy in the Treatment of Esophageal Cancer. *Dig Endosc* **2019**, *31*, 508–516, doi:10.1111/den.13353.
45. Lam, S.; Kostashuk, E.C.; Coy, E.P.; Laukkanen, E.; LeRiche, J.C.; Mueller, H.A.; Szasz, I.J. A Randomized Comparative Study of the Safety and Efficacy of Photodynamic Therapy Using Photofrin II Combined with Palliative Radiotherapy versus Palliative Radiotherapy Alone in Patients with Inoperable Obstructive Non-Small Cell Bronchogenic Carcinoma. *Photochem Photobiol* **1987**, *46*, 893–897, doi:10.1111/j.1751-1097.1987.tb04865.x.
46. Kato, H.; Furukawa, K.; Sato, M.; Okunaka, T.; Kusunoki, Y.; Kawahara, M.; Fukuoka, M.; Miyazawa, T.; Yana, T.; Matsui, K.; et al. Phase II Clinical Study of Photodynamic Therapy Using Mono-L-Aspartyl Chlorin E6 and Diode Laser for Early Superficial

- Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Lung Cancer* **2003**, *42*, 103–111, doi:10.1016/s0169-5002(03)00242-3.
47. Nowis, D.; Stokłosa, T.; Legat, M.; Issat, T.; Jakóbsiak, M.; Gołąb, J. The Influence of Photodynamic Therapy on the Immune Response. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2005**, *2*, 283–298, doi:10.1016/S1572-1000(05)00098-0.
  48. Hamblin, M.R. Potentiation of Antimicrobial Photodynamic Inactivation by Inorganic Salts. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2017**, *15*, 1059–1069, doi:10.1080/14787210.2017.1397512.
  49. Bjordal, J.M.; Lopes-Martins, R. a. B.; Iversen, V.V. A Randomised, Placebo Controlled Trial of Low Level Laser Therapy for Activated Achilles Tendinitis with Microdialysis Measurement of Peritendinous Prostaglandin E2 Concentrations. *Br J Sports Med* **2006**, *40*, 76–80; discussion 76-80, doi:10.1136/bjsm.2005.020842.
  50. Höfling, D.B.; Chavantes, M.C.; Juliano, A.G.; Cerri, G.G.; Knobel, M.; Yoshimura, E.M.; Chammas, M.C. Assessment of the Effects of Low-Level Laser Therapy on the Thyroid Vascularization of Patients with Autoimmune Hypothyroidism by Color Doppler Ultrasound. *ISRN Endocrinol* **2012**, *2012*, 126720, doi:10.5402/2012/126720.
  51. Höfling, D.B.; Chavantes, M.C.; Acencio, M.M.P.; Cerri, G.G.; Marui, S.; Yoshimura, E.M.; Chammas, M.C. Effects of Low-Level Laser Therapy on the Serum TGF-B1 Concentrations in Individuals with Autoimmune Thyroiditis. *Photomed Laser Surg* **2014**, *32*, 444–449, doi:10.1089/pho.2014.3716.
  52. Ablon, G. Combination 830-Nm and 633-Nm Light-Emitting Diode Phototherapy Shows Promise in the Treatment of Recalcitrant Psoriasis: Preliminary Findings. *Photomed Laser Surg* **2010**, *28*, 141–146, doi:10.1089/pho.2009.2484.
  53. Dompe, C.; Moncrieff, L.; Matys, J.; Grzech-Leśniak, K.; Kocherova, I.; Bryja, A.; Bruska, M.; Dominiak, M.; Mozdziak, P.; Skiba, T.H.I.; et al. Photobiomodulation – Underlying Mechanism and Clinical Applications. *J Clin Med* **2020**, *9*, 1724, doi:10.3390/jcm9061724.
  54. Kennedy, J.C.; Pottier, R.H.; Pross, D.C. Photodynamic Therapy with Endogenous Protoporphyrin IX: Basic Principles and Present Clinical Experience. *J Photochem Photobiol B* **1990**, *6*, 143–148, doi:10.1016/1011-1344(90)85083-9.
  55. Jeffes, E.W.; McCullough, J.L.; Weinstein, G.D.; Fergin, P.E.; Nelson, J.S.; Shull, T.F.; Simpson, K.R.; Bukaty, L.M.; Hoffman, W.L.; Fong, N.L. Photodynamic Therapy of Actinic Keratosis With Topical 5-Aminolevulinic Acid: A Pilot Dose-Ranging Study. *Archives of Dermatology* **1997**, *133*, 727–732, doi:10.1001/archderm.1997.03890420065007.
  56. Morton, C. a.; Szeimies, R.-M.; Sidoroff, A.; Braathen, L. r. European Guidelines for Topical Photodynamic Therapy Part 1: Treatment Delivery and Current Indications – Actinic Keratoses, Bowen’s Disease, Basal Cell Carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2013**, *27*, 536–544, doi:10.1111/jdv.12031.
  57. Rakesh, N.; Clint, J.B.; Reddy, S.S.; Nagi, R.; Chauhan, P.; Sharma, S.; Sharma, P.; Kaur, A.; Shetty, B.; Ashwini, S.; et al. Clinical Evaluation of Photodynamic Therapy for the Treatment of Refractory Oral Lichen Planus – A Case Series. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2018**, *24*, 280–285, doi:10.1016/j.pdpdt.2018.09.011.
  58. Jin, X.; Xu, H.; Deng, J.; Dan, H.; Ji, P.; Chen, Q.; Zeng, X. Photodynamic Therapy for Oral Potentially Malignant Disorders. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2019**, *28*, 146–152, doi:10.1016/j.pdpdt.2019.08.005.
  59. Alsahli, M.; Debu, A.; Girard, C.; Bessis, D.; Du Thanh, A.; Guillot, B.; Dereure, O. Is Photodynamic Therapy a Relevant Therapeutic Option in Refractory Benign Familial

- Pemphigus (Hailey–Hailey Disease)? A Series of Eight Patients. *Journal of Dermatological Treatment* **2017**, *28*, 678–682, doi:10.1080/09546634.2017.1308461.
60. Yan, X.X.; Tian, H.Q.; Wang, C.L.; Yang, B.Q.; Wu, W.Z.; Zhang, F.R. Successful Treatment of Hailey-Hailey Disease with Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy. *Annals of Dermatology* **2015**, *27*, 222–223, doi:10.5021/ad.2015.27.2.222.
  61. Lang, K.; Lehmann, P.; Bolsen, K.; Ruzicka, T.; Fritsch, C. Aminolevulinic Acid: Pharmacological Profile and Clinical Indication. *Expert Opin Investig Drugs* **2001**, *10*, 1139–1156, doi:10.1517/13543784.10.6.1139.
  62. Yin, R.; Hamblin, M. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *CMC* **2015**, *22*, 2159–2185, doi:10.2174/0929867322666150319120134.
  63. Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R. Photoantimicrobials—Are We Afraid of the Light? *Lancet Infect Dis* **2017**, *17*, e49–e55, doi:10.1016/S1473-3099(16)30268-7.
  64. Sabino, C.P.; Wainwright, M.; Ribeiro, M.S.; Sellera, F.P.; dos Anjos, C.; Baptista, M. da S.; Lincopan, N. Global Priority Multidrug-Resistant Pathogens Do Not Resist Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, *208*, 111893, doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.111893.
  65. Wainwright, M. The Development of Phenothiazinium Photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2*, 263–272, doi:10.1016/S1572-1000(05)00110-9.
  66. Müller, O.; Lu, G.; Jahn, A.; Mockenhaupt, F.-P. How Worthwhile Is Methylene Blue as a Treatment of Malaria? *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2019**, *17*, 471–473, doi:10.1080/14787210.2019.1634545.
  67. Cieplik, F.; Deng, D.; Crielaard, W.; Buchalla, W.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A.; Maisch, T. Antimicrobial Photodynamic Therapy – What We Know and What We Don't. *Critical Reviews in Microbiology* **2018**, *44*, 571–589, doi:10.1080/1040841X.2018.1467876.
  68. Chilakamarthi, U.; Giribabu, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 775–802, doi:10.1002/tcr.201600121.
  69. 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, doi:10.3390/ijms20133339.
  70. Pérez-Laguna, V.; Gilaberte, Y.; Millán-Lou, M.I.; Agut, M.; Nonell, S.; Rezusta, A.; Hamblin, M.R. A Combination of Photodynamic Therapy and Antimicrobial Compounds to Treat Skin and Mucosal Infections: A Systematic Review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 1020–1029, doi:10.1039/C8PP00534F.
  71. Shafirstein, G.; Bellnier, D.; Oakley, E.; Hamilton, S.; Potasek, M.; Beeson, K.; Parilov, E. Interstitial Photodynamic Therapy—A Focused Review. *Cancers (Basel)* **2017**, *9*, 12, doi:10.3390/cancers9020012.
  72. Wilson, B.C.; Patterson, M.S. The Physics, Biophysics and Technology of Photodynamic Therapy. *Phys Med Biol* **2008**, *53*, R61-109, doi:10.1088/0031-9155/53/9/R01.
  73. Kassab, G.; Cheburkanov, V.; Willis, J.; Moule, M.G.; Kurachi, C.; Yakovlev, V.; Cirillo, J.D.; Bagnato, V.S. Safety and Delivery Efficiency of a Photodynamic Treatment of the Lungs Using Indocyanine Green and Extracorporeal near Infrared Illumination. *J Biophotonics* **2020**, *13*, e202000176, doi:10.1002/jbio.202000176.
  74. Silva, Z.S.; Bussadori, S.K.; Fernandes, K.P.S.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M.R. Animal Models for Photodynamic Therapy (PDT). *Biosci Rep* **2015**, *35*, e00265, doi:10.1042/BSR20150188.

75. Shi, X.; Zhang, C.Y.; Gao, J.; Wang, Z. Recent Advances in Photodynamic Therapy for Cancer and Infectious Diseases. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2019**, *11*, e1560, doi:10.1002/wnan.1560.
76. Wozniak, A.; Grinholc, M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials—State of the Art. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 930, doi:10.3389/fmicb.2018.00930.
77. Guyon, L.; Ascencio, M.; Collinet, P.; Mordon, S. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy of Peritoneal Metastasis of Ovarian Cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2012**, *9*, 16–31, doi:10.1016/j.pdpdt.2011.08.003.
78. Dong, W.; Li, K.; Wang, S.; Qiu, L.; Liu, Q.; Xie, M.; Lin, J. Targeted Photodynamic Therapy (PDT) of Lung Cancer with Biotinylated Silicon (IV) Phthalocyanine. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **22**, 414–422.
79. Kim, J.; Jo, Y.; Na, K. Photodynamic Therapy with Smart Nanomedicine. *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 22–31, doi:10.1007/s12272-020-01214-5.
80. Ochsner, M. Photophysical and Photobiological Processes in the Photodynamic Therapy of Tumours. *J Photochem Photobiol B* **1997**, *39*, 1–18, doi:10.1016/s1011-1344(96)07428-3.
81. Benov, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Med Princ Pract* **2014**, *24*, 14–28, doi:10.1159/000362416.
82. Lago, A.D.N.; Fortes, A.B.C.; Furtado, G.S.; Menezes, C.F.S.; Gonçalves, L.M. Association of Antimicrobial Photodynamic Therapy and Photobiomodulation for Herpes Simplex Labialis Resolution: Case Series. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2020**, *32*, 102070, doi:10.1016/j.pdpdt.2020.102070.
83. Geralde, M.C.; Leite, I.S.; Inada, N.M.; Salina, A.C.G.; Medeiros, A.I.; Kuebler, W.M.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Pneumonia Treatment by Photodynamic Therapy with Extracorporeal Illumination - an Experimental Model. *Physiological Reports* **2017**, *5*, e13190, doi:10.14814/phy2.13190.
84. Corthesy, B. Multi-Faceted Functions of Secretory IgA at Mucosal Surfaces. *Frontiers in Immunology* **2013**, *4*.
85. Cookson, W.O.C.M.; Cox, M.J.; Moffatt, M.F. New Opportunities for Managing Acute and Chronic Lung Infections. *Nat Rev Microbiol* **2018**, *16*, 111–120, doi:10.1038/nrmicro.2017.122.
86. Demoré, B.; Charmillon, A. Traitement Des Infections Respiratoires Basses et Hautes. *Pharmacie Clinique et Thérapeutique* **2018**, 801-814.e1, doi:10.1016/B978-2-294-75077-9.00044-X.
87. Farrell, P.M.; Rock, M.J.; Baker, M.W. The Impact of the CFTR Gene Discovery on Cystic Fibrosis Diagnosis, Counseling, and Preventive Therapy. *Genes* **2020**, *11*, 401, doi:10.3390/genes11040401.
88. O'Sullivan, B.P.; Freedman, S.D. Cystic Fibrosis. *Lancet* **2009**, *373*, 1891–1904, doi:10.1016/S0140-6736(09)60327-5.
89. Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology* **2016**, *7*.
90. Solano, C.; Echeverz, M.; Lasa, I. Biofilm Dispersion and Quorum Sensing. *Curr Opin Microbiol* **2014**, *18*, 96–104, doi:10.1016/j.mib.2014.02.008.
91. Ryan, C.; Ross, S.; Davey, P.; Duncan, E.M.; Francis, J.J.; Fielding, S.; Johnston, M.; Ker, J.; Lee, A.J.; MacLeod, M.J.; et al. Prevalence and Causes of Prescribing Errors: The PRescribing Outcomes for Trainee Doctors Engaged in Clinical Training (PROTECT) Study. *PLoS One* **2014**, *9*, e79802, doi:10.1371/journal.pone.0079802.

92. Goss, C.H.; Muhlebach, M.S. Review: Staphylococcus Aureus and MRSA in Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **2011**, *10*, 298–306, doi:10.1016/j.jcf.2011.06.002.
93. Blanchard, A.C.; Waters, V.J. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med* **2019**, *40*, 727–736, doi:10.1055/s-0039-1698464.
94. Dasenbrook, E.C.; Merlo, C.A.; Diener-West, M.; Lechtzin, N.; Boyle, M.P. Persistent Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Rate of FEV1 Decline in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**, *178*, 814–821, doi:10.1164/rccm.200802-327OC.
95. Ren, C.L.; Morgan, W.J.; Konstan, M.W.; Schechter, M.S.; Wagener, J.S.; Fisher, K.A.; Regelman, W.E.; Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis Presence of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus in Respiratory Cultures from Cystic Fibrosis Patients Is Associated with Lower Lung Function. *Pediatr Pulmonol* **2007**, *42*, 513–518, doi:10.1002/ppul.20604.
96. Briaud, P.; Bastien, S.; Camus, L.; Boyadjian, M.; Reix, P.; Mainguy, C.; Vandenesch, F.; Doléans-Jordheim, A.; Moreau, K. Impact of Coexistence Phenotype Between Staphylococcus Aureus and Pseudomonas Aeruginosa Isolates on Clinical Outcomes Among Cystic Fibrosis Patients. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 266, doi:10.3389/fcimb.2020.00266.
97. Reffuveille, F.; Josse, J.; Vallé, Q.; Mongaret, C.; Gangloff, S.C. Staphylococcus Aureus Biofilms and Their Impact on the Medical Field. In *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*; Enany, S., Crotty Alexander, L.E., Eds.; InTech, 2017 ISBN 978-953-51-2983-7.
98. Gessard, C. On the Blue and Green Coloration That Appears on Bandages. *Reviews of Infectious Diseases* **1984**, *6*, S775–S776, doi:10.1093/clinids/6.Supplement\_3.S775.
99. Chew, S.C.; Kundukad, B.; Seviour, T.; van der Maarel, J.R.C.; Yang, L.; Rice, S.A.; Doyle, P.; Kjelleberg, S. Dynamic Remodeling of Microbial Biofilms by Functionally Distinct Exopolysaccharides. *mBio* **2014**, *5*, e01536-01514, doi:10.1128/mBio.01536-14.
100. Jurado-Martín, I.; Sainz-Mejías, M.; McClean, S. Pseudomonas Aeruginosa: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 3128, doi:10.3390/ijms22063128.
101. Isles, A.; Maclusky, I.; Corey, M.; Gold, R.; Prober, C.; Fleming, P.; Levison, H. Pseudomonas Cepacia Infection in Cystic Fibrosis: An Emerging Problem. *The Journal of Pediatrics* **1984**, *104*, 206–210, doi:10.1016/S0022-3476(84)80993-2.
102. Lipuma, J.J.; Currie, B.J.; Peacock, S.J.; Vandamme, P.A.R. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, and Acidovorax. In *Manual of Clinical Microbiology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2015; pp. 791–812 ISBN 978-1-68367-280-7.
103. Waters, V.J.; Gómez, M.I.; Soong, G.; Amin, S.; Ernst, R.K.; Prince, A. Immunostimulatory Properties of the Emerging Pathogen Stenotrophomonas Maltophilia. *Infect Immun* **2007**, *75*, 1698–1703, doi:10.1128/IAI.01469-06.
104. Spilker, T.; Vandamme, P.; Lipuma, J.J. Identification and Distribution of Achromobacter Species in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* **2013**, *12*, 298–301, doi:10.1016/j.jcf.2012.10.002.
105. Veschetti, L.; Sandri, A.; Johansen, H.K.; Lleò, M.M.; Malerba, G. Hypermutation as an Evolutionary Mechanism for Achromobacter Xylooxidans in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Pathogens* **2020**, *9*, E72, doi:10.3390/pathogens9020072.

106. Esposito, S.; Pisi, G.; Fainardi, V.; Principi, N. What Is the Role of *Achromobacter* Species in Patients with Cystic Fibrosis? *Front Biosci (Landmark Ed)* **2021**, *26*, 1613–1620, doi:10.52586/5054.
107. Menetrey, Q.; Dupont, C.; Chiron, R.; Marchandin, H. Bactéries Émergentes Dans La Mucoviscidose et Les Dilatations Des Bronches Hors Mucoviscidose. Le Point de Vue Du Microbiologiste. *Revue des Maladies Respiratoires* **2020**, *37*, 561–571, doi:10.1016/j.rmr.2020.06.006.
108. Sherrard, L.J.; McGrath, S.J.; McIlreavey, L.; Hatch, J.; Wolfgang, M.C.; Muhlebach, M.S.; Gilpin, D.F.; Elborn, J.S.; Tunney, M.M. Production of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and the Potential Indirect Pathogenic Role of *Prevotella* Isolates from the Cystic Fibrosis Respiratory Microbiota. *Int J Antimicrob Agents* **2016**, *47*, 140–145, doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.12.004.
109. Françoise, A.; Héry-Arnaud, G. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes (Basel)* **2020**, *11*, 536, doi:10.3390/genes11050536.
110. Alastruey-Izquierdo, A.; Cadranel, J.; Flick, H.; Godet, C.; Hennequin, C.; Hoenigl, M.; Kosmidis, C.; Lange, C.; Munteanu, O.; Page, I.; et al. Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Current Standards and Future Perspectives. *RES* **2018**, *96*, 159–170, doi:10.1159/000489474.
111. Haiko, J.; Saeedi, B.; Bagger, G.; Karpati, F.; Özenci, V. Coexistence of *Candida* Species and Bacteria in Patients with Cystic Fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2019**, *38*, 1071–1077, doi:10.1007/s10096-019-03493-3.
112. Rosenstein, B.J.; Cutting, G.R. The Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Consensus Statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* **1998**, *132*, 589–595, doi:10.1016/s0022-3476(98)70344-0.
113. Castellani, C.; Assael, B.M. Cystic Fibrosis: A Clinical View. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 129–140, doi:10.1007/s00018-016-2393-9.
114. Edmondson, C.; Davies, J.C. Current and Future Treatment Options for Cystic Fibrosis Lung Disease: Latest Evidence and Clinical Implications. *Ther Adv Chronic Dis* **2016**, *7*, 170–183, doi:10.1177/2040622316641352.
115. Sermet-Gaudelus, I.; Ferroni, A.; Gaillard, J.L.; Silly, C.; Chretiennot, C.; Lenoir, G.; Berche, P. L'antibiothérapie dans la mucoviscidose: II. Stratégie antibiotique. *Archives de Pédiatrie* **2000**, *7*, 645–656, doi:10.1016/S0929-693X(00)80134-7.
116. Yang, C.; Chilvers, M.; Montgomery, M.; Nolan, S.J. Dornase Alfa for Cystic Fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* **2016**, *4*, CD001127, doi:10.1002/14651858.CD001127.pub3.
117. Ordoñez, C.L.; Henig, N.R.; Mayer-Hamblett, N.; Accurso, F.J.; Burns, J.L.; Chmiel, J.F.; Daines, C.L.; Gibson, R.L.; McNamara, S.; Retsch-Bogart, G.Z.; et al. Inflammatory and Microbiologic Markers in Induced Sputum after Intravenous Antibiotics in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**, *168*, 1471–1475, doi:10.1164/rccm.200306-731OC.
118. Ratjen, F.; Saiman, L.; Mayer-Hamblett, N.; Lands, L.C.; Kloster, M.; Thompson, V.; Emmett, P.; Marshall, B.; Accurso, F.; Sagel, S.; et al. Effect of Azithromycin on Systemic Markers of Inflammation in Patients with Cystic Fibrosis Uninfected with *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chest* **2012**, *142*, 1259–1266, doi:10.1378/chest.12-0628.
119. Paul, K.; Rietschel, E.; Ballmann, M.; Griese, M.; Worlitzsch, D.; Shute, J.; Chen, C.; Schink, T.; Doring, G.; Van Koningsbruggen, S.; et al. Effect of Treatment with Dornase Alpha on Airway Inflammation in Patients with Cystic Fibrosis. *American Journal of*

- Respiratory and Critical Care Medicine* **2004**, 169, 719–725, doi:10.1164/rccm.200307-959OC.
120. Mogayzel, P.J.; Naureckas, E.T.; Robinson, K.A.; Mueller, G.; Hadjiliadis, D.; Hoag, J.B.; Lubsch, L.; Hazle, L.; Sabadosa, K.; Marshall, B.; et al. Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines: Chronic Medications for Maintenance of Lung Health. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**, 187, 680–689, doi:10.1164/rccm.201207-1160OE.
  121. Bardin, E.; Pastor, A.; Semeraro, M.; Golec, A.; Hayes, K.; Chevalier, B.; Berhal, F.; Prestat, G.; Hinzpeter, A.; Gravier-Pelletier, C.; et al. Modulators of CFTR. Updates on Clinical Development and Future Directions. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 213, 113195, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113195.
  122. Van Goor, F.; Hadida, S.; Grootenhuis, P.D.J.; Burton, B.; Cao, D.; Neuberger, T.; Turnbull, A.; Singh, A.; Joubran, J.; Hazlewood, A.; et al. Rescue of CF Airway Epithelial Cell Function in Vitro by a CFTR Potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, 18825–18830, doi:10.1073/pnas.0904709106.
  123. Ramsey, B.W.; Davies, J.; McElvaney, N.G.; Tullis, E.; Bell, S.C.; Dřevínek, P.; Griese, M.; McKone, E.F.; Wainwright, C.E.; Konstan, M.W.; et al. A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *N Engl J Med* **2011**, 365, 1663–1672, doi:10.1056/NEJMoa1105185.
  124. Van Goor, F.; Hadida, S.; Grootenhuis, P.D.J.; Burton, B.; Stack, J.H.; Straley, K.S.; Decker, C.J.; Miller, M.; McCartney, J.; Olson, E.R.; et al. Correction of the F508del-CFTR Protein Processing Defect in Vitro by the Investigational Drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, 108, 18843–18848, doi:10.1073/pnas.1105787108.
  125. Wainwright, C.E.; Elborn, J.S.; Ramsey, B.W.; Marigowda, G.; Huang, X.; Cipolli, M.; Colombo, C.; Davies, J.C.; De Boeck, K.; Flume, P.A.; et al. Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine* **2015**, 373, 220–231, doi:10.1056/NEJMoa1409547.
  126. Keating, D.; Marigowda, G.; Burr, L.; Daines, C.; Mall, M.A.; McKone, E.F.; Ramsey, B.W.; Rowe, S.M.; Sass, L.A.; Tullis, E.; et al. VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med* **2018**, 379, 1612–1620, doi:10.1056/NEJMoa1807120.
  127. Rowe, S.M.; Heltshe, S.L.; Gonska, T.; Donaldson, S.H.; Borowitz, D.; Gelfond, D.; Sagel, S.D.; Khan, U.; Mayer-Hamblett, N.; Van Dalfsen, J.M.; et al. Clinical Mechanism of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiator Ivacaftor in G551D-Mediated Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2014**, 190, 175–184, doi:10.1164/rccm.201404-0703OC.
  128. Singh, S.B.; McLearn-Montz, A.J.; Milavetz, F.; Gates, L.K.; Fox, C.; Murry, L.T.; Sabus, A.; Porterfield, H.S.; Fischer, A.J. Pathogen Acquisition in Patients with Cystic Fibrosis Receiving Ivacaftor or Lumacaftor/Ivacaftor. *Pediatr Pulmonol* **2019**, 54, 1200–1208, doi:10.1002/ppul.24341.
  129. Saiman, L. Improving Outcomes of Infections in Cystic Fibrosis in the Era of CFTR Modulator Therapy. *Pediatr Pulmonol* **2019**, 54, doi:10.1002/ppul.24522.
  130. Schneider, E.K.; Azad, M.A.K.; Han, M.-L.; Zhou, Q. (Tony); Wang, J.; Huang, J.X.; Cooper, M.A.; Doi, Y.; Baker, M.A.; Bergen, P.J.; et al. An ‘Unlikely’ Pair: The Antimicrobial Synergy of Polymyxin B in Combination with the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Drugs KALYDECO and ORKAMBI. *ACS Infect Dis* **2016**, 2, 478–488, doi:10.1021/acsinfecdis.6b00035.

131. Montier, T.; Delépine, P.; Pichon, C.; Férec, C.; Porteous, D.J.; Midoux, P. Non-Viral Vectors in Cystic Fibrosis Gene Therapy: Progress and Challenges. *Trends Biotechnol* **2004**, *22*, 586–592, doi:10.1016/j.tibtech.2004.09.009.
132. Miah, K.M.; Hyde, S.C.; Gill, D.R. Emerging Gene Therapies for Cystic Fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine* **2019**, *13*, 709–725, doi:10.1080/17476348.2019.1634547.
133. Alton, E.W.F.W.; Boyd, A.C.; Davies, J.C.; Gill, D.R.; Griesenbach, U.; Harrison, P.T.; Henig, N.; Higgins, T.; Hyde, S.C.; Innes, J.A.; et al. Genetic Medicines for CF: Hype versus Reality. *Pediatric Pulmonology* **2016**, *51*, S5–S17, doi:10.1002/ppul.23543.
134. Mottais, A. Thérapie génique non-virale de la mucoviscidose: évaluation des voies d'administration et adaptation des formulations. 257.
135. Flotte, T.; Carter, B.; Conrad, C.; Guggino, W.; Reynolds, T.; Rosenstein, B.; Taylor, G.; Walden, S.; Wetzel, R. A Phase I Study of an Adeno-Associated Virus-CFTR Gene Vector in Adult CF Patients with Mild Lung Disease. *Hum Gene Ther* **1996**, *7*, 1145–1159, doi:10.1089/hum.1996.7.9-1145.
136. Smirnikhina, S.A.; Kondrateva, E.V.; Adilgereeva, E.P.; Anuchina, A.A.; Zaynitdinova, M.I.; Slesarenko, Y.S.; Ershova, A.S.; Ustinov, K.D.; Yasinovsky, M.I.; Amelina, E.L.; et al. P.F508del Editing in Cells from Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One* **2020**, *15*, e0242094, doi:10.1371/journal.pone.0242094.
137. Schwank, G.; Koo, B.-K.; Sasselli, V.; Dekkers, J.F.; Heo, I.; Demircan, T.; Sasaki, N.; Boymans, S.; Cuppen, E.; van der Ent, C.K.; et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 653–658, doi:10.1016/j.stem.2013.11.002.
138. Bandara, R.A.; Chen, Z.R.; Hu, J. Potential of Helper-Dependent Adenoviral Vectors in CRISPR-Cas9-Mediated Lung Gene Therapy. *Cell Biosci* **2021**, *11*, 145, doi:10.1186/s13578-021-00662-w.
139. Le Gall, T.; Berchel, M.; Le Hir, S.; Fraix, A.; Salaün, J.Y.; Férec, C.; Lehn, P.; Jaffrès, P.-A.; Montier, T. Arsonium-Containing Lipophosphoramides, Poly-Functional Nano-Carriers for Simultaneous Antibacterial Action and Eukaryotic Cell Transfection. *Adv Healthc Mater* **2013**, *2*, 1513–1524, doi:10.1002/adhm.201200478.
140. Mottais, A.; Berchel, M.; Sibiril, Y.; Laurent, V.; Gill, D.; Hyde, S.; Jaffrès, P.-A.; Montier, T.; Le Gall, T. Antibacterial Effect and DNA Delivery Using a Combination of an Arsonium-Containing Lipophosphoramide with an N-Heterocyclic Carbene-Silver Complex – Potential Benefits for Cystic Fibrosis Lung Gene Therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *536*, 29–41, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.022.
141. Waters, V.; Smyth, A. Cystic Fibrosis Microbiology: Advances in Antimicrobial Therapy. *Journal of Cystic Fibrosis* **2015**, *14*, 551–560, doi:10.1016/j.jcf.2015.02.005.
142. Goss, C.H.; Kaneko, Y.; Khuu, L.; Anderson, G.D.; Ravishankar, S.; Aitken, M.L.; Lechtzin, N.; Zhou, G.; Czyz, D.; McLean, K.; et al. Gallium Disrupts Bacterial Iron Metabolism and Has Therapeutic Effects in Mice and Humans with Lung Infections. *Sci Transl Med* **2018**, *10*, eaat7520, doi:10.1126/scitranslmed.aat7520.
143. McCaughey, G.; Gilpin, D.; Elborn, J.; Tunney, M.M. The Future of Antimicrobial Therapy in the Era of Antibiotic Resistance in Cystic Fibrosis Pulmonary Infection. *Expert Review of Respiratory Medicine* **2013**, *7*, 385–396, doi:10.1586/17476348.2013.814411.
144. Mottais, A.; Le Gall, T.; Sibiril, Y.; Ravel, J.; Laurent, V.; d'Arbonneau, F.; Montier, T. Enhancement of Lung Gene Delivery after Aerosol: A New Strategy Using Non-Viral Complexes with Antibacterial Properties. *Biosci Rep* **2017**, *37*, BSR20160618, doi:10.1042/BSR20160618.

145. Sermet-Gaudelus, I.; Le Cocguic, Y.; Ferroni, A.; Clairicia, M.; Barthe, J.; Delaunay, J.-P.; Brousse, V.; Lenoir, G. Nebulized Antibiotics in Cystic Fibrosis. *Paediatr Drugs* **2002**, *4*, 455–467, doi:10.2165/00128072-200204070-00004.
146. Palmer, L.B.; Smaldone, G.C. Reduction of Bacterial Resistance with Inhaled Antibiotics in the Intensive Care Unit. *Am J Respir Crit Care Med* **2014**, *189*, 1225–1233, doi:10.1164/rccm.201312-2161OC.
147. Retsch-Bogart, G.Z.; Quittner, A.L.; Gibson, R.L.; Oermann, C.M.; McCoy, K.S.; Montgomery, A.B.; Cooper, P.J. Efficacy and Safety of Inhaled Aztreonam Lysine for Airway Pseudomonas in Cystic Fibrosis. *Chest* **2009**, *135*, 1223–1232, doi:10.1378/chest.08-1421.
148. McCoy, K.S.; Quittner, A.L.; Oermann, C.M.; Gibson, R.L.; Retsch-Bogart, G.Z.; Montgomery, A.B. Inhaled Aztreonam Lysine for Chronic Airway Pseudomonas Aeruginosa in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**, *178*, 921–928, doi:10.1164/rccm.200712-1804OC.
149. Tullis, D.E.; Burns, J.L.; Retsch-Bogart, G.Z.; Bresnik, M.; Henig, N.R.; Lewis, S.A.; LiPuma, J.J. Inhaled Aztreonam for Chronic Burkholderia Infection in Cystic Fibrosis: A Placebo-Controlled Trial. *Journal of Cystic Fibrosis* **2014**, *13*, 296–305, doi:10.1016/j.jcf.2013.08.011.
150. Geller, D.E.; Flume, P.A.; Staab, D.; Fischer, R.; Loutit, J.S.; Conrad, D.J. Levofloxacin Inhalation Solution (MP-376) in Patients with Cystic Fibrosis with *Pseudomonas Aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**, *183*, 1510–1516, doi:10.1164/rccm.201008-1293OC.
151. Konstan, M.W.; Geller, D.E.; Minić, P.; Brockhaus, F.; Zhang, J.; Angyalosi, G. Tobramycin Inhalation Powder for P. Aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis: The EVOLVE Trial. *Pediatric Pulmonology* **2011**, *46*, 230–238, doi:10.1002/ppul.21356.
152. Konstan, M.W.; Flume, P.A.; Kappler, M.; Chiron, R.; Higgins, M.; Brockhaus, F.; Zhang, J.; Angyalosi, G.; He, E.; Geller, D.E. Safety, Efficacy and Convenience of Tobramycin Inhalation Powder in Cystic Fibrosis Patients: The EAGER Trial. *Journal of Cystic Fibrosis* **2011**, *10*, 54–61, doi:10.1016/j.jcf.2010.10.003.
153. Conole, D.; Keating, G.M. Colistimethate Sodium Dry Powder for Inhalation: A Review of Its Use in the Treatment of Chronic Pseudomonas Aeruginosa Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Drugs* **2014**, *74*, 377–387, doi:10.1007/s40265-014-0181-0.
154. Meers, P.; Neville, M.; Malinin, V.; Scotto, A.W.; Sardaryan, G.; Kurumunda, R.; Mackinson, C.; James, G.; Fisher, S.; Perkins, W.R. Biofilm Penetration, Triggered Release and in Vivo Activity of Inhaled Liposomal Amikacin in Chronic Pseudomonas Aeruginosa Lung Infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, *61*, 859–868, doi:10.1093/jac/dkn059.
155. Clancy, J.P.; Dupont, L.; Konstan, M.W.; Billings, J.; Fustik, S.; Goss, C.H.; Lymp, J.; Minic, P.; Quittner, A.L.; Rubenstein, R.C.; et al. Phase II Studies of Nebulised Arikace in CF Patients with Pseudomonas Aeruginosa Infection. *Thorax* **2013**, *68*, 818–825, doi:10.1136/thoraxjnl-2012-202230.
156. Southern, K.W.; Clancy, J.P.; Ranganathan, S. Aerosolized Agents for Airway Clearance in Cystic Fibrosis. *Pediatric Pulmonology* **2019**, *54*, 858–864, doi:10.1002/ppul.24306.
157. Scialo, F.; Amato, F.; Cerneria, G.; Gelzo, M.; Zarrilli, F.; Comegna, M.; Pastore, L.; Bianco, A.; Castaldo, G. Lung Microbiome in Cystic Fibrosis. *Life (Basel)* **2021**, *11*, 94, doi:10.3390/life11020094.

158. Pérez, C.; Zúñiga, T.; Palavecino, C.E. Photodynamic Therapy for Treatment of Staphylococcus Aureus Infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2021**, *34*, 102285, doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102285.
159. Orlandi, V.T.; Martegani, E.; Bolognese, F.; Trivellin, N.; Garzotto, F.; Caruso, E. Photoinactivation of Pseudomonas Aeruginosa Biofilm by Dicationic Diaryl-Porphyrin. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6808, doi:10.3390/ijms22136808.
160. Gursoy, H.; Ozcaker-Tomruk, C.; Tanalp, J.; Yilmaz, S. Photodynamic Therapy in Dentistry: A Literature Review. *Clin Oral Investig* **2013**, *17*, 1113–1125, doi:10.1007/s00784-012-0845-7.
161. Jeong, H.; Lee, J.; Lee, J.; Na, K. A Multiligand Architectural Photosensitizer That Targets Hemagglutinin on Envelope of Influenza Virus for Photodynamic Inactivation. *Small* **2020**, *16*, 2000556, doi:10.1002/sml.202000556.
162. Kassab, G.; Geralde, M.C.; Inada, N.M.; Achilles, A.E.; Guerra, V.G.; Bagnato, V.S. Nebulization as a Tool for Photosensitizer Delivery to the Respiratory Tract. *Journal of Biophotonics* **2019**, *12*, e201800189, doi:10.1002/jbio.201800189.
163. Cassidy, C.M.; Tunney, M.M.; Magee, N.D.; Elborn, J.S.; Bell, S.; Singh, T.R.R.; Donnelly, R.F. Drug and Light Delivery Strategies for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) of Pulmonary Pathogens: A Pilot Study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2011**, *8*, 1–6, doi:10.1016/j.pdpdt.2010.12.007.
164. Donnelly, R.F.; McCarron, P.A.; Tunney, M.M.; David Woolfson, A. Potential of Photodynamic Therapy in Treatment of Fungal Infections of the Mouth. Design and Characterisation of a Mucoadhesive Patch Containing Toluidine Blue O. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2007**, *86*, 59–69, doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.07.011.
165. Donnelly, R.F.; McCarron, P.A.; Cassidy, C.M.; Elborn, J.S.; Tunney, M.M. Delivery of Photosensitisers and Light through Mucus: Investigations into the Potential Use of Photodynamic Therapy for Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Cystic Fibrosis Pulmonary Infection. *J Control Release* **2007**, *117*, 217–226, doi:10.1016/j.jconrel.2006.11.010.
166. Mahlert, L.; Anderski, J.; Mulac, D.; Langer, K. The Impact of Gastrointestinal Mucus on Nanoparticle Penetration – in Vitro Evaluation of Mucus-Penetrating Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2019**, *133*, 28–39, doi:10.1016/j.ejps.2019.03.010.
167. Anderski, J.; Mahlert, L.; Mulac, D.; Langer, K. Mucus-Penetrating Nanoparticles: Promising Drug Delivery Systems for the Photodynamic Therapy of Intestinal Cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *129*, 1–9, doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.018.
168. Dutta, D.; Sailapu, S.K.; Simon, A.T.; Ghosh, S.S.; Chattopadhyay, A. Gold-Nanocluster-Embedded Mucin Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Bioimaging. *Langmuir* **2019**, *35*, 10475–10483, doi:10.1021/acs.langmuir.9b00998.
169. Kashef, N.; Karami, S.; Djavid, G.E. Phototoxic Effect of Hypericin Alone and in Combination with Acetylcysteine on Staphylococcus Aureus Biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2015**, *12*, 186–192, doi:10.1016/j.pdpdt.2015.04.001.
170. Rubin, B.K. Mucolytics, Expectorants, and Mucokinetic Medications. *Respir Care* **2007**, *52*, 859–865.
171. Blasi, F.; Page, C.; Rossolini, G.M.; Pallecchi, L.; Matera, M.G.; Rogliani, P.; Cazzola, M. The Effect of N-Acetylcysteine on Biofilms: Implications for the Treatment of

- Respiratory Tract Infections. *Respir Med* **2016**, *117*, 190–197, doi:10.1016/j.rmed.2016.06.015.
172. Feng, X.; Zhang, Y.; Wang, P.; Liu, Q.; Wang, X. Energy Metabolism Targeted Drugs Synergize with Photodynamic Therapy to Potentiate Breast Cancer Cell Death. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 1793–1803, doi:10.1039/C4PP00288A.
173. Lim, E.J.; Oak, C.-H.; Heo, J.; Kim, Y.-H. Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy Enhances Apoptosis in Lung Cancer Cells. *Oncology Reports* **2013**, *30*, 856–862, doi:10.3892/or.2013.2494.
174. Baas, P.; Oppelaar, H.; van der Valk, M.A.; van Zandwijk, N.; Stewart, F.A. Partial Protection of Photodynamic-Induced Skin Reactions in Mice by N-Acetylcysteine: A Preclinical Study. *Photochem Photobiol* **1994**, *59*, 448–454, doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05063.x.
175. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, *2*, 95–108, doi:10.1038/nrmicro821.
176. Conrado, P.C.V.; Sakita, K.M.; Arita, G.S.; Gonçalves, R.S.; Cesar, G.B.; Caetano, W.; Hioka, N.; Voidaleski, M.F.; Vicente, V.A.; Svidzinski, T.I.E.; et al. Hypericin-P123-Photodynamic Therapy in an Ex Vivo Model as an Alternative Treatment Approach for Onychomycosis Caused by *Fusarium* Spp. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2021**, *35*, 102414, doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102414.
177. Yan, C.; Shao, X.; Shu, Q.; Teng, Y.; Qiao, Y.; Guan, P.; Hu, X.; Wang, C. Chitosan Modified Ultra-Thin Hollow Nanoparticles for Photosensitizer Loading and Enhancing Photodynamic Antibacterial Activities. *Int J Biol Macromol* **2021**, *186*, 839–848, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.078.
178. Hu, X.; Huang, Y.-Y.; Wang, Y.; Wang, X.; Hamblin, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front Microbiol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.01299.
179. Boccalini, G.; Conti, L.; Montis, C.; Bani, D.; Bencini, A.; Berti, D.; Giorgi, C.; Mengoni, A.; Valtancoli, B. Methylene Blue-Containing Liposomes as New Photodynamic Anti-Bacterial Agents. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 2788–2797, doi:10.1039/C6TB03367A.
180. St Denis, T.G.; Hamblin, M.R. Synthesis, Bioanalysis and Biodistribution of Photosensitizer Conjugates for Photodynamic Therapy. *Bioanalysis* **2013**, *5*, 1099–1114, doi:10.4155/bio.13.37.
181. Chang, H.; Liao, K.S.; Hsieh, Y.-S. Bronchoscopic Light Delivery Method for Peripheral Lung Cancer Photodynamic Therapy. *J Thorac Dis* **2020**, *12*, 3611–3621, doi:10.21037/jtd-19-3887.
182. Baran, T.M.; Foster, T.H. Comparison of Flat Cleaved and Cylindrical Diffusing Fibers as Treatment Sources for Interstitial Photodynamic Therapy. *Med Phys* **2014**, *41*, 022701, doi:10.1118/1.4862078.
183. Blum, N.T.; Zhang, Y.; Qu, J.; Lin, J.; Huang, P. Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 594491, doi:10.3389/fbioe.2020.594491.
184. Wei, X.; Li, J.; Zhang, Y.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Meng, H.; Wu, G.; Hu, Y.; Gao, Y.; Huang, S.; et al. Synergy between Clinical Microenvironment Targeted Nanoplatform and Near-Infrared Light Irradiation for Managing *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 38979–38989, doi:10.1021/acsmi.1c08132.

185. Le Gall, T.; Lemerrier, G.; Chevreux, S.; Tücking, K.-S.; Ravel, J.; Thétiot, F.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Montier, T. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy: A Structure-Activity Study on Clinical Bacterial Strains. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2229–2239, doi:10.1002/cmdc.201800392.
186. Youf, R.; Nasir, A.; Müller, M.; Thétiot, F.; Haute, T.; Ghanem, R.; Jonas, U.; Schönherr, H.; Lemerrier, G.; Montier, T.; et al. Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes for Antimicrobial Photodynamic Therapy: Prospects for Application in Cystic Fibrosis Lung Airways. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1664, doi:10.3390/pharmaceutics14081664.
187. Shteinberg, M.; Taylor-Cousar, J.L. Impact of CFTR Modulator Use on Outcomes in People with Severe Cystic Fibrosis Lung Disease. *Eur Respir Rev* **2020**, *29*, 190112, doi:10.1183/16000617.0112-2019.
188. MacKenzie, F.M.; Griffiths, C.; Dempsey, O.; Devereux, G.; Gould, I.M. Combination Antibiotic Susceptibility Testing in Cystic Fibrosis. *The Lancet* **2005**, *366*, 1693, doi:10.1016/S0140-6736(05)67691-X.
189. Hurley, M.N.; review co-authors; Prayle, A.P.; Flume, P. Intravenous Antibiotics for Pulmonary Exacerbations in People with Cystic Fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **2015**, *16*, 246–248, doi:10.1016/j.prrv.2015.07.002.
190. Kashef, N.; Akbarizare, M.; Razzaghi, M.R. In Vitro Activity of Linezolid in Combination with Photodynamic Inactivation Against Staphylococcus Aureus Biofilms. **2017**, *9*, 5.
191. Di Poto, A.; Sbarra, M.S.; Provenza, G.; Visai, L.; Speziale, P. The Effect of Photodynamic Treatment Combined with Antibiotic Action or Host Defence Mechanisms on Staphylococcus Aureus Biofilms. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3158–3166, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.038.
192. Ilizirov, Y.; Formanovsky, A.; Mikhura, I.; Paitan, Y.; Nakonechny, F.; Nisnevitch, M. Effect of Photodynamic Antibacterial Chemotherapy Combined with Antibiotics on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Molecules* **2018**, *23*, 3152, doi:10.3390/molecules23123152.
193. Li, X.; Huang, W.; Zheng, X.; Chang, S.; Liu, C.; Cheng, Q.; Zhu, S. Synergistic in Vitro Effects of Indocyanine Green and Ethylenediamine Tetraacetate-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined with Antibiotics for Resistant Bacterial Biofilms in Diabetic Foot Infection. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2019**, *25*, 300–308, doi:10.1016/j.pdpdt.2019.01.010.
194. Le Guern, F.; Sol, V.; Ouk, C.; Arnoux, P.; Frochot, C.; Ouk, T.-S. Enhanced Photobactericidal and Targeting Properties of a Cationic Porphyrin Following the Attachment of Polymyxin B. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2493–2506, doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00516.
195. Le Guern, F.; Ouk, T.-S.; Grenier, K.; Joly, N.; Lequart, V.; Sol, V. Enhancement of Photobactericidal Activity of Chlorin-E6-Cellulose Nanocrystals by Covalent Attachment of Polymyxin B. *J Mater Chem B* **2017**, *5*, 6953–6962, doi:10.1039/c7tb01274h.
196. Pang, X.; Li, D.; Zhu, J.; Cheng, J.; Liu, G. Beyond Antibiotics: Photo/Sonodynamic Approaches for Bacterial Theranostics. *Nano-Micro Lett.* **2020**, *12*, 144, doi:10.1007/s40820-020-00485-3.
197. Feng, Y.; Coradi Tonon, C.; Ashraf, S.; Hasan, T. Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination against Bacterial Infections: Efficacy, Determinants, Mechanisms, and Future Perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *177*, 113941, doi:10.1016/j.addr.2021.113941.

198. de Lastours, V.; Fantin, B. Impact of Fluoroquinolones on Human Microbiota. Focus on the Emergence of Antibiotic Resistance. *Future Microbiology* **2015**, *10*, 1241–1255, doi:10.2217/fmb.15.40.
199. Gull, H.H.; Karadag, C.; Senger, B.; Sorg, R.V.; Möller, P.; Mellert, K.; Steiger, H.-J.; Hänggi, D.; Cornelius, J.F. Ciprofloxacin Enhances Phototoxicity of 5-Aminolevulinic Acid Mediated Photodynamic Treatment for Chordoma Cell Lines. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2021**, *35*, 102346, doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102346.
200. Ronqui, M.R.; de Aguiar Coletti, T.M.S.F.; de Freitas, L.M.; Miranda, E.T.; Fontana, C.R. Synergistic Antimicrobial Effect of Photodynamic Therapy and Ciprofloxacin. *J Photochem Photobiol B* **2016**, *158*, 122–129, doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.02.036.
201. Nakonieczna, J.; Wolnikowska, K.; Ogonowska, P.; Neubauer, D.; Bernat, A.; Kamysz, W. Rose Bengal-Mediated Photoinactivation of Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Is Enhanced in the Presence of Antimicrobial Peptides. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1949, doi:10.3389/fmicb.2018.01949.
202. de Freitas, L.M.; Lorenzón, E.N.; Cilli, E.M.; de Oliveira, K.T.; Fontana, C.R.; Mang, T.S. Photodynamic and Peptide-Based Strategy to Inhibit Gram-Positive Bacterial Biofilm Formation. *Biofouling* **2019**, *35*, 742–757, doi:10.1080/08927014.2019.1655548.
203. Magana, M.; Pushpanathan, M.; Santos, A.L.; Leanse, L.; Fernandez, M.; Ioannidis, A.; Giulianotti, M.A.; Apidianakis, Y.; Bradfute, S.; Ferguson, A.L.; et al. The Value of Antimicrobial Peptides in the Age of Resistance. *Lancet Infect Dis* **2020**, *20*, e216–e230, doi:10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
204. Saberi, S.; Khoobi, M.; Alaeddini, M.; Etemad-Moghadam, S.; Jamshidloo, R.; Mohammadpour, H.; Shahabi, S. The Effect of Photodynamic Therapy on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Using *Spirulina Platensis* with Different Laser Energy Densities. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2022**, *37*, 102688, doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102688.
205. Gupta, V.; Balch, W.E. Protein Folding: Salty Sea Regulators of Cystic Fibrosis. *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 12–14, doi:10.1038/nchembio.1144.
206. Jouault, A.; Gobet, A.; Simon, M.; Portier, E.; Perennou, M.; Corre, E.; Gaillard, F.; Vallenet, D.; Michel, G.; Fleury, Y.; et al. Alterocin, an Antibiofilm Protein Secreted by *Pseudoalteromonas* Sp. Strain 3J6. *Appl Environ Microbiol* **2020**, *86*, e00893-20, doi:10.1128/AEM.00893-20.
207. Fleury, Y. Marine Antibiotics 2020. *Mar Drugs* **2021**, *19*, 351, doi:10.3390/md19060351.
208. Karges, J.; Tharaud, M.; Gasser, G. Polymeric Encapsulation of a Ru(II)-Based Photosensitizer for Folate-Targeted Photodynamic Therapy of Drug Resistant Cancers. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 4612–4622, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c02006.
209. Soliman, N.; Sol, V.; Ouk, T.-S.; Thomas, C.M.; Gasser, G. Encapsulation of a Ru(II) Polypyridyl Complex into Polylactide Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 961, doi:10.3390/pharmaceutics12100961.
210. Ramos, A.I.; Braga, T.M.; Braga, S.S. Ru(II)-Based Antimicrobials: Looking beyond Organic Drugs. *Mini Rev Med Chem* **2012**, *12*, 227–235, doi:10.2174/1389557511209030227.
211. Gabriliska, R.A.; Rumbaugh, K.P. Biofilm Models of Polymicrobial Infection. *Future Microbiol* **2015**, *10*, 1997–2015, doi:10.2217/fmb.15.109.
212. Karner, L.; Drechsler, S.; Metzger, M.; Hacobian, A.; Schädli, B.; Slezak, P.; Grillari, J.; Dungal, P. Antimicrobial Photodynamic Therapy Fighting Polymicrobial Infections – a Journey from *in Vitro* to *in Vivo*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19*, 1332–1343, doi:10.1039/D0PP00108B.

213. Bair, K.L.; Shafirstein, G.; Campagnari, A.A. In Vitro Photodynamic Therapy of Polymicrobial Biofilms Commonly Associated With Otitis Media. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 558482, doi:10.3389/fmicb.2020.558482.
214. Cai, Q.; Fei, Y.; An, H.-W.; Zhao, X.-X.; Ma, Y.; Cong, Y.; Hu, L.; Li, L.-L.; Wang, H. Macrophage-Instructed Intracellular *Staphylococcus Aureus* Killing by Targeting Photodynamic Dimers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 9197–9202, doi:10.1021/acsami.7b19056.
215. Biel, M.A.; Jones, J.W.; Pedigo, L.; Gibbs, A.; Loebel, N. The Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on Human Ciliated Respiratory Mucosa. *Laryngoscope* **2012**, *122*, 2628–2631, doi:10.1002/lary.23502.
216. Plebani, R.; Potla, R.; Soong, M.; Bai, H.; Izadifar, Z.; Jiang, A.; Travis, R.N.; Belgur, C.; Dinis, A.; Cartwright, M.J.; et al. Modeling Pulmonary Cystic Fibrosis in a Human Lung Airway-on-a-Chip. *Journal of Cystic Fibrosis* **2022**, *21*, 606–615, doi:10.1016/j.jcf.2021.10.004.
217. Reiter, J.; Borlinghaus, J.; Dörner, P.; Schröder, W.; Gruhlke, M.C.H.; Klaas, M.; Slusarenko, A.J. Investigation of the Deposition Behaviour and Antibacterial Effectivity of Allicin Aerosols and Vapour Using a Lung Model. *Exp Ther Med* **2020**, *19*, 1541–1549, doi:10.3892/etm.2019.8387.
218. Chibebe Junior, J.; Sabino, C.P.; Tan, X.; Junqueira, J.C.; Wang, Y.; Fuchs, B.B.; Jorge, A.O.C.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R.; Mylonakis, E. Selective Photoinactivation of *Candida Albicans* in the Non-Vertebrate Host Infection Model *Galleria Mellonella*. *BMC Microbiol* **2013**, *13*, 217, doi:10.1186/1471-2180-13-217.
219. Paziani, M.H.; Tonani, L.; de Menezes, H.D.; Bachmann, L.; Wainwright, M.; Braga, G.Ú.L.; von Zeska Kress, M.R. Antimicrobial Photodynamic Therapy with Phenothiazinium Photosensitizers in Non-Vertebrate Model *Galleria Mellonella* Infected with *Fusarium Keratoplasticum* and *Fusarium Moniliforme*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2019**, *25*, 197–203, doi:10.1016/j.pdpdt.2018.12.010.
220. Dib, S.; Aggad, D.; Mauriello Jimenez, C.; Lakrafi, A.; Hery, G.; Nguyen, C.; Durand, D.; Morère, A.; El Cheikh, K.; Sol, V.; et al. Porphyrin-based Bridged Silsesquioxane Nanoparticles for Targeted Two-photon Photodynamic Therapy of Zebrafish Xenografted with Human Tumor. *Cancer Rep (Hoboken)* **2019**, *2*, e1186, doi:10.1002/cnr2.1186.
221. Zhang, X.; de Boer, L.; Heiligers, L.; Man-Bovenkerk, S.; Selbo, P.K.; Drijfhout, J.W.; Høgset, A.; Zaat, S.A.J. Photochemical Internalization Enhances Cytosolic Release of Antibiotic and Increases Its Efficacy against Staphylococcal Infection. *Journal of Controlled Release* **2018**, *283*, 214–222, doi:10.1016/j.jconrel.2018.06.004.
222. Huang, X.; Xu, M.; Pan, W.; Wang, M.; Wu, X.; Dai, S.; Li, L.; Zeng, K. Antimicrobial and Immunomodulatory Responses of Photodynamic Therapy in *Galleria Mellonella* Model. *BMC Microbiol* **2020**, *20*, 196, doi:10.1186/s12866-020-01882-9.
223. Chow, M.Y.T.; Tai, W.; Chang, R.Y.K.; Chan, H.-K.; Kwok, P.C.L. In Vitro-in Vivo Correlation of Cascade Impactor Data for Orally Inhaled Pharmaceutical Aerosols. *Adv Drug Deliv Rev* **2021**, *177*, 113952, doi:10.1016/j.addr.2021.113952.
224. Ehrmann, S.; Schmid, O.; Darquenne, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Sznitman, J.; Yang, L.; Barosova, H.; Vecellio, L.; Mitchell, J.; Heuze-Vourc'h, N. Innovative Preclinical Models for Pulmonary Drug Delivery Research. *Expert Opin Drug Deliv* **2020**, *17*, 463–478, doi:10.1080/17425247.2020.1730807.

225. Wang, H.; Wang, Z.; Li, Y.; Xu, T.; Zhang, Q.; Yang, M.; Wang, P.; Gu, Y. A Novel Theranostic Nanoprobe for In Vivo Singlet Oxygen Detection and Real-Time Dose–Effect Relationship Monitoring in Photodynamic Therapy. *Small* **2019**, *15*, 1902185, doi:10.1002/sml.201902185.
226. Kassab, G.; Diaz Tovar, J.S.; Souza, L.M.P.; Costa, R.K.M.; Silva, R.S.; Pimentel, A.S.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Lung Surfactant Negatively Affects the Photodynamic Inactivation of Bacteria-in Vitro and Molecular Dynamic Simulation Analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2022**, *119*, e2123564119, doi:10.1073/pnas.2123564119.
227. Fraix, A.; Sortino, S. Combination of PDT Photosensitizers with NO Photodonor. *Photochem Photobiol Sci* **2018**, *17*, 1709–1727, doi:10.1039/c8pp00272j.
228. Pervaiz, S. Reactive Oxygen-Dependent Production of Novel Photochemotherapeutic Agents. *FASEB J* **2001**, *15*, 612–617, doi:10.1096/fj.00-0555rev.
229. Sun, C.-H.; Berg, K.; Hirschberg, H. Photochemical Internalization Enhanced Nonviral Suicide Gene Therapy. In *Suicide Gene Therapy*; Düzgüneş, N., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2019; Vol. 1895, pp. 165–176 ISBN 978-1-4939-8921-8.
230. Grasemann, H.; Klingel, M.; Avolio, J.; Prentice, C.; Gonska, T.; Tullis, E.; Ratjen, F. Long-Term Effect of CFTR Modulator Therapy on Airway Nitric Oxide. *European Respiratory Journal* **2020**, *55*, doi:10.1183/13993003.01113-2019.
231. Kotha, K.; Szczesniak, R.D.; Naren, A.P.; Fenchel, M.C.; Duan, L.L.; McPhail, G.L.; Clancy, J.P. Concentration of Fractional Excretion of Nitric Oxide (FENO): A Potential Airway Biomarker of Restored CFTR Function. *J Cyst Fibros* **2015**, *14*, 733–740, doi:10.1016/j.jcf.2015.07.002.
232. E, M.; M, S.; A, P.; M, P.; S, M.; Gf, P.; S, L. Cystic Fibrosis and Oxidative Stress: The Role of CFTR. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27165324.
233. Ning, X.; He, G.; Zeng, W.; Xia, Y. The Photosensitizer-Based Therapies Enhance the Repairing of Skin Wounds. *Frontiers in Medicine* **2022**, *9*.
234. Firczuk, M.; Nowis, D.; Gołąb, J. PDT-Induced Inflammatory and Host Responses. *Photochem Photobiol Sci* **2011**, *10*, 653–663, doi:10.1039/c0pp00308e.
235. Chiu, W.-T.; Tran, T.-T.V.; Pan, S.-C.; Huang, H.-K.; Chen, Y.-C.; Wong, T.-W. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: A Possible New Target for Photodynamic Therapy Enhances Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2019**, *8*, 476–486, doi:10.1089/wound.2018.0927.
236. Egan, M.E.; Pearson, M.; Weiner, S.A.; Rajendran, V.; Rubin, D.; Glöckner-Pagel, J.; Canny, S.; Du, K.; Lukacs, G.L.; Caplan, M.J. Curcumin, a Major Constituent of Turmeric, Corrects Cystic Fibrosis Defects. *Science* **2004**, *304*, 600–602, doi:10.1126/science.1093941.

**Titre :** Evaluation de la thérapie photodynamique comme stratégie antimicrobienne dans le cadre des infections bronchopulmonaires retrouvées chez les patients atteints de la mucoviscidose

**Mots clés :** Antimicrobien, Thérapie photodynamique, Infection bronchopulmonaire, Mucoviscidose

<p><b>Résumé :</b> Le développement des résistances aux antibiotiques (RA) chez les bactéries est un problème d'importance majeure dans le secteur médical. Malgré la mise en place de réformes visant à modérer la consommation d'antibiotiques, le développement de nouvelles classes d'agents antimicrobiens doit être considéré. Chez les patients atteints de mucoviscidose (Cystic Fibrosis, CF), les bactéries sont particulièrement propices au développement de résistantes à de multiples antibiotiques menant à des échecs thérapeutiques. Parmi elles, <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> sont deux pathogènes majeurs responsables de sévères complications dues à leur plasticité génétique et phénotypique. Ces dernières leur permettent de développer de fortes capacités d'adaptation au micro-environnement pulmonaire des patients CF.</p>	<p>Ce contexte physiopathologique confère un environnement dans lequel il est difficile d'évaluer l'efficacité d'agents antimicrobiens. Dans ce sens, la thérapie photodynamique (PDT) antimicrobienne pourrait être une approche prometteuse. Cette stratégie repose sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à une illumination d'un photosensibilisateur (PS) non toxique. En théorie, la PDT agit dans une zone localisée et de façon non invasive en éliminant les bactéries cibles via l'action des ROS. Ce travail a évalué la compatibilité d'une PDT antimicrobienne pour traiter les infections bronchopulmonaires en prenant en compte les paramètres physiologiques des poumons de patients CF. Son efficacité en combinaison avec d'autres traitements, comme la thérapie génique, a également été étudiée.</p>
--	--

**Title:** Evaluation of photodynamic therapy as an antimicrobial strategy in the context of bronchopulmonary infections found in cystic fibrosis patients

**Keywords:** Antimicrobial, Photodynamic Therapy, Bronchopulmonary infection, Cystic fibrosis

<p><b>Abstract:</b> The development of antimicrobial resistance (AMR) in bacteria is one of the major problems in the healthcare system. Despite the attempts to restrict the misuse of antibiotics, a key factor directly linked to the emergence and spread of AMR, the development of new classes of potent antimicrobials is needed. In Cystic Fibrosis (CF) patients, the increasing prevalence of multidrug-resistant (MDR) bacteria is responsible to treatment failures of chronic bronchopulmonary infections. Of particular concern are <i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>. These pathogens, along with many others, are involved in severe infectious complications due to their genotypic and phenotypic plasticity that allow them to be well adapted to the special CF lung microenvironment.</p>	<p>Currently, assessing the effectiveness of antibiotics, as well as non-antibiotic antimicrobials, in this pathophysiological context is a challenge. In this direction, antimicrobial photodynamic therapy (PDT) could be a promising approach against CF pathogens. By definition, antimicrobial effect of this emerging therapy results from the generation of reactive oxygen species (ROS) following irradiation of non-toxic photosensitizer (PS). These ROS are capable of eliminating pathogens in the surrounding areas in a non-invasive manner. In this regard, our work aimed to evaluate the capability of this strategy against various pathogens by considering different physiological parameters of CF lungs. Then, its combination with other therapeutic options, such as gene therapy, was also evaluated.</p>
--	---