

Université de Limoges
École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)
Laboratoire de Chimie des Sciences Naturelles (LCSN) – EA1069

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

Présentée et soutenue par
Florent Le Guern

Le 10 novembre 2017

**Inhibition de souches bactériennes par de nouveaux composés
photosensibles conjugués à la Polymyxine B**

Thèse dirigée par Pr. Vincent Sol et Dr. Tan-sothea Ouk

JURY :

Rapporteurs

M. Jean-Olivier Durand, DR-CNRS, *Université de Montpellier (France)*
M. Santi Nonell, Professeur, *Universidad Ramon Llull, Barcelona (España)*

Examineurs

Mme. Céline Frochot, DR-CNRS, *Université de Lorraine, Nancy (France)*
Mme. Francesca Giuntini, Docteur, *Liverpool John Moores University (United Kingdom)*
Mme. Maria Urdaci, Professeur des Universités, *Université de Bordeaux (France)*

Invités

Mme. Stéphanie Lhez, Maître de conférences, *Université de Limoges (France)*
M. Régis Vanderesse, CR-CNRS, *Université de Lorraine, Nancy (France)*



Remerciements

Après trois années de recherche résumées dans ce manuscrit, il me paraît essentiel de remercier toutes les personnes qui ont participé humainement ou scientifiquement à ce projet.

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur Vincent Sol, en tant que directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN), pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. De plus, je souhaite aussi le remercier en tant qu'encadrant pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, et pour m'avoir accompagné le long de ces travaux. En plus de m'avoir confié un sujet de recherche, j'ai eu la chance de le réaliser dans un environnement de confiance où mes idées ont été écoutées et appréciées. Ce sentiment de confiance m'a notamment permis de réaliser deux conférences orales lors de congrès internationaux, dont une au Portugal. Puisque cette expérience professionnelle aura un impact certain sur ma carrière et ma vie de manière générale, je te suis très reconnaissant, Vincent, et je te remercie de m'avoir fait confiance.

Je tiens aussi à remercier le docteur Tan-sothea Ouk pour les mêmes raisons. Mon choix de sujet de thèse s'est porté sur celui proposé par le LCSN, notamment à cause d'une grande partie de microbiologie. Ainsi, je te remercie, Tan, pour m'avoir formé en un temps record. En plus de cet apprentissage, tu t'es toujours montré disponible pour répondre à ma curiosité, notamment lors de longues discussions à l'IUT de Génie Biologique. J'en profite pour saluer ton humour et ta gentillesse unique, probablement alimentés par des années de maroilles et de frites. Je remercie aussi Catherine pour son aide et son attention, malgré son emploi du temps chargé. Ainsi, je vous souhaite, et à vos deux princesses, un futur rempli de bonheur, de santé et de réussite.

I express my thanks to Professor Santi Nonell and Doctor Jean-Olivier Durant for agreeing to come and examine this study. It is a great honor for me to submit my works to your appraisals. I want also to thanks Doctor Francesca Giuntini, Professor Maria Urdaci and Doctor Céline Frochot, for their expertises in photodynamic therapy, microbiology and photophysics respectively.

Lors de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler de nouveau avec l'équipe PDTeam du LRGP et LCPM de Nancy. En tant que directrice de recherche au LRGP, Céline Frochot offre une formation scientifique dans un environnement particulièrement maternel et attentionné. Je tiens à te remercier Céline pour ton humanité et ta gentillesse sans limite. Puisque l'alliance de la gentillesse et de la science est une tradition nancéenne intangible, mes remerciements vont aussi à Régis Vanderesse, chargé de recherche au LCPM. Les mots sont insuffisants pour décrire à quel point notre rencontre a changé ma vie humainement et professionnellement, je ne te remercierai jamais assez pour cela. Evidemment, je tiens à remercier de nouveau Philippe, Samir, Ludovic, Albert, Yerzhan, Nurlykyz pour leur accueil, leur gentillesse et leur expertise. Mes pensées vont aussi à tous leurs anciens doctorants tels qu'Aurélien (la véritable patronne), Amirah et Mohammed.

Plongé dans l'euphorie scientifique, je me suis retrouvé plusieurs fois devant des impasses, dues à un manque de connaissances ou de moyens. Je tiens à remercier toutes les personnes qui me sont venues spontanément en aide au cours de ces trois années. Je remercie Stéphanie Leroy-Lhez pour sa patience et son aide en photophysique malgré mon blocage cérébral envers cette discipline. Je remercie Nicolas Joly et Vincent Lequart, membres de l'Université d'Artois, pour avoir réalisé les analyses élémentaires sans qui, le chapitre 5 n'aurait jamais existé. Je tiens à remercier l'équipe BISCEm, spécialiste en analyse à Limoges, à savoir Yves Champavier, Emilie Pinault, Catherine Ouk et Claire Carrion. De même, je remercie Solange Degot pour son expertise en thermogravimétrie. Je suis

redevable envers l'entreprise Covertis, qui m'a laissé utiliser son lyophilisateur de façon régulière. Merci d'avoir pris sur votre temps pour m'avoir formé et pour avoir répondu à mes demandes spécifiques. Enfin, je tiens à remercier Michel Guilloton pour ses corrections sur les diverses publications. J'ai vraiment apprécié nos discussions et vos corrections, particulièrement pertinentes et riches de connaissances.

Alors que je remercie évidemment l'équipe de l'IUT Génie biologique pour son aide professionnelle, je tiens à souligner la bonne ambiance au sein de cette unité. Ainsi, je remercie Philippe, Karine, Cornelia, Naima, Marion, Etienne pour avoir supporté mon humour et m'avoir conforté dans ma folie. De manière identique, je tiens à remercier mes collègues situés sur le site de Pharma, notamment Bertrand, pour son écoute, son aide et pour m'avoir fait passer un congrès hallucinant à Coimbra (Come on !). Enfin, je remercie aussi Claude pour sa démonstration avec l'« enterprise », ainsi que Gabin (alias Maverick) pour son aide avec des questions de chimie théorique.

Je souhaite remercier mes deux stagiaires : Marlène Suchareau et Marjorie Fleury. Leurs deux stages ont permis d'initier des travaux plus approfondis alors que je n'avais pas le temps de chercher dans ces directions. En effet, le stage de Marjorie à l'IUT de Génie biologique nous a incités à nous investir sur l'étude d'un nouveau film photobactéricide, sujet d'un brevet déposé par le LCSN. Enfin, le stage de Marlène permet de valider la stratégie de synthèse peptidique et ouvre de nombreuses questions par rapport à la polymyxine à base de lysine. Merci !

Je dédie une pensée toute particulière pour la professeur Rachida Zerrouki. Je pense que tu dois avoir l'habitude, mais je tiens tout de même à te remercier pour ta disponibilité et pour ton écoute. Alors que nous avons tous remarqué ta charge considérable de travail ces dernières années, tu es toujours à l'écoute de tes amis et de tous les doctorants dans la détresse. En plus de ce dévouement, tu apportes ta joie de vivre au quotidien. Je suis très heureux d'avoir fait ta rencontre et je te suis vraiment reconnaissant pour ton attention et ta patience. Et puis comme on dit : مرفتاح ال صبر ! ال فرج

Alors que j'ai pu profiter des avantages d'un bureau individuel lors de ma dernière année, ma colocatrice des premières années m'a beaucoup manqué. Je remercie donc, Evelyne Poli, pour m'avoir accompagné à mon arrivée à Limoges, et pour un bon nombre de fou rire dans le bureau. Je te remercie aussi, « Maman », pour m'avoir accueilli au sein de ta famille. Ainsi, j'en profite pour remercier Nicolas et Antoine, en tant que « Valentin » à mi-temps. De plus, je souhaite une bonne arrivée à la princesse, Héloïse. Mes remerciements vont aussi vers un autre couple de chimistes, à savoir Frédérique Brégier et Antoine Eggenspiller, et leurs princesses Emma et Léa. Je vous suis reconnaissant pour votre aide professionnelle et humaine, ainsi que pour ne pas m'avoir demandé de déménager le frigo à Condat.

Ma reconnaissance va aussi envers mes collègues doctorants, qui m'ont beaucoup apporté ces dernières années. Je commence par le dernier partant, à savoir Benjamin Rioux. Je te suis très reconnaissant pour ta présence, surtout cette dernière année. Nos soirées dans la terre du milieu, entremêlées de « ...C'est génial ! », m'ont beaucoup apporté dans une année particulièrement difficile émotionnellement. Et puis merci à Lizou évidemment... même si je ne peux plus m'approcher d'un port HDMI sans trembler.

Puisqu'il faut des bûcherons pour construire les maisons et héberger l'humanité, je tiens à remercier Idelette pour son travail et son expertise dans le domaine des trucs verts. Si je t'ai toujours considéré comme notre présidente, c'est que tu associes un niveau unique de professionnalisme et relationnel.

Au-delà du nombre de bêtises que je débite, je te suis reconnaissant de m'avoir supporté ces trois années. Allez ! Bisou sur l'épaule hein !

Co-pilote d'exception et nouveau parisien, mon lyonnais préféré en la personne de Franck(y) est une personne admirable. Je te remercie pour ta personnalité pleine de gentillesse et d'attention. On se revoit rapidement !

Merci à Olivier, pour m'avoir entretenu financièrement et physiquement pendant toutes ces années. Je te souhaite une carrière à la hauteur de tes espérances, même si ton départ de Guéret a entraîné une chute démographique de 33% en Creuse. Ceci me permet aussi de remercier un autre Creusoïse, mon futur-père et docteur Manu. Je suis content que tu aies trouvé ta voie, car elle correspond bien à ta magnifique personnalité.

Merci à Nicolas, mon deuxième lyonnais. Je garderais de très bons souvenirs de mes premières années, accentués par ta qualité d'hôte hors pairs. Tous mes vœux de réussites pour l'avenir.

« Oyez oyez » ! Damoiselle de haute lignée et grand prêtresse du jogging, Dame Rigaud du Limousin touche particulièrement les cœurs à travers nombres contrées, par sa capacité d'écoute, son optimisme et sa force de caractère. Merci infiniment Adeline ! Je sais que tes efforts seront récompensés à la hauteur de ce que tu offres à ton entourage.

Merci à miss Bonet. Tu as été très présente lors de mon arrivée et tu as été un support émotionnel très important. Avec le temps et la distance, on est moins resté en contact, mais je te serai toujours reconnaissant. Je te souhaite un très bon séjour dans ton nouveau pays d'accueil. Je ne peux pas te remercier sans faire allusion à ta partenaire de toujours, miss « Champi ». Merci Gaëlle, pour ton humour et ton « coolitude ». On aura bien ri en compagnie de Yohan, que je remercie aussi pour être parti loin. Très loin ...(avec Juju ?).

Je tiens aussi à remercier tous les autres doctorants et (ex-)collègues pour leur humour et les bons moments passés en salle café, à savoir Aurélie (courage !), Amandine D (miss TRG), Zineb (Rachida-Bis), Amaury, Tom, Guillaume, Florian, Soukaina, Romain, Shihong, Mark-Arthur, Anaïs, Mohammad, Olivier D., Salim et Holm.

Ma reconnaissance va envers aussi tous les employés de l'Université, à savoir Dorothée (partenaire de discussions caféinées), Sylvie (ma super voisine), Michelle, Thierry, Catherine, Robert, Marie, Cricri, Vincent G., Vincent C., Céline et Odette.

Evidemment, mes derniers remerciements sont dédiés à ma famille et mes amis proches, qui ont accepté mon choix de carrière et m'ont toujours encouragé dans ce sens. Merci !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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



Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : LES INFECTIONS BACTERIENNES.....	5
I. LES BACTERIES	6
I.1. Structures des bactéries	6
I.2. Croissance bactérienne	7
I.3. Parois bactériennes	9
I.3.1. Les points communs entre les deux types de paroi.	9
I.3.2. Paroi des bactéries Gram positif	10
I.3.3. Paroi des bactéries Gram négatif	10
I.4. Pathogénèse bactérienne	11
I.5. Résistance bactérienne.....	12
II. EVOLUTION AU COURS DE L’HISTOIRE	14
II.1. Les prémices de la Microbiologie	14
II.2. La naissance de la Microbiologie	14
II.3. L’expansion rapide de la Bactériologie	16
II.4. L’évolution des maladies infectieuses	16
III. LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LES INFECTIONS BACTERIENNES	19
III.1. Les premiers traitements.....	19
III.2. L’âge d’or des antibiotiques.....	20
III.2.1. La découverte des antibiotiques.....	20
III.2.2. Les grandes familles d’antibiotiques	21
III.3. L’apparition des souches résistantes	22
III.4. Les nouveaux agents antibactériens.....	23
III.4.1. Découvertes des AMP et leur utilisation	24
III.4.2. Particularités et classification	25
III.4.3. Modes d’action	26
III.4.4. Résistance aux AMP	28
III.5. Les Polymyxines.....	28
III.5.1. Structure des polymyxines	29
III.5.2. Utilisation des polymyxines	29
III.5.3. Relation Structure - Activité.....	30
III.5.4. Mécanisme d’action des polymyxines	31
III.5.5. Résistances aux polymyxines.....	33
CHAPITRE 2 : LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	34
I. DEFINITION DE LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	35
I.1. Applications cliniques	35
I.2. La thérapie photodynamique antimicrobienne	36
II. MECANISMES PHOTOPHYSIQUES.....	38
II.1. Production de ROS.....	38
II.1.1. Réactions de type I	39
II.1.2. Réactions de type II	39

II.2. Les ROS au contact des organismes vivants.....	41
III. ETAT DE L'ART DE L'APDT	42
III.1. Les photosensibilisateurs non-tétrapyrroliques	42
III.1.1. Les molécules d'origine naturelle	42
III.1.2. Les molécules synthétiques	44
III.2. Les PS tétrapyrroliques	46
III.2.1. Structure des porphyrines, des chlorines et des bactérochlorines	46
III.2.2. Propriétés photophysiques.....	47
III.2.3. Obtention de PS tétrapyrroliques d'origine naturelle	49
III.2.4. Synthèse des porphyrines.....	52
III.2.5. Les phthalocyanines	61
III.3. Les générations de photosensibilisateurs tétrapyrroliques	62
III.3.1. Optimisation de l'aPDT.....	63
III.3.2. Les composés photobactéricides	64
IV. OBJECTIFS DU TRAVAIL	67
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE PORPHYRINES CATIONIQUES POUR DES APPLICATIONS PHOTOBACTERIQUES	69
I. PRINCIPE	70
II. PUBLICATION	71
III. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES	83
IV. RESUME ET CONCLUSION	101
CHAPITRE 4 : OPTIMISATION DE LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE ANTIMICROBIENNE PAR COUPLAGE AVEC DES DERIVES DE POLYMYXINE B	102
I. ACTIVITE ET SELECTIVITE ACCRUE D'UNE PORPHYRINE CATIONIQUE APRES COUPLAGE AVEC LA POLYMYXINE ..	103
I.1. Principe.....	103
I.2. Publication.....	104
I.3. Informations supplémentaires	118
I.4. Résumé et conclusion.....	131
II. LE DERIVE DE POLYMYXINE A BASE DE LYSINE : UN VECTEUR PROMETTEUR POUR L'APDT	133
II.1. Principe.....	133
II.2. Publication.....	134
II.3. Informations supplémentaires	140
II.4. Résumé et conclusion.....	150
CHAPITRE 5 : AMELIORATION DE L'ACTIVITE PHOTOBACTERICIDE DE LA CHLORINE-E6 FIXEE SUR DES NANOCRISTAUX DE CELLULOSE PAR GREFFAGE DE LA POLYMYXINE B.....	152
I. ETAT DE L'ART SUR LES SURFACES BACTERIQUES.....	153
I.1. Les surfaces non-adhésives	153
I.2. Les matériaux intrinsèquement antibactériens	153
I.3. Les revêtements bactéricides	154
I.3.1. Fixation de molécules antimicrobiennes	155
I.3.2. Revêtement polymérique fonctionnalisé	155

I.3.3. Relargage d'oxyde nitrique	157
I.3.4. Surface relarguant des molécules actives	158
II. LES SURFACES PHOTOBACTERICIDES	159
II.1. Matériaux à base de PS non-tétrapyrroliques	159
II.2. Surface à base de PS tétrapyrroliques	161
III. NANOCRISTAUX ANTIBACTERIENS : PRINCIPE.....	163
IV. PUBLICATION	164
V. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES	174
VI. RESUME ET CONCLUSION.....	181
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	182
PARTIE EXPERIMENTALE	186
I. CHAPITRE 3	187
I.1. Procédures générales	187
I.2. Synthèse	187
I.3. Propriétés photophysiques.....	193
I.4. Essais biologiques	195
II. CHAPITRE 4	196
II.1. Synthèse	196
II.2. Essais biologiques	201
III. CHAPITRE 5	204
III.1. Synthèse	204
III.2. Analyses.....	208
III.3. Essais biologiques	211
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	214
ANNEXES.....	237

Introduction générale

Depuis l'introduction de la pénicilline G sur le marché dans les années 1940, « l'âge d'or » des antibiotiques a longtemps été considéré comme miraculeux et les maladies infectieuses furent considérées comme vaincues. Les antibiotiques ont permis de fortement réduire le nombre de décès dûs aux infections bactériennes.¹ Malgré l'observation de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, les antibiotiques ont été mal exploités à travers le monde, en particulier à cause de prescriptions abusives, d'un manque d'informations et de la croyance collective.² Cette mauvaise utilisation entraîna l'apparition de souches multi-résistantes (MDR) aux traitements conventionnels, engendrant de nouvelles infections difficilement curables. Ces maladies persistantes sont devenues un problème de santé publique, notamment dans le cas d'infections chroniques ou d'infections nosocomiales, entraînant un nombre de décès considérable et un coût important de prise en charge.³ En plus des résistances émergentes, le nombre de nouveaux antibiotiques découverts n'a cessé de décroître durant les dernières décennies.^{4,5} Aujourd'hui, les conséquences de l'émergence des souches résistantes sont reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).⁶ Face aux conséquences grandissantes, de nouvelles stratégies antimicrobiennes sont étudiées. Similairement, d'anciennes techniques qui furent éclipsées pendant « l'âge d'or » des antibiotiques, réapparaissent actuellement dans le milieu de la recherche.

Parmi toutes ces alternatives, la thérapie photodynamique antimicrobienne (aPDT) a montré des résultats prometteurs. En effet, cette technique n'induit aucune résistance bactérienne contrairement aux antibiotiques.⁷ Dérivé de la thérapie photodynamique anticancéreuse (PDT), l'aPDT repose sur la présence simultanée de trois éléments : une molécule ayant des propriétés photophysiques particulières (appelée photosensibilisateur (PS)), une irradiation lumineuse adéquate et la présence d'oxygène. La réunion de ces trois éléments induit la création d'espèces cytotoxiques, appelées les espèces réactives de l'oxygène (ROS) : à savoir l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) et l'oxygène singulet (1O_2). Ces ROS réagissent rapidement avec différents substrats moléculaires (protéines, acides nucléiques, lipides, etc.), ce qui rend difficile l'établissement d'une résistance.^{7,8} Durant ces dernières années, l'aPDT a été étudiée comme une alternative thérapeutique dans la lutte antibactérienne. Initialement, cette technique fut utilisée contre une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (MRSA), et elle obtint des résultats encourageants.⁹ Les études suivantes ont montré que l'aPDT était particulièrement efficace contre les bactéries Gram positif. D'un autre côté, les bactéries Gram négatif ont démontré une sensibilité moindre vis-à-vis de l'aPDT.^{10,11} Par la suite, de nombreuses études ont mis en avant l'efficacité accrue des photosensibilisateurs cationiques sur de nombreuses souches bactériennes, grâce à leur meilleure affinité pour des composants membranaires, telles que les acides téichoïques (LTA) des bactéries Gram positif et les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif.¹²⁻¹⁴ Dès lors, les PS cationiques sont devenus incontournables en aPDT (comme la **TMPyP**, Figure 1). Malgré cette bonne efficacité, ces derniers n'ont pas montré d'interactions réellement fortes pour les bactéries, notamment envers les bactéries Gram négatif. Ainsi, leur application reste limitée car ce manque d'interaction pourrait entraîner des effets secondaires sur les cellules humaines, lors

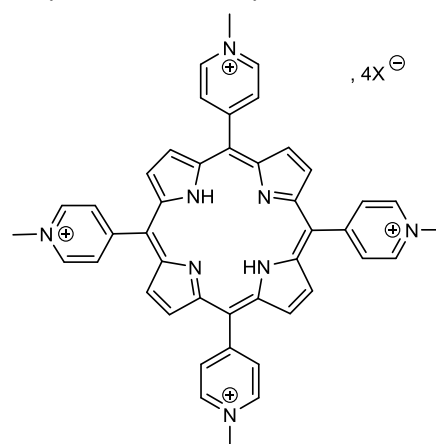


Figure 1. Exemple de photosensibilisateur cationique, la tetrakis(4-N-méthylpyridyl)-21H,23H-porphyrine (**TMPyP**)

de traitements de plaies infectées par exemple.^{15,16}

Parallèlement, une famille d'antibiotique a su se distinguer ces dernières années : les peptides antimicrobiens (AMP). Ces peptides sont omniprésents dans de nombreux organismes. Alors que le nombre de peptides antimicrobiens découverts ne cesse d'augmenter, les polymyxines sont devenues incontournables dans le milieu médical. Naturellement produit par la souche bactérienne *Peanibacillus polymyxa*¹⁷, ce peptide est constitué d'un cycle de sept acides aminés, prolongé d'une chaîne de trois acides aminés linéaires et terminé par une chaîne lipophile (Figure 2). Initialement, cinq types de polymyxines furent découverts (A à E), mais seulement deux types sont actuellement utilisés dans le milieu médical (B et E, cette dernière est aussi appelée colistine). Chaque polymyxine peut présenter des variantes selon sa chaîne lipophile (numérotée 1 à 4), mais la plupart des polymyxines commerciales ne sont composées que des versions 1 et 2. La forte charge cationique, dûe aux acides diaminobutyriques, permet au peptide de se fixer fortement sur la membrane externe des bactéries Gram négatif, grâce une interaction électrostatique entre ce peptide et les LPS. De plus, sa structure bien particulière permet un repliement qui lui offre un caractère amphipathique. Ainsi, ce peptide interagit spécifiquement avec le lipide A des LPS, à la fois par interaction ionique et par l'intégration de sa partie lipophile dans la couche lipidique de la membrane. Sa présence et son accumulation sur la membrane entraînent son extension et la perte des cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) stabilisant les LPS, puis la perméabilisation de la membrane. Enfin, cette perméabilisation croissante entraîne la perte d'intégrité membranaire puis la mort de bactérie.^{18,19} Actuellement, les polymyxines sont utilisées en tant que traitement de derniers recours contre les infections de bactéries résistantes Gram négatif. En 2016, la première souche d'*Escherichia coli* résistante à la colistine a été découverte en milieu hospitalier.²⁰

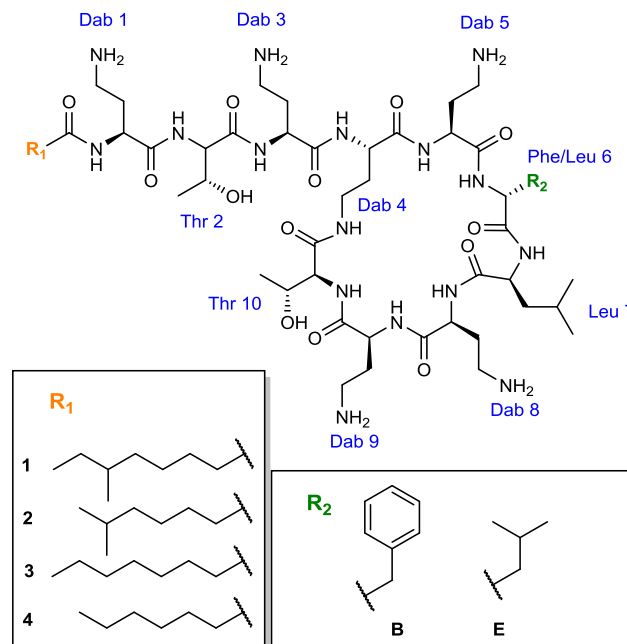


Figure 2. Structure générale des polymyxines.

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont pour objectif d'approfondir les connaissances et les résultats obtenus en aPDT, afin de valoriser cette technique en tant que solution viable face aux infections bactériennes. Afin de pallier les deux problèmes majeurs de l'aPDT, qui sont le manque d'efficacité des photosensibilisateurs non cationiques et le manque d'interaction des PS en général,

nous avons voulu au cours de ce travail, associer chimiquement la polymyxine B à différents PS. En effet, Nitzan et coll. ont déjà montré que la polymyxine B permet de sensibiliser les bactéries Gram négatif à l'aPDT grâce à la perméabilisation de leur membrane.²¹ En plus de cet effet, l'association chimique entre un PS et une polymyxine B devrait permettre une interaction accrue pour la paroi des bactéries Gram négatif, via l'affinité du peptide pour le lipide A. Tout d'abord, nous avons étudié de nouveaux PS de type porphyrine cationique, afin d'accompagner tous les futurs travaux potentiels cherchant à associer chimiquement ces molécules à des agents de ciblage. Ensuite, nous avons réalisé l'association désirée : des composés regroupant une porphyrine cationique et des dérivés de polymyxines. Ces premiers travaux ont offert des résultats très prometteurs, mais ils restent néanmoins expérimentaux pour l'instant. Ainsi, afin d'accentuer l'intérêt de l'aPDT, un nouveau matériel basé sur le même principe a été conçu avec une bonne considération pour l'environnement. Des nanocristaux de cellulose ont été recouverts d'un photosensibilisateur d'origine naturelle et d'une polymyxine commerciale. L'ensemble de ces travaux permet de mettre en avant l'intérêt d'utiliser les AMP dans le but d'optimiser l'aPDT et d'encourager son éventuelle adaptation dans le milieu médical.

Chapitre 1 : Les infections bactériennes

Dans ce chapitre, nous traiterons les informations connues de la Microbiologie afin de mieux comprendre les enjeux économiques et sociétaux des infections microbiennes. En effet, afin de bien situer la problématique, il est important de faire un point sur les agents infectieux, leur histoire et les dernières découvertes.

Le terme « Bactérie » désigne l'ensemble des organismes vivants microscopiques procaryotes. Pendant plusieurs années, les *Archaea* appartenaient à la famille des bactéries mais au cours du 20^{ème} siècle, ces microorganismes ont été reconnus comme des entités à part entière. Ainsi les *Archaea* et les virus seront très peu abordés dans ce manuscrit. Les bactéries sont généralement unicellulaires et elles ont la capacité de se multiplier rapidement (20 à 40 min). Ces microorganismes non visibles à l'œil nu sont omniprésents dans l'environnement (eaux, air, sols) et la plupart d'entre eux sont inoffensives pour l'Homme. Chez l'Homme, on estime que le rapport entre le nombre de bactéries et de cellules humaines est de 10, notamment à cause d'une grande quantité de microorganismes dans le tractus intestinal (plus de 400 espèces), constituant le microbiote intestinal. D'autres bactéries sont pathogènes et/ou opportunistes d'infections bactériennes pouvant entraîner le décès de l'hôte infecté.

I. Les bactéries¹

I.1. Structures des bactéries

Etant donné le nombre d'espèces existantes, la taxonomie des bactéries est assez complexe.²² Ainsi, seules les souches bactériennes utilisées dans le cadre des travaux de ce manuscrit, à savoir, les genres *Staphylococcus*, *Escherichia* et *Pseudomonas* seront présentées. Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Firmicutes* qui sont des bactéries Gram positif avec un pourcentage en Guanine et Cytosine faible. Les deux genres, *Escherichia* et *Pseudomonas* sont des *Gammaproteobacteria*, des bactéries Gram négatif. La taille et la forme des bactéries diffèrent selon les espèces. *Escherichia* et *Pseudomonas* sont en forme de bâtonnets alors que les *Staphylococci* sont en forme de coques.

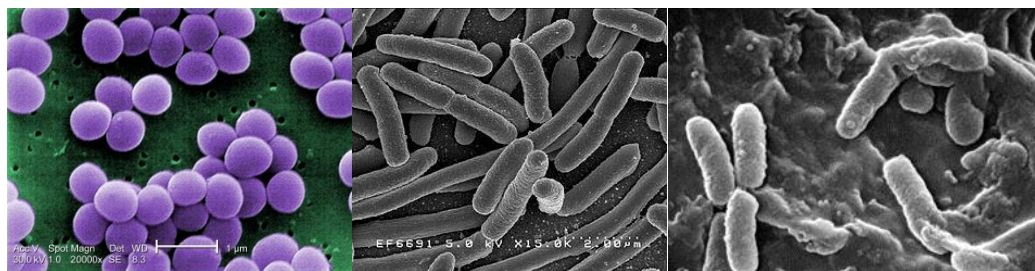


Figure 3. Photos de bactéries au microscope électronique.

A gauche : *Staphylococcus aureus*, Au centre : *Escherichia coli*, A droite : *Pseudomonas aeruginosa*.²³

Ces procaryotes sont délimités par une paroi qui leur donne une forme et les protège des agressions externes telles que les molécules actives ou les pressions osmotiques. En tant qu'actrice de la défense bactérienne, cette paroi sera attentivement décrite dans la partie I.3 (page 9). De façon identique aux cellules eucaryotes, le contenu de la bactérie est appelé cytoplasme. On y retrouve notamment les protéines, les enzymes, les nutriments et toutes les molécules nécessaires à la survie de la bactérie, mais qui peuvent être aussi la cible d'agent antibactérien. L'ADN est sous forme circulaire (généralement unique) et se trouve dans le cytoplasme. Contrairement aux cellules eucaryotes, l'information génétique n'est pas protégée par une deuxième membrane nucléaire. De plus, chez les bactéries, on retrouve des plasmides participant aussi au code génétique. Ce sont des doubles brins complémentaires d'ADN circulaires capables de réplication autonome. Comme pour les cellules eucaryotes, on y retrouve les ribosomes participant à la traduction de l'ADN en protéines. Selon les souches, un flagelle (ou des cils) peut émaner du cytoplasme, permettant la mobilité de la bactérie.

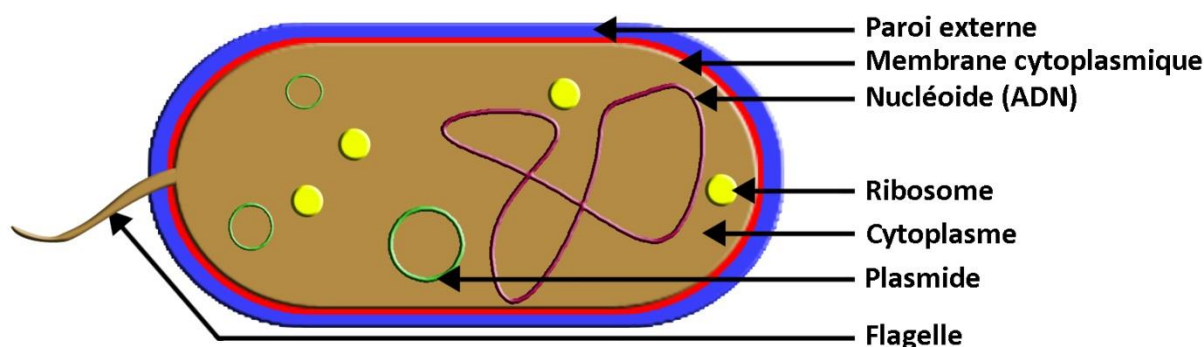


Figure 4. Composition générale d'une bactérie.

D'autres métabolites peuvent être présents au sein d'une bactérie selon la souche. Ces composantes ne seront pas exposées dans cette partie.

1.2. Croissance bactérienne

Les bactéries ont un besoin de nutriments pour la biosynthèse et la conversion énergétique. A l'instar des cellules eucaryotes, l'ATP (adénosine triphosphate) est un élément essentiel pour la croissance bactérienne. Il existe trois grands critères permettant d'établir des classes nutritionnelles : la source de carbone, la source d'énergie et la source d'électrons. Nous pouvons citer par exemple, les chimiotrophes (bactéries dont l'énergie est d'origine chimique) et les phototrophes (énergie d'origine lumineuse). Le facteur de croissance dépend de l'environnement : nutriments, agents antibactériens, température, pH, luminosité, atmosphère, etc. Certains de ces facteurs permettent aussi une classification des bactéries, comme par exemple : les bactéries aérobies (nécessitant une atmosphère riche en oxygène) ou les bactéries anaérobies (plus ou moins intolérantes à l'oxygène, et privilégiant des respirations à base de nitrates).

Les bactéries se multiplient par scissiparité : deux bactéries sont obtenues à partir d'une cellule mère et sont identiques à cette dernière. La croissance bactérienne est souvent représentée graphiquement par une courbe montrant le développement d'une population de bactéries en fonction du temps.

La courbe de croissance comprend 4 phases (Figure 5) :

- La phase de latence : la bactérie s'adapte au milieu de culture en synthétisant les enzymes adaptés aux nutriments du nouveau substrat de culture.
- La phase d'accélération : les bactéries métabolisent les nutriments apportés par le milieu de culture et elles commencent à se diviser.
- La phase exponentielle de croissance (ou croissance exponentielle) : les bactéries se multiplient à grande vitesse.
- La phase de décélération : la croissance ralentit progressivement à cause de la saturation de bactéries ou d'un manque de nutriments.
- La phase stationnaire : Arrivée à une forte concentration, la division bactérienne est stoppée.
- En cas d'appauvrissement prolongé des nutriments, les bactéries sont vouées à la mort cellulaire durant la phase de déclin.

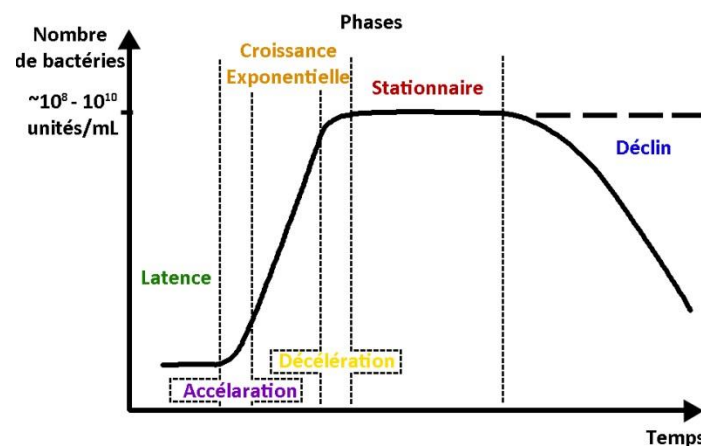


Figure 5. La croissance bactérienne : Nombre de bactéries en fonction du temps

La majorité des bactéries favorisent un mode de vie, dit sessile (état sessile), où les bactéries se trouvent adhérentes sur un support plutôt qu'un mode de vie isolée dans le milieu environnemental (état planctonique). L'attachement sur une surface est une stratégie de survie qui permet à la bactérie de coloniser un environnement. L'état planctonique se réduit alors au passage de la bactérie d'une surface à l'autre. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une structure communautaire appelée « biofilm ». La formation d'un biofilm se déroule 5 étapes (Figure 6) :

- Accroche initiale (1) : les bactéries planctoniques adhèrent à la surface.
- Accroche irréversible (2) : l'adhésion devient irréversible grâce à la production de protéines spécifiques et/ou de la formation de structures telle que les pilis.
- Formation de micro-colonies (3) : les bactéries se multiplient fortement afin de pouvoir sécréter activement le biofilm.
- Maturation du biofilm (4) : La sécrétion de la matrice extracellulaire offre un milieu propice à la croissance bactérienne, et le biofilm devient ainsi macroscopique.
- Propagation du biofilm (5) : Certaines bactéries se séparent du biofilm, à cause de son vieillissement ou de différents stress physiques, et retournent à l'état planctonique. Ces dernières peuvent ainsi coloniser de nouvelles surfaces.

Cette agrégation de bactéries est particulièrement résistante et stable grâce à la matrice composée de polysaccharides, de protéines et glycoprotéines. Il est apparu que les biofilms représentent un problème majeur dans le milieu médical. 65 % des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms qui peuvent se former au niveau de cathéters ou d'implants (valves cardiaques, prothèses...).

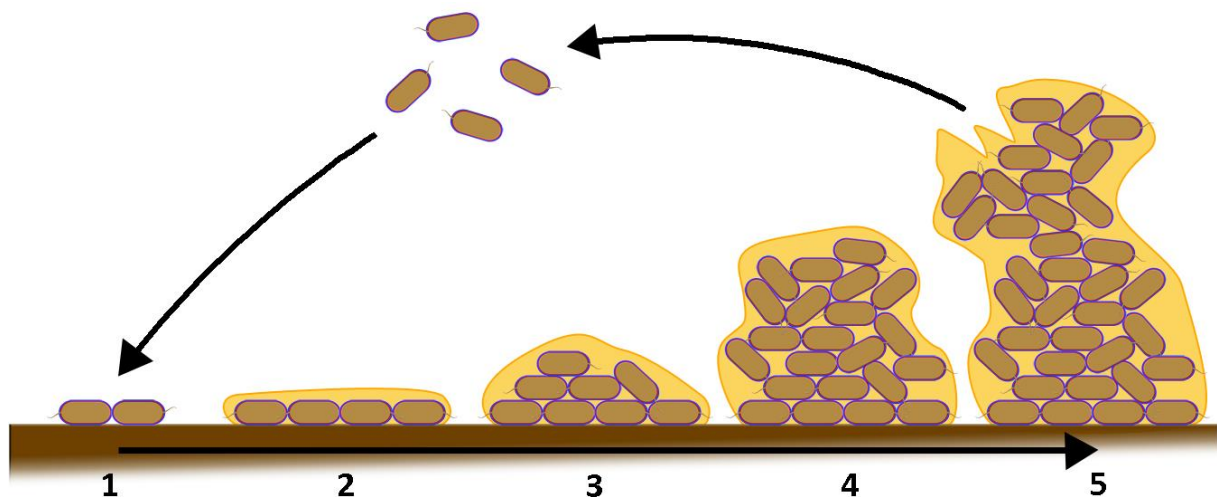


Figure 6. Cycle de formation d'un biofilm.

1.3. Parois bactériennes

Il existe deux types de parois bactériennes : la paroi des bactéries Gram positif et la paroi des bactéries Gram négatif.

1.3.1. Les points communs entre les deux types de paroi.

Les bactéries Gram positif et Gram négatif ont des membranes externes bien différentes et facilement dissociables. Cependant, les 2 types de paroi sont constitués d'une membrane plasmique et de peptidoglycanes.

La membrane plasmique est essentiellement composée de la bicouche phospholipidique, élément présent dans tous types de cellules et dans de nombreux virus. Cette couche est caractérisée par son caractère amphiphile, avec ses têtes hydrophiles orientées vers l'extérieur et ses chaînes lipophiles au centre (Figure 7). Cette membrane est la base de l'intégrité des cellules ou noyaux mais leur composition varie selon les procaryotes et les eucaryotes. On peut remarquer notamment que chez les eucaryotes, il y a la présence de stérols, dont le cholestérol, au sein de la membrane, induisant une charge moins élevée. Pour les bactéries, on y retrouve donc essentiellement les phospholipides (phosphatidylglycérol, cardiolipides ou phosphatidylsérine) et des protéines intrinsèques (permettant le passage de molécules). Par l'abondance des fonctions phosphates et hydroxyles, la membrane plasmique bactérienne est chargée négativement.

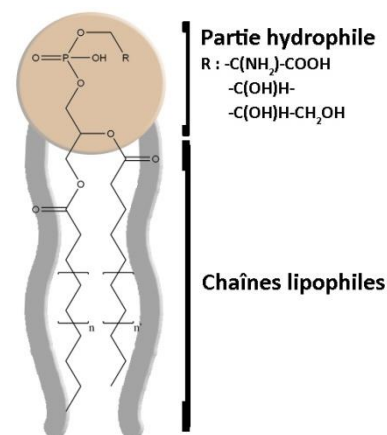


Figure 7. Structure d'un phospholipide.

Le peptidoglycane est constitué de chaînes de glucides (*N*-acétylglucosamine et *N*-acétylmuramique) reliées par des liaisons osidiques et de parties peptidiques sur les monomères muramiques (Figure 8). Les ponts peptidiques sont de 8 acides aminés (2 x 4 acides aminés par monomère) qui peuvent différer. Les bactéries Gram négatif et les bacilles Gram positif ont des peptidoglycanes riches en acide diaminopimelique alors que le reste des bactéries Gram positif est riche en lysine (Lys).²⁴

Le peptidoglycane permet aux bactéries de préserver leur intégrité lors d'agressions (tel que les chocs osmotiques), de réguler la diffusion de molécules et le relargage de fragments de ce polymère participe à la communication intracellulaire.

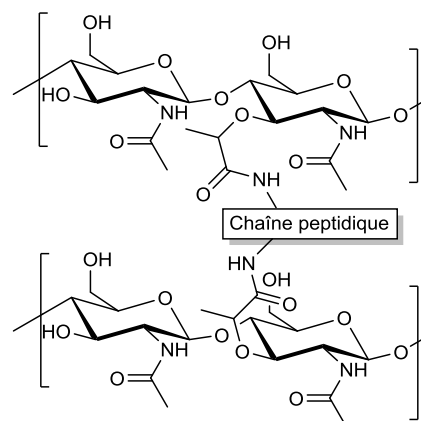


Figure 8. Structure du peptidoglycane.

1.3.2. Paroi des bactéries Gram positif

La paroi des bactéries Gram positif est essentiellement constituée de peptidoglycane (entre 15 et 80 nm d'épaisseur) dans lesquels sont présents des acides téichoïques et lipotéichoïques (Figure 9). Les deux types d'acides téichoïques sont riches en phosphates, glycérols et ribitols. L'acide lipotéichoïque appartient aussi à la membrane plasmique car la partie téichoïque est directement reliée au glycérol du phospholipide. Ils permettent la stabilisation de l'épaisse paroi de peptidoglycane. Cette épaisseur de polymère entraîne une taille conséquente pour les bactéries de cette catégorie. De nouveau, la présence de phosphates et hydroxyles rendent cette membrane Gram positif relativement anionique. L'espace périplasmique permet le stockage de molécules nécessaires (enzymes, nutriments, etc).

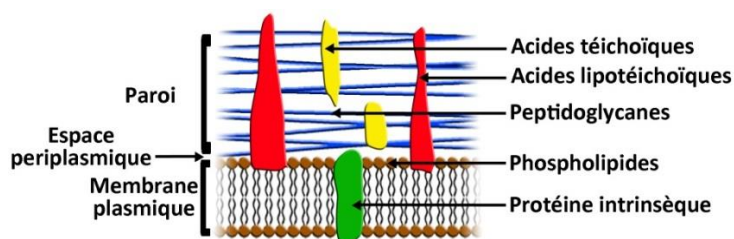


Figure 9. Modélisation d'une paroi bactérienne Gram positif.

Dans la catégorie des bactéries Gram positif, nous retrouvons la famille des *Firmicutes* contenant *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.

1.3.3. Paroi des bactéries Gram négatif

La paroi des bactéries Gram négatif n'a qu'une faible épaisseur de peptidoglycane (Figure 10). Cependant, une deuxième membrane phospholipidique est située à l'extérieur. Sur cette dernière, de nombreux polymères dont le Lipopolysaccharides (LPS), sont greffés. Le LPS est constitué d'une partie lipidique hydrophobe (appelé lipide A) reliée, par un « core », à une chaîne de carbohydrates (aussi appelée chaîne O spécifique ou « O antigen »). Le lipide A est directement inclus dans la membrane phospholipidique à cause de son caractère amphiphile (structure en III.5.4, page 31). Le core et la chaîne O sont essentiellement composés de carbohydrates, parfois phosphatés. Ces chaînes sont de charge négative et doivent être stabilisées par des contre-ions tels que des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les LPS jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance antigénique et offrent un fort caractère anionique à la bactérie. De plus, la lyse de la bactérie permet le relargage de lipides A qui ont un fort pouvoir pathogène, provoquant ainsi des inflammations.

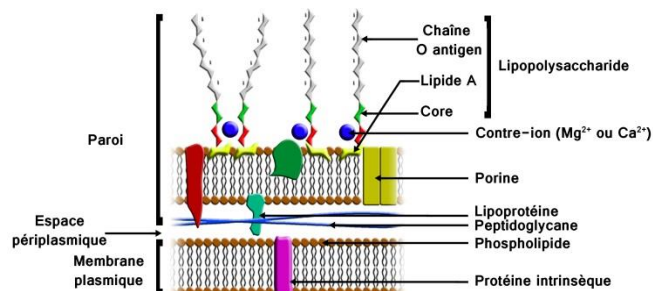


Figure 10. Modélisation d'une membrane bactérienne Gram négatif.

Comme pour les bactéries Gram positif, on retrouve des protéines (intrinsèque et porine) permettant le transport des éléments vitaux pour la cellule. Dans cette structure, les lipoprotéines (de Braun) permettent de relier la bicouche phospholipidique externe et les peptidoglycanes, stabilisant ainsi la paroi. L'espace périplasmique est bien plus volumineux que celui des bactéries Gram positif, permettant un meilleur stockage de nutriments. De plus, cette paroi est bien plus fine et moins compacte (10 nm) que celle des bactéries Gram positif.

La présence d'une deuxième bicouche phospholipidique permet une meilleure résistance face aux agressions extérieures. En effet, certaines souches Gram négatif se sont montrées insensibles à des traitements efficaces sur les bactéries Gram positif.

Les bactéries ont la capacité de s'adapter face aux agressions externes. Le développement d'une résistance peut passer par le changement de la paroi externe comme la création de capsules en polysaccharides ou protéiques (Couche S) autour de la membrane.

1.4. Pathogénèse bactérienne

Certaines souches bactériennes sont pathogènes envers l'Homme. Elles sont responsables d'infections. L'intensité de cette capacité à induire des maladies est appelé « virulence ». La relation hôte-bactérie dépend de la souche microbienne, de sa virulence, de sa résistance, de la quantité d'agents et du système de défense de l'hôte. Elle peut aussi être considérée comme une compétition par rapport aux ressources disponibles. Du point de vue clinique, le patient infecté traverse 4 étapes : la période d'incubation (la bactérie prend conscience du milieu), le stade prodromique (multiplication rapide), période d'état (état malade stable) et la convalescence (disparition de l'agent pathogène). Un patient n'est pas considéré contagieux pendant le premier et le dernier stade.

Du point de vue biologique, la première étape d'une infection consiste en l'adhésion d'un microbe sur un tissu organique. Ensuite, les bactéries se multiplient et se développent allant même jusqu'à pénétrer certaines cellules. En plus de cette colonisation, certains agents produisent des substances toxiques, ou toxines, induisant une cytotoxicité chez les cellules de l'hôte. On distingue les exotoxines, sécrétées par les microbes et les endotoxines, composantes directes des bactéries (comme les LPS). Heureusement, le corps humain possède de nombreuses défenses contre ces infections. La peau et les muqueuses constituent la première barrière empêchant l'intrusion des agents microbiens dans l'organisme. En cas d'intrusion, le système immunitaire inné entraînera une réponse inflammatoire au contact des composantes du « non-soi », comme les peptidoglycanes ou les LPS. Ensuite, il prend en charge l'infection avec l'aide de cellules spécialisées, tels que les phagocytes. Si le microbe persiste, le système immunitaire permettra la création d'anticorps spécifiques à la menace (« antigène »).

Ces infections bactériennes peuvent se produire à différentes parties du corps : infection intestinale, respiratoire (pulmonaire ou angine), cutanée, endocardite, sang (septicémie), etc.

Ces microbes sont répertoriés selon deux grandes catégories :

- Les pathogènes « spécifiques » : cette famille regroupe les agents infectieux qui sont naturellement virulents. Les maladies résultantes les plus connues sont la lèpre (dûe à *Mycobacterium leprae*), la diphtérie (*Corynebacterium diphtheria*), la syphilis (*Treponema pallidum*), le choléra (*Vibrio cholerae*) ou encore la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch).

- Les pathogènes « opportunistes » : ces microbes profitent de la fragilité d'un hôte immunosupprimé pour le contaminer. *Pseudomonas aeruginosa* et les *Staphylococci* présents dans la flore cutanée appartiennent à cette catégorie. Ainsi, ces souches sont particulièrement présentes et dangereuses en milieu hospitalier, car elles induisent des infections dans ces établissements de santé qui sont désignés par le terme « nosocomiales ».

Face à cette pathogénèse, différents traitements ont été élaborés par l'Homme (voir III, page 19). Dans leur processus de reconnaissance du milieu, les bactéries ont mis en place leurs propres mécanismes de résistance.

1.5. Résistance bactérienne

La résistance est l'adaptation du microbe pour se protéger face à une agression extérieure. Ainsi, une souche devenue résistante n'est plus sensible à un effet bactéricide ou à un effet bactériostatique de la part d'agents antimicrobiens. Cette adaptation résulte souvent d'une mutation du génome bactérien ou d'un transfert horizontal. Si le gène de résistance est placé sur un plasmide, ce dernier est appelé plasmide R. La résistance se distingue de l'insensibilité naturelle. En effet, il n'existe aucun traitement ayant la capacité d'entraîner la mort bactérienne de toutes les souches existantes, notamment à cause de leur diversité structurelle. Certains microbes se montrent insensibles à des traitements. De cette notion découle l'expression du spectre d'activité d'une molécule active, qui délimite une catégorie de bactéries où l'efficacité est confirmée. Un produit efficace sur une faible diversité de microbes a un spectre d'activité restreint, contrairement aux traitements à « large spectre » pouvant viser des familles entières. De son côté, l'insensibilité est transmise par héritage génétique puisqu'elle dépend de la souche.

L'adaptation microbienne est la conséquence du processus de croissance et d'interaction des bactéries. Ainsi on estime que ce phénomène de résistance a toujours existé. Depuis l'origine de la vie, les molécules antibactériennes ont été produites par différents organismes, dont des bactéries pour l'amensalisme. Les bactéries productrices ont dû développer des résistances afin de ne pas succomber à leur propre produit. Il y a donc une probabilité que le gène de résistance soit transféré entre la bactérie productrice et la bactérie cible. Des résistances bactériennes ont pu être établies grâce à la « capture » directement chez l'entité productrice.

Différents mécanismes de résistances sont décrits dans la littérature. De manière générale, les bactéries se protègent en limitant leur perméabilité face aux agressions (Figure 11).

- Modification de la membrane : ce mécanisme permet de réduire la consommation de la molécule active par la bactérie en modifiant le récepteur microbien (comme pour la Polymyxine B, voir III.5.5, page 33) ou en changeant le protéome membranaire.
- Production d'enzymes inactivant le produit actif : certaines enzymes sont produites afin de cliver (par exemple les β -lactamases et metallo- β -lactamases MBL) ou afin de modifier la molécule active (phosphotransférases ou adényltransférases des aminoglycosides). Les gènes codant ces enzymes sont souvent d'origine plasmidique.
- Diminution de la concentration intracellulaire par des pompes intramembranaires : ce mécanisme est très courant chez les souches résistantes à de nombreuses substances actives (MDR, Multi-Drug Resistant) car il permet d'expulser ces molécules en dehors de la bactérie. Les genres *Staphylococcus*, *Escherichia* et *Pseudomonas* utilisent ce mécanisme.

- Réduction de la perméabilité bactérienne : Afin de se défendre contre des antibiotiques ayant une activité intracytoplasmique, certaines bactériennes réduisent leur perméabilité en limitant leur nombre de porines ou de transports.

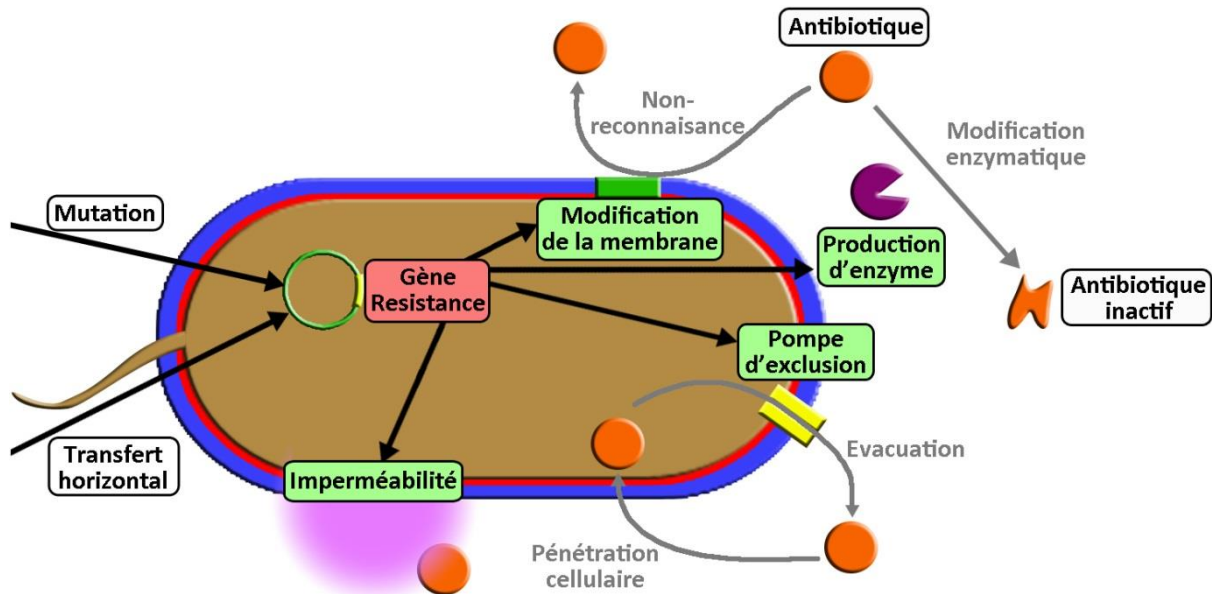


Figure 11. Les différentes voies de la résistance bactérienne.

II. Evolution au cours de l'Histoire

Dans cette partie, nous vous proposons de retracer le cheminement de la Microbiologie²⁵ jusqu'aux dernières actualités, afin de mieux comprendre la place des travaux retranscrits dans ce manuscrit.

II.1. Les prémices de la Microbiologie

Le terme de Microbiologie apparaît au milieu du XIX^{ème} siècle lorsque les maladies infectieuses commencent à être individualisées. De nombreuses maladies, depuis la naissance de l'humanité, ont été décrites avec des caractéristiques similaires aux infections dues à des pathogènes. Hippocrate (460-370 Av J.C) pensait que les épidémies ne pouvaient venir que d'un air corrompu. Durant plusieurs siècles, les maladies infectieuses ont été représentées comme des châtements divins et généralement associées à des péchés. Au cours du XVI^{ème} siècle, Girolamo Frascator (1483-1553), nommeur de la syphilis, écrit un ouvrage (*De contagione et contagionis morbis*, 1546) où la première fois la notion de « germe » apparaît (les « seminaria »). Cependant, il faudra attendre près d'un siècle avant qu'Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723) invente les premiers prototypes de microscopes ce qui permet enfin d'observer les bactéries en 1673. Otto Freiderich Müller (1730-1784) commença la classification de plusieurs bactéries par genre et espèce, durant l'année 1762. Malgré cela, de nombreuses controverses subsistèrent pendant plusieurs décennies, notamment à cause de l'apparition de différentes théories médicales et des solutions proposées contre les infections. Néanmoins, les avancées ont entraîné l'amélioration des conditions hygiéniques en Europe au début du XIX^{ème} siècle. De nombreuses découvertes à cette époque, notamment par Rayer et Davaine, ont ouvert la voie aux travaux de Koch et Pasteur.

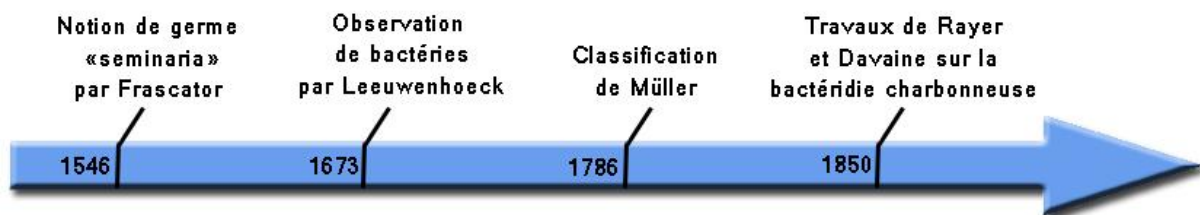


Figure 12. Chronologie des premières avances en Bactériologie.

II.2. La naissance de la Microbiologie

Deux grandes personnalités représentent la naissance de la Microbiologie au cours du XIX^{ème} siècle : Louis Pasteur (1822-1895) et Robert Koch (1843-1910). Louis Pasteur, de formation chimiste, a commencé sa carrière en cristallographie et ensuite a fait sa renommée en biologie et microbiologie.^{26,27,28,29} En effet, son implication en physico-chimie lui permettra d'introduire la stéréochimie et d'aiguiser une conviction intuitive par rapport à l'existence d'organismes vivants au sein des processus de fermentation. Après les observations de Lavoisier (1743-1794) sur la



Figure 13. Louis Pasteur à gauche³² et Robert Koch à droite³³.

conservation de la matière durant les fermentations, ce processus était encore assimilé à une réaction chimique. Entre 1857 et 1865, Pasteur démontra qu'il s'agissait d'un phénomène dû à la présence et à la multiplication d'organismes vivants microscopiques. Ces recherches eurent des grandes répercussions pour l'industrie, notamment par la création de la « pasteurisation ». Après ce succès, Pasteur décida de s'attaquer à la controverse de la génération spontanée, dans laquelle les scientifiques pensaient que les micro-organismes avaient pour origine la désagrégation de la matière organique. Grâce à l'utilisation de ses fameux ballons à col-de-cygne, il montra que les micro-organismes étaient bien des entités à part entière et qu'ils pouvaient être aussi contenus dans l'air. A cause de sa notoriété grandissante, il lui fut demandé de résoudre la crise industrielle de la production de soie où les vers succombaient à une maladie inconnue. C'est véritablement en participant à la résolution de ce problème qu'il dirigea sa carrière vers les maladies infectieuses. A partir de 1876, il s'investit donc dans la recherche de microbes, et découvrit plusieurs pathogènes, tel que le streptocoque en 1879 et le staphylocoque en 1880. Ses recherches sur le bacille du charbon et le « choléra » des poules sont remplies d'exemples de rigueur scientifique et de manipulations inspirantes pour l'époque. C'est au cours de ses dernières qu'il observa le phénomène d'« atténuation de la virulence », ce qui lui permit de développer un prototype de vaccin pour les animaux contre le bacille du charbon. Ce dernier rencontra enfin un grand succès lors d'une expérience avec une visibilité mondiale à Pouilly-le-Fort en mai 1881. Dès 1880, il décida aussi de s'attaquer à la rage. Malgré la technologie insuffisante à l'époque, il affirma qu'il s'agissait d'un « vrai virus ». Après de nombreuses expériences sur les chiens, un vaccin canin a été mis au point. Cependant, il fallut qu'un jeune de berger de 9 ans, mordu sur tout le corps, se porte volontaire pour être enfin testé sur l'Homme en 1885. Le succès de ce vaccin a permis de soigner de nombreuses personnes mordues et la création de l'Institut Pasteur en 1888.

Robert Koch, de formation médicale, se pencha très tôt sur l'étude du bacille du charbon.^{30,31} Au cours de ses recherches, il initia de nombreuses avancées techniques pour la microbiologie. Entouré par Richard J. Petri, il créa la boîte de Pétri composée d'Agar et de nutriments. Ce dispositif est un outil essentiel pour la microbiologie car il permet l'ensemencement, l'isolation et l'évaluation des souches bactériennes. Cette avancée déterminante est encore utilisée de nos jours. Il participa aussi à l'utilisation de colorants pour l'observation des microbes. La suite de sa carrière a été essentiellement centrée sur le choléra et la tuberculine, qui permit de diagnostiquer les stades précoces du développement du bacille tuberculeux. Après des études en Afrique, il fut à l'origine de l'amélioration de l'hygiène et des traitements de l'eau en Europe, notamment en montrant l'implication de l'eau courante dans la transmission des maladies.

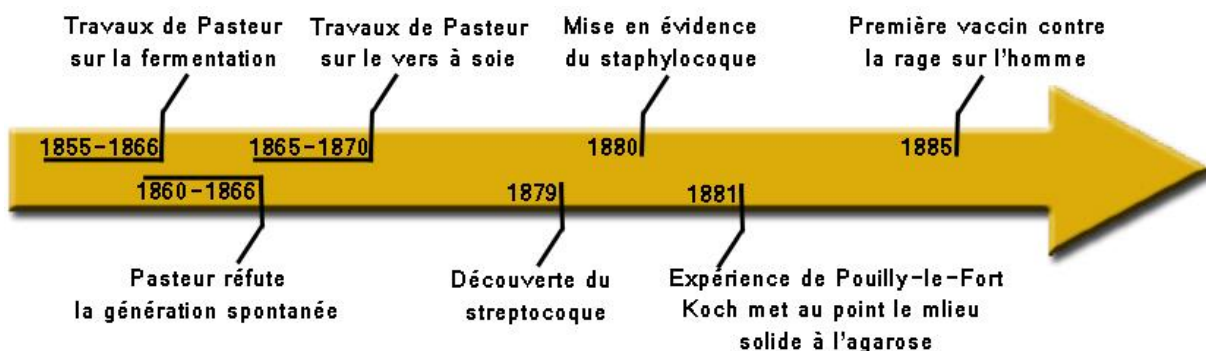


Figure 14. Chronologie des travaux de Pasteur et Koch.

Grâce aux travaux de leurs successeurs, ces deux hommes ont donné naissance à la Microbiologie. Leurs études ont été très complémentaires avec une approche basée sur le contrôle des maladies pour Pasteur et avec le développement d'outils méthodologiques pour Koch. Cependant, ces deux hommes pensaient que les microbes étaient des entités invariables. Cette notion de fixité entraîna quelques conséquences malheureuses, notamment lorsque Koch assura que la tuberculose ne pouvait être transmise du bovin à l'Homme.

II.3. L'expansion rapide de la Bactériologie

Les progrès accomplis durant la fin du XIX^{ème} siècle inciteront différents Etats à investir dans la recherche sur les maladies infectieuses. En France par exemple, les Instituts Pasteurs, ainsi que quelques laboratoires non-pastoriens, vont multiplier les découvertes et avancements dans ce domaine. Nous pouvons citer quelques exemples à travers le monde :

- Au sein du laboratoire de Metchnikoff (créateur du concept de la phagocytose en 1883) à l'Institut Pasteur, Jules Bordet jeta les bases de l'immunité spécifique. Sa carrière scientifique particulièrement féconde en immunologie et bactériologie lui permettra d'obtenir un prix Nobel en 1919.³²
- Après les fondements de la coloration en bactériologie établis par Koch, les chercheurs allemands multiplieront les colorants possibles et favoriseront ainsi le développement industriel allemand. D'après le mythe, un jeune médecin danois Hans Christian Gram (1853-1935) a utilisé par accident une solution iodée de Lugol lors de ses recherches sur le pneumocoque. Cette erreur lui a permis de visualiser une différence de couleur entre différents types de bactérie, et de grouper ces dernières en deux catégories : les bactéries Gram positif (colorées violettes) et les bactéries Gram négative (non colorées). Aujourd'hui, nous savons que ces résultats proviennent d'une différence de paroi bactérienne entre ces deux catégories (voir Chapitre 1.1.3, page 9). La coloration de Gram reste actuellement l'une des méthodes les plus utilisées en Microbiologie.
- Un jeune pédiatre allemand, Theodor Escherich (1857-1911) s'intéressa à la flore intestinale des nourrissons et fit une description détaillée de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacterium coli commune*, renommée *Escherichia coli* en son honneur (deux souches largement utilisées en modèle d'étude).
- Roux³³ et Yersin découvrirent en 1889, une toxine sécrétée par le bacille diphtérique, montrant qu'un pathogène peut produire des toxines. Cette observation a pu être aussi faite dans le cadre du Tétanos. Cette révélation s'accompagna de la découverte d'« antitoxine » qui permit le développement de la sérothérapie et de la diminution de la mortalité de la diphtérie.
- Dès 1898, l'apparition de vaccins utilisant des mélanges de toxines et antitoxines, ou d'anatoxines (toxines perdant sa toxicité dans le formol) permit de soigner de nombreux patients, notamment lors de la Première Guerre Mondiale.

II.4. L'évolution des maladies infectieuses

Depuis l'aube de l'humanité, de nombreux décès ont eu lieu à cause des infections de plaies ouvertes. Cependant, le terme d'« infections nosocomiales » n'est apparu que récemment. Par exemple, l'amputation de membre pouvait entraîner la mort des patients dans 70% des cas, lors de la guerre de 1870. La chirurgie était très limitée à cause des infections et du manque d'anesthésie. Durant les accouchements, la fièvre puerpérale était responsable de la mortalité élevée des

accouchées. Malgré les découvertes à cette époque, le monde médical était très fermé et les avancées furent ralenties par l'opposition de médecins et d'obstétriciens. Nous pouvons citer par exemple, John Snow ou Ignace Semmelweis³⁴, qui malgré les découvertes et la diminution de mortalité due à leurs recommandations, ont été rejetés par le milieu médical. Les longs travaux sur streptocoque et staphylocoque ont enfin permis d'établir une relation entre ces bactéries et les infections à la fin du XIX^{ème} siècle. Inspiré par les travaux de Pasteur, Joseph Lister (1827-1912) sera le premier à utiliser des produits antiseptiques lors d'opérations, ce qui sera le début d'antisepsie. Malheureusement, il restait encore le problème du matériel et personnel contaminé en salle d'opération. Comme cité précédemment, les travaux de Pasteur et de Chamberland ont permis la création de dispositifs pour stériliser les outils : l'autoclave et la pasteurisation. Nous pouvons aussi citer la filtration de John Tyndall, utilisée pour les produits chimiques thermosensibles, ou la « thyndallisation », un procédé de stérilisation par chauffage discontinu. Néanmoins, c'est Chamberland qui inventa en 1884, le premier filtre disponible à base de porcelaine poreuse.

Quant à l'histoire de la vaccination, elle est aussi très liée à celle de la variole et de la variolisation, qui était une technique très utilisée pour développer une réponse immunitaire contre cette maladie en utilisant des fragments de patients déjà atteints. Gaston Ramon, créateur des anatoxines, sera le premier à mettre en lumière le potentiel des adjuvants de l'immunité et de la vaccination associée.

Au début du XX^{ème} siècle, Charles Nicolle mit en avant la variabilité des maladies infectieuses dans le temps et l'espace. Il créa le concept d' « infection inapparente » où un patient pouvait être virulent sans exprimer de symptômes visibles. Ses découvertes ont finalement remis en question la notion d'« inflexibilité des microbes » établie par Koch-Pasteur et seront les prémices de la notion d' « adaptation bactérienne ». A cette époque, la multiplication de nombreuses découvertes en Microbiologie sera accompagnée de multiples tentatives de classifications et d'utilisation de microbes dans divers domaines.

Dans les années 1940, la Microbiologie partagea ses recherches avec d'autres domaines scientifiques tels que la Chimie, la Physique, la Biochimie et surtout la Génétique. En effet, l'hérédité des bactéries était encore mal comprise et supposée fondamentalement différente des cellules eucaryotes par leur absence de noyau. Ce sont les recherches sur les enzymes par les généticiens qui répondront à cette question. Les remarquables travaux de Beadle (1903-1989) et Tatum (1909-1975) sur la biochimie microbienne permettront une meilleure compréhension des métabolites, et inspireront les généticiens qui s'orienteront par la suite vers l'étude des bactéries, pour expliquer les chaînes métaboliques chez les eucaryotes. Ainsi grâce aux travaux sur le code génétique d'*Escherichia coli*, le code a été totalement décrypté en 1966. Cette période a été un tournant dans l'histoire de la Microbiologie, car pour la première fois, les microbes ne sont plus étudiés en tant que source de maladies mais sont maintenant sources de connaissances sur l'ensemble des espèces vivantes. La mise en place de cette interdisciplinarité a permis l'apparition de l'ingénierie génétique et l'utilisation de microbes pour la synthèse de protéine par exemple. Elle est aussi un excellent exemple de l'interdépendance de chaque domaine scientifique. A l'instar de ce manuscrit, il n'est plus concevable de se restreindre à un domaine unique, mais la science se doit de progresser ouvertement.

Jusqu'en 1955, la virologie était indissociable de la bactériologie, même si la présence de « virus filtrants » avait été largement décrite à la fin du XIX^{ème} siècle. L'étude des bactériophages a été considérée comme une opportunité de combattre les microbes infectieux. Malheureusement, cette

idée a été abandonnée avec la chute de l'Union Soviétique en 1991. Avec l'émergence des souches résistantes, cette discipline refait son apparition ces dernières années.

III. Les moyens de lutte contre les infections bactériennes

III.1. Les premiers traitements

Les premiers traitements contre les infections étaient basés sur les croyances populaires et généralement un mélange d'ingrédients d'origine végétale et/ou animale. L'une de ces substances naturelles la plus connue est la quinine (Figure 15)³⁵. Extraite de l'écorce d'un arbre sud-américain (quinquina), elle fut utilisée contre les fièvres pendant trois siècles.^{36,37} Son utilisation courante eut des grosses répercussions sur l'économie, et le développement de sa synthèse permit l'élaboration de colorants, car le « mauve » fut notamment découvert et breveté suite à une tentative de synthèse de quinine par Perkin, en 1856. Nous pouvons aussi citer l'armoise, l'émétine et l'huile de chaulmoogra comme premiers moyens de traitements contre la lèpre notamment.

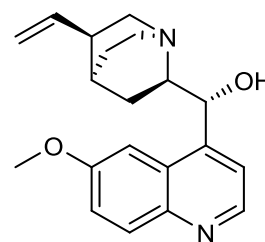


Figure 15. Structure de la quinine.

Depuis l'Antiquité, des métaux, tel que l'arsenic, l'antimoine et le mercure, ont été utilisés contre certaines infections. De nos jours, des médicaments sont élaborés à partir de ces métaux, comme le Pentostam® (Figure 16) et le Glucantime® à base d'antimoine.³⁸

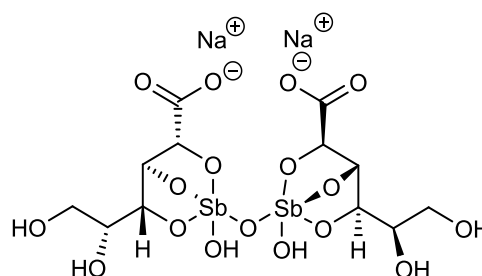


Figure 16. Formule du Pentostam®.

Au début du XXème siècle, deux hommes ont permis la naissance de la chimiothérapie anti-infectieuse : Paul Ehrlich (1854-1915) et Ernest Fourneau (1872-1949). Paul Ehrlich, médecin allemand inspiré par Koch, fut la créateur de la théorie des affinités spécifiques : certaines cellules (ou parties de cellules) auraient des attirances d'ordre chimique qui leur sont propres.³⁹ Cette théorie, aussi appelée « wünder bullet » aura des implications dans différents domaines :

- En 1879, il décrit les leucocytes sanguins selon la coloration de leurs granulations à l'origine de l'hématologie moderne
- Il introduit le concept des « lymphocytes B » avec leurs récepteurs capables d'interagir de façon spécifique avec des pathogènes, les antigènes.
- Lors d'expériences du bleu de méthylène sur un patient atteint de paludisme, il créa le terme de « chimiothérapie » et se lança dans la recherche de substances thérapeutiques

Il découvrit plusieurs substances efficaces, dont le rouge trypan en 1904 (Figure 17). Pour la première fois, pour chacune d'entre elles, une dose thérapeutique minimale et une dose maximale tolérée étaient décrites. Sa théorie d'affinité spécifique a depuis fait ses preuves, et inspire encore de nombreux travaux. Les travaux retranscrits dans ce manuscrit s'inscrivent pleinement dans cette

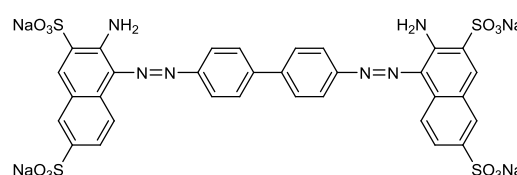


Figure 17. Structure du Rouge Trypan.

théorie, notamment par le principe de vectorisation (voir Chapitre 4, page 102)

Ernest Fourneau, à la demande d'Emile Roux, rejoint l'Institut Pasteur où il dirigea le Laboratoire de Chimie thérapeutique, financé essentiellement par l'industrie dont les Etablissements Rhône-Poulenc. Son équipe élaborait plusieurs médicaments et participa activement à la découverte des sulfamides et des sulfones. Cependant, le précurseur des agents sulfamidés, le « prontosil » a été révélé par un médecin allemand Gerhard Domagk (1895-1964) en 1927 (Figure 18). Son efficacité sur de nombreuses bactéries (dont les streptocoques et les méningocoques) a encouragé la synthèse de nouveaux composés sulfamides. Après l'élucidation du mode d'action par l'américain Donald Woods en 1939, la première démonstration de l'existence d'anti-métaboliques « naturels » était faite. Ce succès stimula les recherches de substances thérapeutiques, permettant la découverte des antibiotiques.

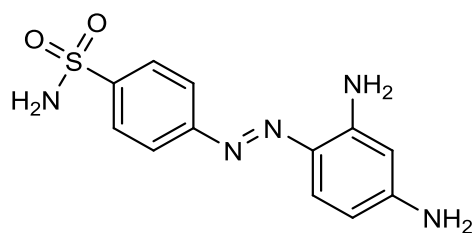


Figure 18. Formule du Prontosil.

III.2. L'âge d'or des antibiotiques

III.2.1. La découverte des antibiotiques

Les antibiotiques sont décrits comme des substances capables de tuer les bactéries (effet bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) et qui sont extraits à partir d'autres organismes. Ils se dissocient d'autres agents antibactériens, tels que les sulfamides et les métaux, considérés comme des « produits chimiques ». Après leur découverte et leur commercialisation, ils peuvent être d'origine naturelle, modifiés chimiquement (semi-synthétique) ou totalement synthétisés.

La découverte du premier antibiotique, la pénicilline par Alexander Fleming (1881-1955), a été faite de façon fortuite.⁴⁰ Fleming, travaillant sur le « lysozyme » (une substance antimicrobienne présente dans le mucus et la salive), laissa des boîtes de culture de staphylocoques sur sa paillasse pendant ses vacances. Un collègue, le mycologue C. J. La Touche, travaillait dans le même laboratoire sur *Penicillium notatum*. Le 3 septembre 1928, à son retour, il observa des moisissures dans ses boîtes dues à *Penicillium notatum* et découvrit que les bactéries n'avaient pas poussées à proximité de ces dernières. Il émit l'hypothèse que ce champignon sécrétait une substance antibactérienne, appelée Pénicilline. Ce genre d'antagonisme avait déjà été préalablement décrit sans suite, notamment par Lister et Tyndall. Pendant dix ans, l'observation de Fleming ne fut pas utilisée car l'antibiotique était instable et difficile à produire. Il fallut attendre les travaux de Chain et Florey en 1938 pour obtenir la cristallisation de la pénicilline. A l'entrée en guerre de l'Europe, la suite des travaux sur l'antibiotique fut transmise aux Etats-Unis d'Amérique, qui permirent la production en masse. Son spectre d'activité comprenait la plupart des bactéries Gram positif, mais la Pénicilline fut surtout reconnue pour son effet sur la syphilis.

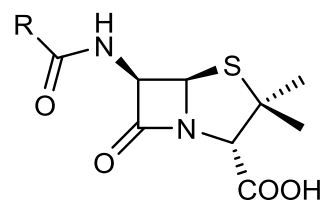


Figure 19. Formule générale des Pénicillines.

Avec cette découverte, la recherche d'antibiotiques passa à une vitesse supérieure. Ces agents sont recherchés à travers le monde et dans tous les types d'organismes possibles. Nous pouvons aussi citer les recherches de Selman A. Waksman (1888-1973) sur les microorganismes telluriques⁴¹, à

l'origine de la découverte de la tyrothricine, la streptothricine et finalement la streptomycine en 1943 (Figure 20). Cette dernière a démontré une efficacité sur les bactéries Gram positif et certaines Gram négatif, insensibles à la pénicilline. Ces deux antibiotiques ouvrirent la voie à la recherche systématique de nouveaux antibiotiques menée à travers le monde. En 1947, la chloromycétine est considérée comme le premier antibiotique à « large spectre » d'activité. Depuis, la recherche de nouveaux antibiotiques se poursuit toujours.

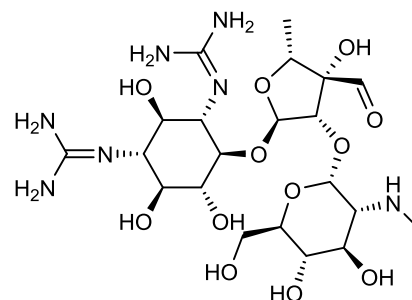


Figure 20. Structure de la streptomycine.

III.2.2. Les grandes familles d'antibiotiques

De nombreux antibiotiques ont été découverts et la plupart ont été regroupées en plusieurs familles :

- Les bêta-lactamines⁴²

Ce sont véritablement les premiers antibiotiques apparus car la pénicilline appartient à cette famille. Ils sont encore largement utilisés en cas d'absence d'allergie à la pénicilline. On y retrouve donc les dérivés de pénicilline, les céphalosporines et les carbapénèmes (utilisés en derniers recours en cas de résistance). Ils peuvent se présenter sous forme seul ou accompagné d'inhibiteur de β -lactamase. Les plus connus d'entre eux actuellement sont l'Amoxicilline et la Cloxacilline (remplaçant de la Mécicilline contre *Staphylococcus aureus*).

- Les cyclines⁴³

C'est une famille d'antibiotiques ciblant directement la synthèse protéique. Elles peuvent être responsables de la photosensibilisation du patient. On y retrouve aussi la minocycline utilisée en dernier recours. On peut citer le Doxycycline.

- Les aminosides⁴⁴

Efficaces sur les bactéries Gram négatif, cette famille n'est utilisable que par injection et engendre de nombreux effets secondaires. Ainsi, ces antibiotiques sont généralement utilisés dans des mélanges avec d'autres, telles que les bêta-lactamines. La Streptomycine et la Gentamicine en font partie.

- Les macrolides⁴⁵

Cette famille de molécules vient en relai lorsque les pénicillines ne peuvent pas être utilisées. Cependant, ils sont susceptibles d'avoir des interactions avec d'autres médicaments. L'Azithromycine, le Clarithromycine et le Roxithromycine en font partie par exemple.

- Les quinolones⁴⁶

Malgré leur large spectre d'activité, ces antibiotiques sont désormais raisonnablement utilisés à cause de l'émergence de souches résistantes. En plus d'être parfois photosensibles, ces molécules peuvent être responsables de tendinites. Le Lévoxfloxacine, le Norfloxacine et le Ciprofloxacine appartiennent à cette famille.

- Les autres antibiotiques

On retrouve différentes molécules comme les sulfamides, les glycopeptides et les polymyxines. La liste de ces antibiotiques est assez floue car certains d'entre eux appartiennent à d'autres familles d'agents tels que les peptides antimicrobiens.

Avec l'émergence de la Microbiologie, certains scientifiques pensaient au cours du XX^{ème} siècle qu'une totale éradication des micro-organismes bactériens serait réalisable dans le futur. En effet, l'efficacité des antibiotiques et leur découverte successive entraînèrent une forte diminution des maladies infectieuses. Cependant, la diversité des micro-organismes et leurs capacités d'évolution ont rapidement fait disparaître cette idée.

III.3. L'apparition des souches résistantes

Malgré un grand nombre de patients sauvés par les antibiotiques, quelques souches résistantes sont apparues et ont été responsables de décès à travers le monde. Ce phénomène nommé « antibiorésistance » s'explique par la capacité d'adaptation des bactéries qui leur permet de s'adapter rapidement aux agressions extérieures, et notamment à l'exposition aux antibiotiques. Très rapidement, la découverte de ces souches résistantes fut observée. En 1946, la première infection résistante à la Pénicilline fut décrite, soit trois ans après l'année d'introduction de cet antibiotique. Ces souches n'inquiétaient pas les médecins de l'époque car de nombreuses alternatives à la Pénicilline apparaissaient très régulièrement.⁴⁷ Cependant avec le temps, la découverte de nouveaux antibiotiques commença à fortement diminuer. A la fin du XX^{ème} siècle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) invita à réduire fortement la consommation excessive de ces agents, notamment dans le secteur alimentaire.⁴⁸

Ce problème d'antibiorésistance est particulièrement présent dans les hôpitaux. Les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (MRSA), découvertes en 1961, sont responsables d'infections pulmonaires, osseuses et de septicémies. La Vancomycine a montré une efficacité contre les MRSA, jusqu'à ce que, à son tour, des souches résistantes à la Vancomycine furent identifiées à partir de 1997. Récemment, la Teixobactine (un nouveau peptide en cours d'essai clinique) et la Lugdunine (peptide issu de *Staphylococcus lugdunensis*), ont été découverts et seraient capables de lutter contre les MRSA.^{49,50} De son côté, *Pseudomonas aeruginosa* est responsable d'infections nosocomiales et se montre de plus en plus résistants aux carbapénèmes.⁵¹ En 2010, l'enzyme MBL est découverte chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* qui la protège contre la plupart des antibiotiques connus.⁵² Une autre bactérie préoccupante est *Escherichia coli*, car sa présence perpétuelle fait de ses variantes résistantes une grande menace. Il arrive que certaines ailes hospitalières soient fermées pour cause d'infections causées par une souche d'*E. coli* résistante. Pour traiter les infections de bactéries résistantes Gram négatif, la colistine (voir III.5, page 28) est utilisée en dernier recours. En 2016, une première souche résistante à la colistine est observée dans un hôpital des Etats-Unis.

En 2013, l'antibiorésistance est responsable de 25 000 morts en Europe et plus de 23 000 morts aux Etats-Unis pour un coût total de 22 milliards de dollars.⁵³ Après diverses campagnes de sensibilisation, l'OMS publie un rapport en 2014 pour avertir du danger imminent de l'antibiorésistance. Il mettra aussi en avant l'ignorance de ce phénomène par la population ce qui engendre une mauvaise utilisation des antibiotiques.⁵⁴ En 2015, un plan d'action est lancé par l'OMS pour informer et réduire la vitesse d'apparition des souches dangereuses. En mai 2016, un économiste anglais Jim O'Neill sortit un rapport dans lequel est inclus une étude estimant que

l'antibiorésistance sera responsable de 10 millions de morts par an en 2050 (à côté de 8,5 millions par an pour le cancer).⁶ L'émergence de ces résistances et la faible quantité d'antibiotiques découverts de nos jours ont fortement affaibli le marché et poussent les centres de recherche à trouver des solutions alternatives, comme les peptides antimicrobiens (AMP).

III.4. Les nouveaux agents antibactériens

A travers le monde, plusieurs chercheurs se penchent sur le problème des souches résistantes.⁵⁵ Les recherches sur l'utilisation de bactériophages ont été relancées face à cette nouvelle menace. Ce sont des virus d'origine naturelle qui infectent uniquement les bactéries et se multiplient en utilisant les métabolites bactériens (Figure 21). Une fois, l'hôte microbien infecté, les bactériophages entraînent la lyse de la bactérie ou un cycle lysogénique qui peut conduire aussi à la destruction de la bactérie en cas de stress ou de dommage cellulaire. Ces virus sont donc des prédateurs naturels très spécifiques à certaines bactéries ce qui en fait des armes très intéressantes dans le cas d'infection. Malheureusement, leur capacité de cibler des souches bien particulières est aussi leur défaut, car le spectre d'activité d'un bactériophage est très réduit et il est donc nécessaire d'identifier la souche infectieuse avant tout traitement. Néanmoins, cette technique présente de nombreux avantages, comme la facilité de production des bactériophages et leur efficacité sur les biofilms bactériens. A l'heure actuelle, la recherche continue pour résoudre les problèmes cliniques majeurs, qui sont l'inflammation et la réponse immunitaire entraînée par les bactériophages chez les patients. Malgré de très bons résultats en phase clinique II sur *Pseudomonas aeruginosa*, le problème de la réponse immunitaire des patients, atténuant fortement l'efficacité du bactériophage, persiste. Alors qu'un mélange de bactériophages (« phage cocktail ») permet de réduire le problème de la sélectivité, les chercheurs travaillent sur l'encapsulation de ces virus pour limiter la réaction immunitaire des patients. La résistance bactérienne face aux bactériophages est très rare et mal connue car les virus ont eux-mêmes la capacité d'évoluer pour surpasser l'adaptation de leur cible. En plus de l'effet bactéricide que présente cette technique, elle peut aussi permettre d'inclure des gènes dans des bactéries. Ainsi, la modification génétique de souches pourrait de nouveau les rendre sensibles à certains antibiotiques.^{56,57}

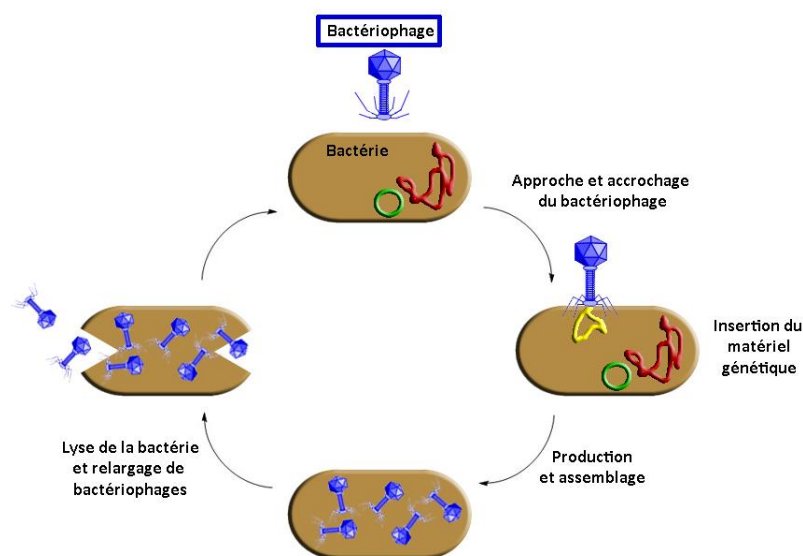


Figure 21. Cycle lytique d'un bactériophage.

Les endolysines sont des enzymes produites par les bactériophages qui clivent la membrane bactérienne. Ces protéines sont aussi considérées comme une alternative aux antibiotiques car elles ont montré une excellente efficacité sur les bactéries Gram positif. Ces enzymes permettent la rupture de liaisons incluses dans les peptidoglycanes et sont classées selon leur ciblage sur ce polymère. A cause de la présence d'une deuxième membrane externe, elles sont malheureusement inactives sur les bactéries Gram négatif. Ces enzymes ont les mêmes avantages et inconvénients que les bactériophages, mais cette fois aucune résistance face à ces protéines n'a pu être observée. Leur action directe sur la paroi bactérienne semble les conserver de toute adaptation et d'autant plus qu'un mélange de lysine accentue leur efficacité. De même, leur combinaison avec la gentamicine et la pénicilline a montré un effet synergique sur *Streptococcus pneumoniae*.⁵⁸ Les lysines semblent être ainsi une solution prometteuse contre les souches bactériennes résistantes Gram positif comme MRSA.⁵⁹

Nous pouvons aussi citer d'autres domaines de recherche tels que la radioimmunothérapie, la vaccination (avec l'apparition des nouveaux vaccins ADN⁶⁰) ou la thérapie photodynamique antimicrobienne (Chapitre 2, page 34). Dans le cadre de ce rapport, nous allons traiter essentiellement l'une des dernières alternatives : les peptides antimicrobiens (AMP).⁶¹ Ces derniers sont des peptides composés de moins de 50 acides aminés et pouvant induire un effet bactériostatique ou bactéricide. Ils sont naturellement synthétisés par tout type d'organisme vivant et jouent un rôle important dans leur système immunitaire. Leur composition en acides aminés les différencie des antibiotiques.⁶² Les AMP ont plusieurs fonctions :

- Stimulation du système immunitaire aux sites infectieux
- Neutralisation des LPS libérés par les bactéries Gram négatif
- Accélération de la réparation tissulaire
- Stimulation de l'angiogenèse
- Participation à la réponse immunitaire spécifique
- Effet bactéricide ou bactériostatique.

Ces peptides, utilisés depuis des millions d'années par les organismes pour se défendre contre les bactéries, ne sont que faiblement soumis à la résistance bactérienne.

III.4.1. Découvertes des AMP et leur utilisation

Le lysozyme découvert en 1929 par A. Flemming est un peptide antimicrobien, mais avec l'émergence des antibiotiques, les peptides antibactériens seront peu étudiés dans la première moitié du XXème siècle. En effet, la découverte de la Gramicidine et de la Tyrocidine en 1942 fut ignorée à cause de leur toxicité.⁶³ En 1947, les Polymyxines sont découvertes.⁶⁴ Des travaux de Skarnes et Watson, publiés en 1957⁶⁵, décrivent la présence d'activité antimicrobienne dans les cellules sanguines et les fluides chez l'Homme. A partir des années 1970, la découverte d'AMP s'accroît notamment avec les travaux sur les amphibiens par Erspamer.⁶⁶ La décennie suivante fut riche en découverte d'AMP, dont les Défensines par Selsted⁶⁷ et les Magainines.⁶⁸ De nos jours, plus de 2700 AMP ont été découverts et répertoriés.⁶⁹ En plus d'avoir des spectres d'activité intéressants, ces peptides ont montré une efficacité sur les biofilms et un effet synergique avec certains antibiotiques.⁶² Cependant les chercheurs se sont rapidement aperçus que les AMP étaient la cible de protéases réduisant leur activité et rendant leur conservation difficile. De plus, des effets secondaires pour le patient peuvent apparaître en cas de surdosage.⁷⁰ Pour résoudre ces problèmes, la recherche

continue et des propositions voient le jour, comme l'encapsulation des AMP ou des modifications chimiques afin d'éviter l'action des protéases.⁷¹

Pour certains AMP, une utilisation systémique pour une efficacité généralisée demanderait de fortes doses, pouvant entraîner une néphrotoxicité pour le patient. La plupart d'entre eux sont encore en phase d'essai clinique⁷². Les Polymyxines et la Daptomycine sont les plus connus des AMP autorisés. La Daptomycine est un lipopeptide anionique prescrit contre les infections dûes aux bactéries Gram positif (*Staphylococcus* ou *Enterococcus* par exemple). Ce peptide est formulé sous le nom de Cubicin® et peut être injecté par voie intraveineuse.⁷³

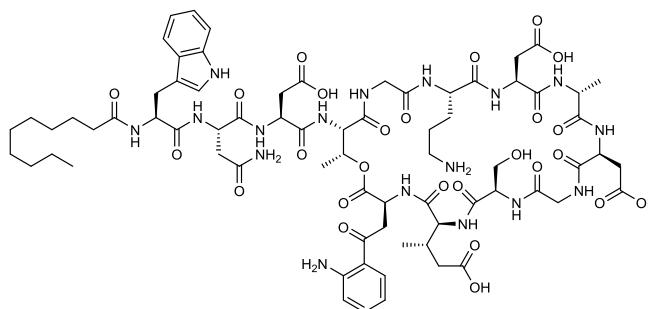


Figure 22. Formule de la Daptomycine.

III.4.2. Particularités et classification

Ces molécules sont considérées comme des peptides car la plupart d'entre eux possèdent moins de 50 acides aminés. Ces peptides sont décrits à travers plusieurs étapes structurales : la structure primaire décrit la succession des AA avec les deux extrémités N-terminal et C-terminal. La structure secondaire regroupe deux types de formes : l'hélice α et le feuillet β . Enfin, la structure tertiaire correspond au repliement du peptide, stabilisé par différents types de liaison (liaison hydrogène, ionique, Van der Waals, pont disulfure). Comme la plupart des protéines, la configuration spatiale des AMP joue un rôle important dans leur mode de fonctionnement. En effet, un changement de structure tertiaire ou secondaire, suite à la dénaturation du peptide, peut entraîner la perte de son efficacité. De plus, l'une des particularités des AMP est un caractère amphipathique : leur structure est composée d'une partie hydrophile (AA en majorité cationiques ou rarement anioniques) et d'une autre hydrophobe (chaîne lipophile ou AA neutres). La structure en hélice α permet au peptide d'avoir deux régions bien distinctes en hydrophobie. C'est pourquoi cette organisation spatiale est particulièrement importante pour son activité.

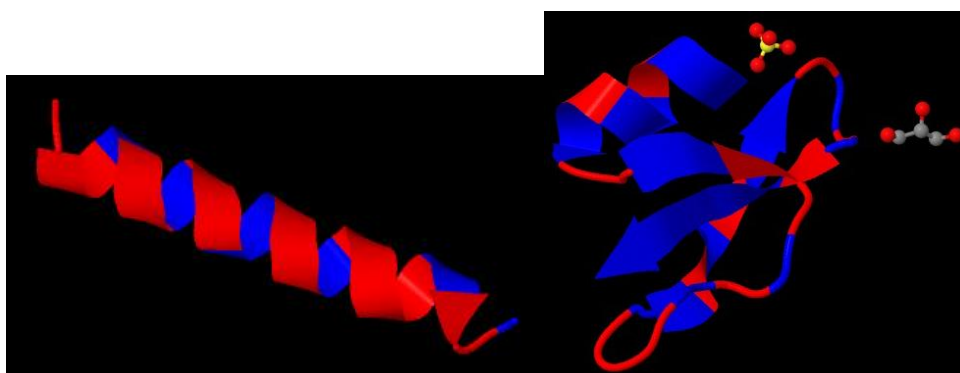


Figure 23. Représentation 3D de A) la margainine 2 (en hélice α) et B) Défensine β humaine (avec les feuillets β en son centre). Les couleurs indiquent l'hydrophobie : Rouge pour hydrophile et bleu pour hydrophobe, d'après le Protein Data Bank.

La classification des AMP est relativement complexe. En effet, aucune nomenclature universelle n'existe actuellement car leur diversité et leur nombre rendent la tâche difficile. Néanmoins,

plusieurs types de classification ont pu émerger. La première était une organisation par famille dont nous pouvons citer les Défensines, les Cathélicidines, les Histatines, les Cécropines et les Magainines. Cependant, cette classification ne répondant pas à la diversité des AMP, d'autres furent adaptées. De nos jours, ces derniers peuvent être répertoriés de la façon suivante :

- Les AMP ayant une structure secondaire en hélice α au contact de membrane
- Ceux très enrichis en un acide aminé (proline, arginine, phénylalanine, etc)
- Ceux ayant une structure tertiaire stabilisée par des ponts disulfures (présence de cystéines)
- Les AMP non-cationiques

Les trois premières catégories regroupent les peptides antimicrobiens cationiques, qui nous intéressent particulièrement. Les AMP peuvent être aussi classés simplement selon leur structure secondaire (peptide en hélice α , feuillet β avec ponts disulfures, hélice α au contact de membrane, avec coude). Certains peptides sont aussi regroupés en sous-famille comme les bactériocines incluant les lantibiotiques (comme la nisine et lacticine).

III.4.3. Modes d'action

Les AMP ont généralement un spectre d'activité assez large. De nombreuses études ont été menées afin de relier la structure d'un peptide et son activité antibactérienne. Ces dernières montrent que chaque AMP a un spectre d'activité bien spécifique dépendant de plusieurs paramètres : la charge, la structure et le caractère amphiphile. Le mode d'action se déroule ainsi selon cet ordre :

- L'interaction ionique (Figure 24) :

Le caractère cationique des AMP leur offre une affinité naturelle pour les membranes bactériennes, qui sont essentiellement anioniques. En effet, les parties hydrophiles de ces peptides sont attirées par certaines composantes des membranes bactériennes telles que les acides téichoïques chez les bactéries Gram positif et les LPS chez les bactéries Gram négatif. De plus, les parties lipophiles ont aussi des interactions pour les chaînes alcanes comprises au sein de la membrane plasmique. S'agissant d'interactions ioniques élémentaires, il est difficile pour les bactéries de développer des résistances.⁷⁴ Les cellules eucaryotes ont de leur côté des membranes riches en phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyéline, cholestérol et ergostérol. Ces composantes différentes de la membrane bactérienne, confèrent un caractère neutre aux cellules eucaryotes. Ainsi, les AMP ont bien plus d'interactions pour les bactéries que pour les cellules eucaryotes. Ce phénomène est donc le fondement de leur spécificité. Cependant, en cas de trop forte concentration en peptides, ces derniers agissent quand même sur les cellules eucaryotes et peuvent avoir une activité hémolytique.⁷⁵ Après cette interaction, l'AMP peut agir selon deux façons sur la bactérie : soit en permettant la perméabilisation de la membrane soit en intervenant au niveau intracellulaire.

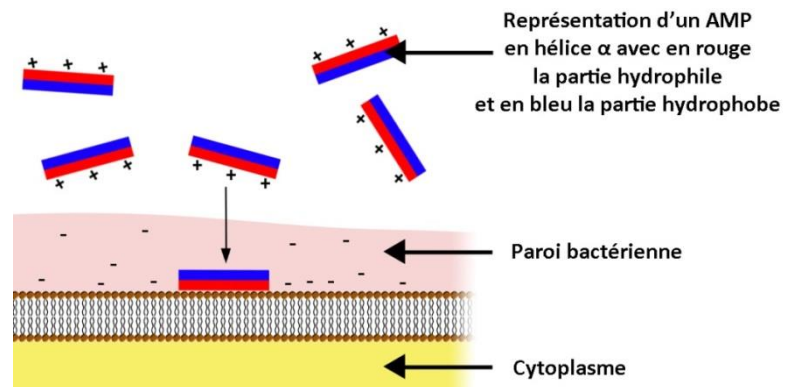


Figure 24. Interaction entre les AMP et la paroi bactérienne.

- Perméabilisation de la membrane bactérienne (Figure 25) :

Le processus le plus commun induisant la lyse bactérienne par les AMP est la perméabilisation de la paroi bactérienne. En effet, une fois au contact de cette dernière, les peptides créent des pores en s'introduisant dans la structure ce qui entraînera par la suite, la mort de la bactérie. Il existe 4 grands mécanismes de création d'ouverture dans la paroi. Le premier mécanisme est le modèle « barrel stave » (ou douve de tonneau), et consiste dans l'introduction d'un cylindre formé par les peptides, directement dans la membrane plasmique. Plusieurs peptides en hélice α s'assemblent à la surface bactérienne et modifient leur conformation de façon très similaire aux phospholipides. Une fois introduit dans la membrane, le « tonneau » s'agrandit au fur à mesure, entraînant la diffusion des peptides dans le cytoplasme, la fuite d'éléments cytosoliques à cause du gradient de concentration, résultant en la mort cellulaire.⁷⁶ Dans le deuxième modèle « aggregate », les peptides s'insèrent dans la membrane par le biais des interactions lipophiles, de façon mal organisée. Ce mauvais équilibre n'étant pas stable, les peptides peuvent ressortir de l'autre côté de la membrane sans altérer cette dernière.⁷⁷ Le troisième modèle « toroidal pore » repose sur le même principe sauf qu'ici les AMP s'insèrent perpendiculairement en gardant leur interaction pour les têtes hydrophiles des phospholipides. Il y a déformation de la membrane et création d'un pore mince.⁷⁸ Enfin dans le dernier modèle « carpet » (ou en tapis), le peptide est uniquement au contact des têtes hydrophiles des phospholipides. A forte concentration, les AMP recouvrent la totalité des parties hydrophiles, ce qui provoque l'effondrement de la membrane, tel un effet détergent, et laisse le contenu intracellulaire s'échapper.⁷⁹ La diversité des mécanismes des AMP rend l'adaptation microbienne compliquée. De manière générale, l'activité d'un peptide antimicrobien ne peut pas être attribuée à un seul mode d'action. En effet, il est admis que la perméabilisation de la paroi semble être insuffisante pour entraîner un effet bactéricide efficace et rapide.⁸⁰

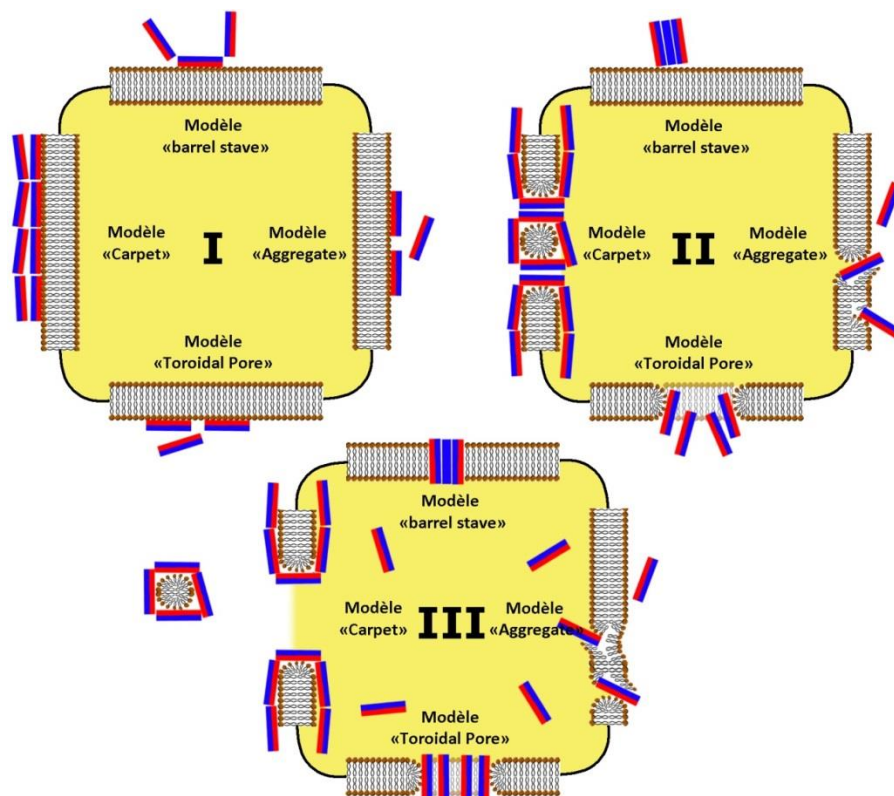


Figure 25. Les différents modèles de perméabilisation de la membrane bactérienne par les AMP.

- Inhibition des fonctions intracellulaires :

Certains AMP ont montré une efficacité à une faible concentration. Cette activité a été expliquée par l'accumulation de ces peptides au sein des bactéries, inhibant certaines étapes vitales à la survie de celle-ci. Leur implication dans ces processus vitaux sont très variables selon le peptide : blocage de la traduction (buforin II, pleurocidin et dermaseptin), arrêt la synthèse protéique (indolicidin et PR-39), empêchement des réarrangements protéiques (pyrrhocorin), inhibition d'enzymes anioniques et blocage de la synthèse de peptidoglycane (nisin et mersacidin)^{62,55}. De plus, certains peptides (comme les polymyxines) ont montré une capacité à induire la production d'espèces radicalaires de l'oxygène, endommageant l'ADN, les membranes et la mitochondrie (voir Chapitre 2.II.2). Ainsi, les AMP peuvent entraîner la mort bactérienne par de nombreux mécanismes. Cette multitude de possibilités et leur interaction ionique font des AMP des agents antibactériens pour lesquels le développement de résistances s'avère compliqué mais pas impossible.⁸¹

III.4.4. Résistance aux AMP

Pendant plusieurs années, la résistance aux AMP semblait improbable à cause de l'interaction élémentaire avec des composantes essentielles bactériennes. Cependant, une étude en 2003 a révélé une série de mutations chez une souche de *Staphylococcus aureus* entraînant l'incorporation de nombreux acides aminés (D-alanine et L-Lysine) dans sa paroi externe. La modification de la paroi a fortement réduit la charge anionique de cette dernière, allant jusqu'à la répulsion des AMP cationiques et donc entraînant leur inactivité.⁸² Un procédé similaire a été ensuite décrit chez des souches Gram négatif où des fragments d'acide gras (ou d'acide mycolique) ont été inclus dans les LPS.

Malheureusement, d'autres mécanismes ont été décrits par la suite permettant à certaines souches bactériennes de survivre face aux AMP⁸³ :

- Modification du lipide A : l'introduction de 4-aminoarabinose (un carbohydrate cationique) ou l'acétylation entraîne une perte de la charge négative du lipide A
- Changement protéique : L'augmentation en protéine M1 (protéine membranaire) permet de bloquer les AMP à la surface de la paroi. La production de protéines extracellulaires chez *Pseudomonas aeruginosa* et chez *Staphylococcus aureus* bloque l'activité des Défensines.
- Régulation des flux : La présence de pompe d'efflux permet d'évacuer les AMP avant leur activité dans le cytoplasme.

Ces résistances sont rares et la recherche de nouveaux AMP continue à travers le monde. Nous pouvons citer la découverte du peptide « Kn2-7 » dans le venin d'un scorpion, qui a montré un spectre d'activité contre certaines souches résistantes.⁸⁴ Voyant en ces peptides une véritable alternative aux antibiotiques, certains laboratoires travaillent sur la modification chimique des AMP afin de combler les quelques problèmes et afin d'obtenir une solution innovante contre les bactéries. Cette thèse basée autour de la Polymyxin B s'inscrit dans ces recherches.

III.5. Les Polymyxines

Les polymyxines sont des lipopeptides cationiques découverts entre 1940 et 1950, naturellement produits par la bactérie Gram positif *Paenibacillus polymyxa*. Ces AMP ont un effet bactéricide très rapide sur les bactéries Gram négatif mais très peu d'entre eux ont un effet sur les bactéries Gram positif.

III.5.1. Structure des polymyxines

Ces peptides sont regroupés en plusieurs familles dont les plus connus sont : Polymyxine B (PMB), E (colistine) et M (mattachine). Leur structure générale est composée d'une chaîne latérale hydrophobe reliée à 3 acides aminés (AA n°1 à 3), et d'une tête cyclique hydrophile comprenant 7 acides aminés (AA n°4 à 10). La cyclisation de cette partie hydrophile se fait entre l'AA 4 et 10. Dans la structure primaire, on y retrouve les acides aminés : Diaminobutyrique (*L*-Dab), Thréonine (*L*-Thr), Leucine (*L*-Leu et *D*-Leu) et Phénylalanine (*D*-Phe). Ces peptides possèdent 6 *L*-Dab, un AA appartenant au protéome bactérien et comportant une amine primaire. Les acides aminés n° 6 et 7 déterminent la famille de la polymyxine. La chaîne latérale peut aussi varier (entre 7 et 9 carbones ramifiés ou linéaires) et les structures sont répertoriées de 1 à 4 (par exemple B₁ à B₄). Au final, les polymyxines B et E sont les peptides les plus répandus. De plus, ils sont généralement composés d'un mélange comprenant les 2 premières chaînes latérales (B₁-B₂ et E₁-E₂). La polymyxine B se trouve commercialement sous forme de sel de sulfate alors que la colistine présente un sel de méthanesulfonate de sodium.

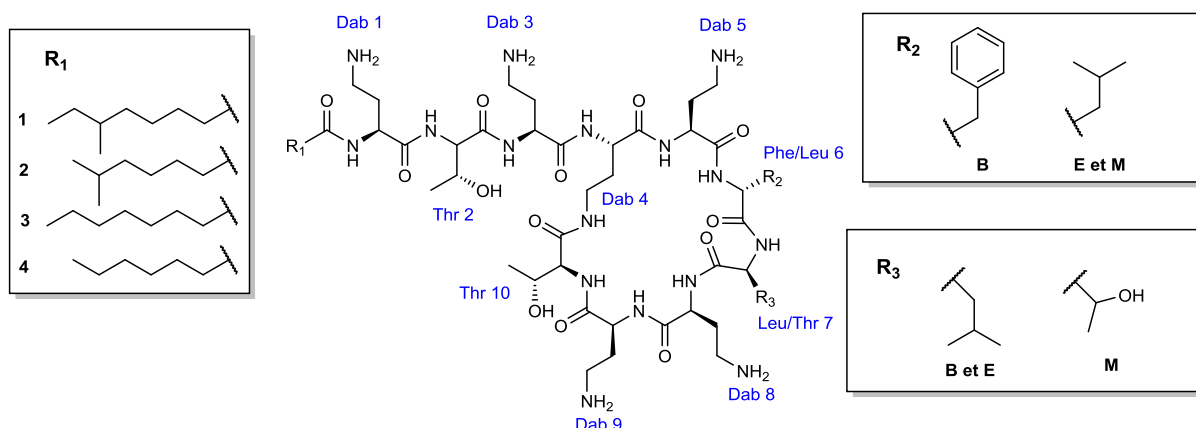


Figure 26. Structure générale des polymyxines

On retrouve le caractère amphiphile dans la structure de ces peptides. Les polymyxines ont une partie hydrophobe (chaîne alcane) et une partie hydrophile cationique. En effet, à pH physiologique (pH=7,4), les *L*-Dab sont protonés, ce qui permet aux polymyxines d'être polycationiques.

III.5.2. Utilisation des polymyxines

Après leur découverte, la PMB et la colistine furent introduits cliniquement à la fin des années 1950. En effet, leur efficacité et leur rapidité d'action contre les infections par des bactéries Gram négatif semblaient très prometteuses. Cependant, les essais cliniques ont rapidement montré des effets secondaires néphrologiques et neurologiques chez les patients sous polymyxines. Leur utilisation fut donc fortement déconseillée et même abandonnée pendant l'âge d'or des antibiotiques. En effet, les carbapénèmes pouvaient encore traiter les souches résistantes aux aminosides. A partir de 1990, les polymyxines deviennent l'ultime traitement fonctionnel avec l'émergence des souches multi-résistantes (MDR) telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*. Elles se retrouvent dans différentes formulations prescrites pour le traitement d'infections pulmonaires, cutanées ou urinaires dues aux bactéries Gram négatif⁷³. En février 2016, un article traite d'un nouveau mécanisme de résistance à la colistine par un procédé plasmidique nommée « MCR-1 » (voir III.5.5, page 33). La souche résistance fut découverte au sein

de porcs voués à la consommation alimentaire en Chine. Cette découverte est préoccupante car la résistance d'origine plasmidique facilite le transfert horizontal des gènes. De plus, la Chine est un pays très consommateur de colistine pour sa production alimentaire.⁸⁵ Malgré la découverte de la première souche résistante en milieu hospitalier en 2016, les polymyxines restent pour l'instant le dernier recours en cas d'infection par des bactéries Gram négatif. Afin de limiter l'apparition de nouvelles souches résistantes, des mélanges contenant des polymyxines avec des antibiotiques sont conseillés car l'effet synergique de ces formulations permet un bon traitement des infections tout en limitant l'exposition aux polymyxines. Nous pouvons citer par exemple des compositions à base de polymyxine et de rifampicine (famille des macrolides).⁸⁶

III.5.3. Relation Structure - Activité

Comme la plupart des AMP, le caractère amphiphile des polymyxines est le fondement de leur efficacité sur les bactéries. Néanmoins, l'utilisation des polymyxines est minimisée car la néphrotoxicité est un réel problème. De plus, le processus de détérioration des reins par les polymyxines est mal connu.¹⁸ Ainsi, de nombreuses études ont été réalisées afin d'obtenir des dérivés de polymyxines moins toxiques et toujours aussi bactéricides en approfondissant la relation « structure – activité ». La littérature est assez divergente sur les causes de la néphrotoxicité, ainsi on retrouve des travaux sur les deux parties des polymyxines. Ces projets sont assez complexes car il n'est pas exclu que l'efficacité antimicrobienne de ces peptides soit « proportionnelle » à son activité sur les reins.

- Modification de la chaîne alcane :

Dans un premier temps, la modification de la longueur de la chaîne hydrophobe a permis d'observer des changements sur l'efficacité des dérivés de polymyxines. Chez la colistine, les longues chaînes (9 à 14 carbones) ont donné des résultats assez hétérogènes alors que chez la PMB, la longueur optimale est de 8 atomes de carbone car les autres dérivés ont montré des pertes d'activité antibactérienne.^{87,88} Le remplacement de l'alcane par d'autres fonctions insaturées ont finalement permis de réduire la toxicité et d'améliorer l'effet antibactérien.⁸⁹ De plus en plus de dérivés font leur apparition mais aucun d'entre eux n'est actuellement utilisé au niveau clinique. Seul le dérivé « CB-182,204 » atteint la phase d'essai clinique I (sans suite connue) (Figure 27).⁹⁰

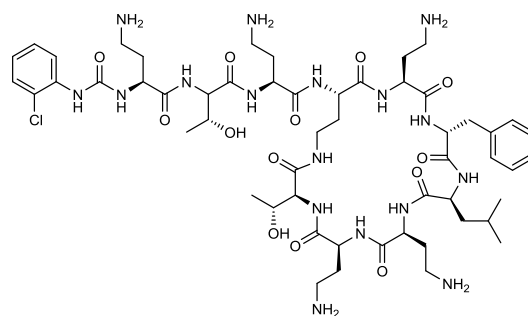


Figure 27. Formule de "CB-182,204". Dérivé de polymyxine (synthétisé par Cubist Pharmaceuticals).

- Modifications peptidiques :

La substitution de certains acides aminés *L*-Dab, par des groupements benzyls, a permis de modifier le spectre d'activité des polymyxines et d'obtenir une efficacité sur certaines bactéries Gram positif.⁹¹ De manière générale, la diminution de la charge cationique réduit l'attraction des polymyxines pour les LPS des Gram négatif, mais cette dernière souvent entraîne une efficacité émergente sur les bactéries Gram positif. Inversement, l'augmentation de la charge avec des couplages de fonctions cationiques sur les *L*-Dab a permis d'obtenir des dérivés encore plus efficaces sur les bactéries Gram négatif.⁹² Un « alanine-scanning » (remplacements successifs de chaque acide aminé par une alanine) a permis de déterminer que les *L*-

Dab appartenant à la partie cyclique sont indispensables pour l'activité antimicrobienne contrairement aux deux *L*-Dab de la chaîne latérale.⁹³ De nombreuses études ont montré que la modification des deux acides aminés hydrophobes n° 6 et 7 (Phe ou Leu) entraînait immédiatement une perte d'activité antimicrobienne.⁸⁷

III.5.4. Mécanisme d'action des polymyxines

Les polymyxines sont responsables d'un effet bactéricide expliqué par la littérature selon trois modèles :

- Rupture de la membrane :

Comme tous les AMP, ces peptides permettent une perméabilisation de la paroi bactérienne, entraînant ici la lyse de la cellule. Les polymyxines, par leur structure riche en *L*-Dab et leur caractère polycationique, ont une forte interaction pour les LPS des bactéries Gram négatif. L'introduction des polymyxines entre les LPS entraîne le relargage des contre-ions (Ca^{2+} et Mg^{2+}) qui stabilisent la couche externe. Une chélation de ces ions est important dans le processus de rupture de la membrane car des études ont montré que la colistine perdait son activité sur *P.aeruginosa* dans un milieu riche en calcium.⁹⁴ L'affinité est encore plus forte pour le lipide A car la partie hydrophobe des polymyxines s'associe aux acides gras membranaires (Figure 28).

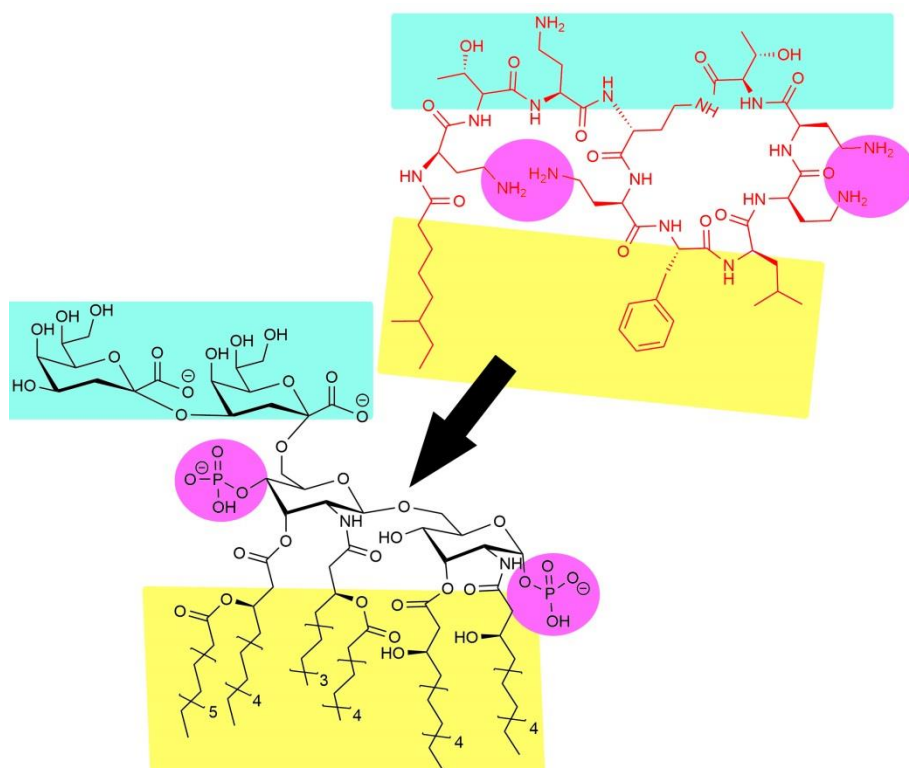


Figure 28. Complexation de la PMB (en rouge) avec un lipide A (en noir). La conformation de la PMB permet de retrouver une structure similaire au lipide A avec la partie hydrophobe (en jaune) et la tête hydrophile (en bleu).

Le complexe polymyxine-lipide A déstabilise la paroi membranaire pouvant laisser passer des peptides, qui à leur tour interagissent avec les phospholipides pour dénaturer la membrane cytoplasmique. La déstabilisation des membranes phospholipidiques est reconnue pour être le mécanisme principal des polymyxines.¹⁹

- Le contact « Vesicle - Vesicle » :

Un autre mécanisme de déstabilisation membranaire est proposé dans la littérature : le contact « Vesicle - Vesicle ». Ce modèle est basé sur la jonction des deux membranes phospholipidiques entraînée par les polymyxines. Après le passage de ces peptides dans l'espace périplasmique, les polymyxines interagissent avec les deux membranes phospholipidiques. Ces dernières se rapprochent jusqu'à une mise en contact et un échange de phospholipides. Les transferts de composants cellulaires entre les membranes entraînent la perte de la spécificité puis un choc osmotique induisant la mort cellulaire.^{95,96}

- Production d'espèce radicalaire :

Les polymyxines ont montré une capacité de productions d'espèce radicalaires cytotoxiques. Ces dernières appartiennent aux « Reactive Oxygen Species » ou ROS (voir Chapitre 2.II.2) tels que le superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , et le radical hydroxyle $HO^\cdot$. Une fois introduites dans le cytoplasme, les polymyxines produisent des ions superoxydes convertis en peroxyde d'hydrogène catalysé par l'enzyme superoxide dismutase (SOD). L'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} par H_2O_2 relâche des radicaux hydroxyles selon la réaction de Fenton. Ces espèces ont de fortes activités oxydatives sur l'ADN, les protéines et lipides ce qui entraîne la mort cellulaire. Ce phénomène est notamment amplifié par la régénération des clusters fer-soufre qui permettent la régénération du Fe^{2+} .^{97,98} L'inhibition des ROS a montré une perte significative de l'effet bactéricide des polymyxines contre *Acinetobacter baumannii*.⁹⁹ Cependant, ce modèle ne semble pas être responsable de l'effet sur *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui est cohérent avec d'autres études montrant la capacité de cette souche à se défendre contre certains ROS.^{100,101} Ce mécanisme est relativement récent et nécessite encore des études approfondies.

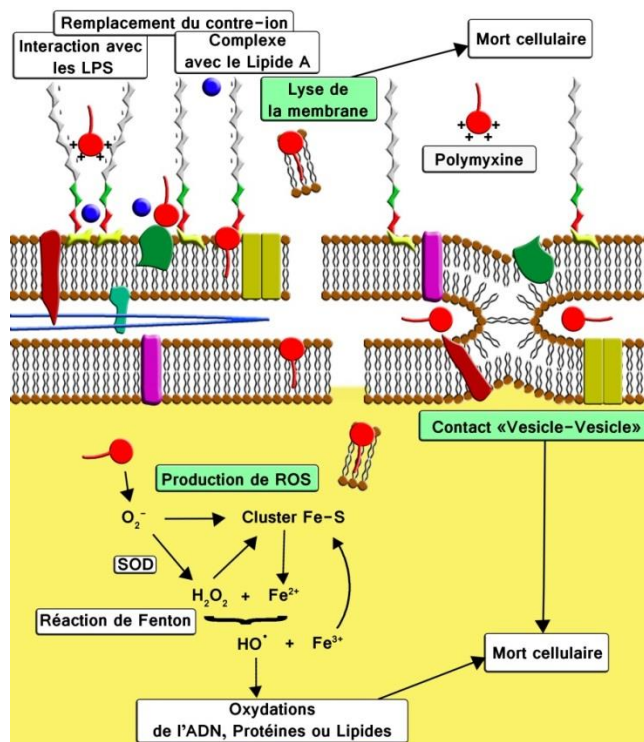


Figure 29. Modes d'action des polymyxines.

Même si l'avis général est de considérer les polymyxines comme un moyen de rompre la paroi bactérienne Gram négatif, des mécanismes alternatifs sont régulièrement proposés et diffèrent selon les souches. Ces peptides participeraient aussi à l'inhibition de protéine membranaire (comme NADH-2, une protéine oxydoreductase vital).¹⁰²

III.5.5. Résistances aux polymyxines

De la même façon que pour les antibiotiques et les AMP, les bactéries ont su muter pour devenir résistantes aux traitements à base de polymyxines, et notamment de colistine. L'étape clé pour l'efficacité des polymyxines sur les bactéries Gram négatif réside dans l'interaction avec les LPS et plus particulièrement avec le lipide A. Ainsi, le mécanisme de résistance le plus rencontré est la modification de la charge anionique des LPS, notamment par le greffage de phosphoethanolamine (pEtN) ou de 4-aminoarabinose (Ara4N) (Figure 30). La modification de la paroi bactérienne est régie par le système de régulation « PhoP-PhoQ ».^{103,104} Via une succession de réactions protéiques, ce système entraînera la modification de la charge des LPS, grâce au greffage de pEtN/Ara4N (par le gène MCR-1 par exemple) ou à la réduction du nombre de groupe phosphates. L'absence totale de LPS chez une souche *A. baumannii* rend cette dernière insensible à la colistine.¹⁰⁵

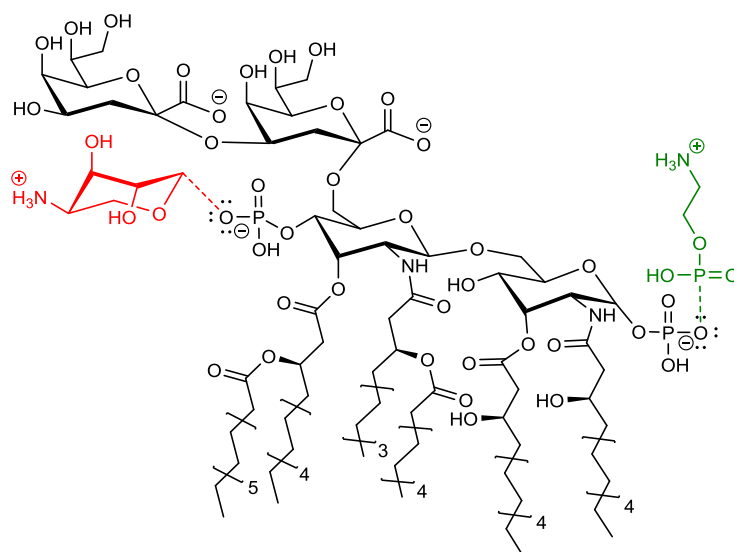


Figure 30. Modification du lipide A (en noir) par le couplage de Ara4N (rouge) ou de pEtN (en vert) chez *E.coli*.

De manière plus spécifique, certaines souches ont développé leur propre mécanisme de résistance. Les pompes d'efflux sont très utilisées chez les souches MDR, comme la « MexAB-OprM » chez *P.aeruginosa*¹⁰⁶ ou la « AcrAB » chez *K.pneumoniae*¹⁰⁷ et *E.coli*¹⁰⁸. D'autres protéines membranaires, telles que « OprH » chez *P.aeruginosa*¹⁰⁹ ou « OmpA » chez *K.pneumoniae*¹¹⁰, permettent de stabiliser la paroi bactérienne rendant les polymyxines moins efficaces.

Nous pouvons aussi noter la production de capsules polysaccharidiques qui, par leur caractère anionique, diminue la quantité de polymyxines libres à la surface membranaire.¹¹¹ Malgré l'observation de ces résistances, les cas restent rares et les polymyxines sont encore un choix intéressant dans le domaine des infections bactériennes. De plus, les chercheurs travaillent encore sur la compréhension de l'activité antimicrobienne des polymyxines qui semblent différer selon les souches.

Chapitre 2 : La thérapie photodynamique

Au cours de ce chapitre nous allons nous intéresser à la thérapie photodynamique (PDT), et plus particulièrement à l'alternative antimicrobienne (aPDT)

I. Définition de la thérapie photodynamique

La PDT est une technique nécessitant la présence simultanée de trois éléments : une molécule ayant des propriétés photophysiques particulières (appelée photosensibilisateur ou « PS »), une source lumineuse et de l'oxygène. L'association de ces trois éléments entraîne la création d'entités cytotoxiques à proximité du photosensibilisateur : les espèces réactives de l'oxygène ou « ROS ». Ce terme regroupe plusieurs molécules possédant un fort potentiel oxydatif responsable de la cytotoxicité. La PDT anticancéreuse a pour objectif de produire ces ROS à proximité des cellules tumorales afin d'induire leur mort cellulaire. La production de ROS doit être effectuée au contact des cibles (par la vectorisation du PS ou par une illumination délimitée aux tumeurs), car ces ROS sont cytotoxiques pour tout type d'organismes, incluant les cellules saines. La lumière utilisée dépend du spectre d'absorption du PS. Cette technique est déjà utilisée dans certains centres hospitaliers dans le monde¹¹²⁻¹¹⁴, et s'est révélée être très complémentaire des autres types de traitements, dans le cas de cancer facilement accessibles par une source lumineuse.

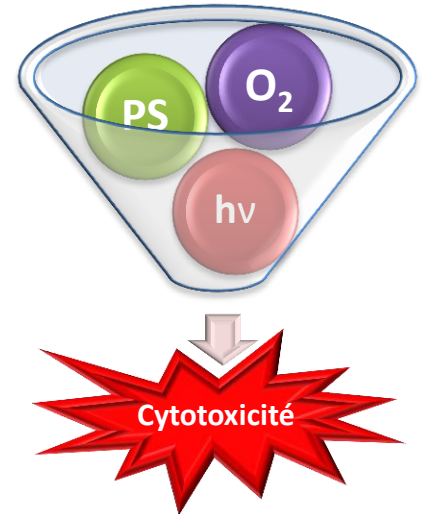


Figure 31. Les trois composantes obligatoires pour le fonctionnement de la PDT.

I.1. Applications cliniques

Après l'administration du PS et un délai de temps, les zones tumorales sont éclairées avec une lumière appropriée. L'illumination de cette zone entraîne la mort des cellules cancéreuses via la génération des ROS.¹¹⁵ Le mécanisme de la PDT est basé sur l'absorption de photons par le PS. Dans le cadre d'applications cliniques, les constituants du corps humain rentrent en compétition avec cette absorption. En effet, un large spectre de la lumière est absorbé par différents composants du corps humain, tel que l'eau, l'hémoglobine, la mélanine, etc (Figure 32).¹¹⁶

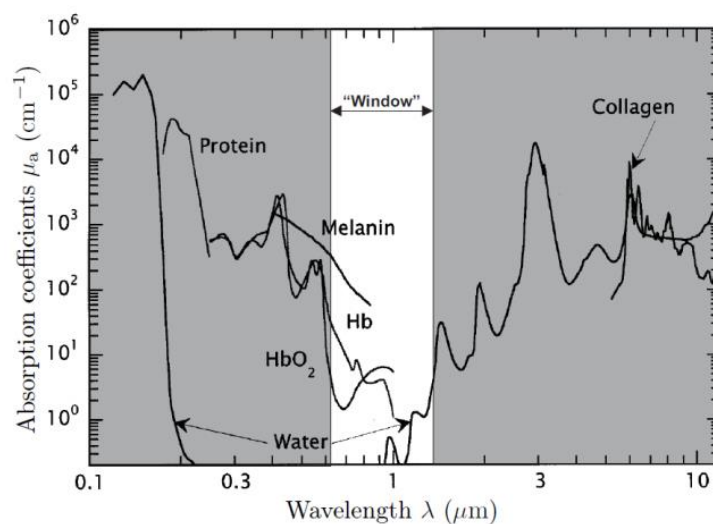


Figure 32. Spectres d'absorption des protéines, de la mélanine, du collagène (protéine fibreuse qui constitue les tissus), de l'eau, de l'hémoglobine désoxygénée (Hb) et de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂) selon Vogel et al.¹¹⁶

Cette compétition d'absorbance entre le PS et le corps du patient permet d'établir la notion de « fenêtre thérapeutique », dans laquelle, l'absorbance des composantes humaines (dont l'eau) est minimale et le l'irradiation du PS est maximale. Cependant cet intervalle, situé entre 650 nm et 1100 nm, correspond à une lumière rouge (et infrarouge) qui peut parfois endommager des tissus sains dans le traitement de certains cancers.¹¹⁷ Ainsi, à l'heure actuelle, la PDT n'offre pas de protocole général pour le traitement des tumeurs mais le choix du PS et de la lumière dépendent de la localisation du cancer (par exemple, la lumière verte est utilisée pour les cancers de l'œsophage, alors que la lumière bleue sert pour les applications en dermatologie)

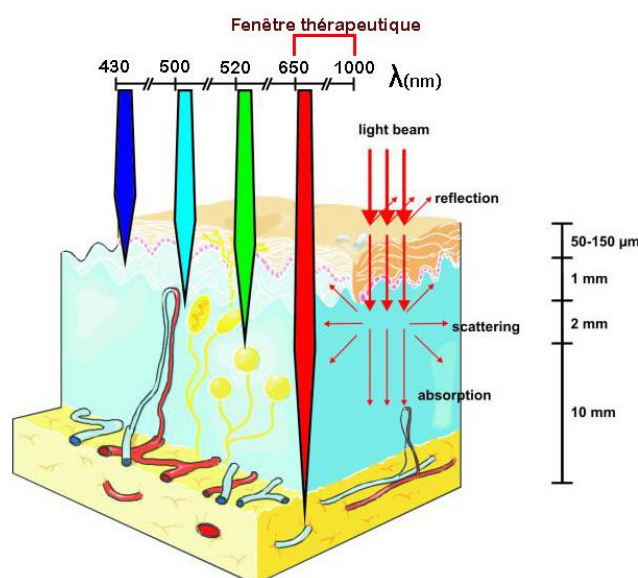


Figure 33. Propagation de la lumière à travers les différentes couches de l'épiderme humain.¹¹⁸

Dans le cadre de tumeurs cutanées, le PS est directement appliqué sur la zone à traiter. Une série d'irradiation lumineuse sur cette zone permet de réduire le nombre de cellules cancéreuses et de venir à bout de la tumeur. Pour ces traitements, une lumière ayant une longueur d'onde plus faible peut être suffisante car le cancer est situé en surface. Nous pouvons citer par exemple, le Levulan® (5-acide aminolévulinique ou « 5-ALA ») avec l'utilisation d'une lumière bleue indiquée contre les kératoses actiniques (lésions pré-cancéreuses).¹¹⁹ En dermatologie, cette technique est utilisée pour éliminer certaines souches bactériennes.

1.2. La thérapie photodynamique antimicrobienne

Le principe de la PDT est basé sur la production de ROS, or ces espèces sont cytotoxiques pour les cellules, les bactéries, les virus, les parasites, etc. Ainsi la thérapie photodynamique antimicrobienne (aPDT) a pour objectif d'induire la mort bactérienne. Avec l'apparition des souches multi-résistantes aux antibiotiques, cette technique suscite un intérêt croissant au XXI^{ème} siècle. En plus d'avoir montré une inactivation photodynamique (PDI) des bactéries multi-résistantes, aucune souche n'a actuellement été capable de développer une résistance contre les ROS générés après illumination.¹²⁰ De nos jours, de nombreuses recherches basées sur cette technique sont menées afin de résoudre les problèmes causés par les bactéries infectieuses. Des surfaces photobactéricides ont été élaborées et feront l'objet du chapitre 5 (page 152). L'application la plus étudiée concerne les infections localisées chez des patients. L'apport d'une source lumineuse nécessaire à l'aPDT est en adéquation avec ce type d'infection, car l'effet cytotoxique sera délimité par la lumière et il ne

pourra pas se reprendre dans le système sanguin du patient. De même que pour la PDT, le problème majeur de l'aPDT réside dans la sélectivité des cellules : l'effet cytotoxique doit cibler uniquement les bactéries. La vectorisation et la sélectivité du PS sont donc des points importants (Chapitre 2.III.3.1, page 63).

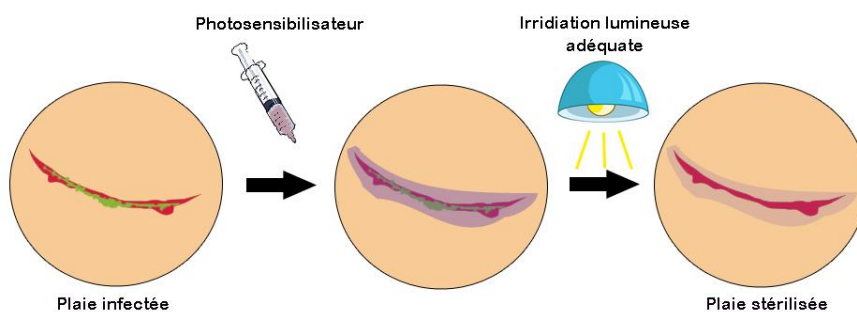


Figure 34. Protocole théorique de la stérilisation d'une plaie infectée, par l'aPDT.

Cette technique pourrait venir à bout de nombreuses maladies d'origine bactérienne, telles que les infections nosocomiales, ainsi que les ulcères de peau et gastriques par *Helicobacter pylori*.¹²¹ Actuellement, seuls les traitements acnéiques et odontologiques sont mis en place. L'acné est une maladie de peau partiellement causée par la présence de *Propionibacterium acnes* au sein des glandes sébacées. Les traitements les plus communs sont des formulations bactéricides à appliquer localement. A partir des années 1990, une thérapie basée sur l'illumination de la peau par des lasers, a permis d'inactiver les souches responsables de ce type d'infection. Cet effet bactéricide était dû à la production de ROS au sein de *P.acnes* qui accumule naturellement des PS (de type porphyrine). Ensuite, un traitement basé sur l'ALA (ou le méthyl aminolévulinate « MAL ») a été utilisé car ce précurseur augmente la quantité de PS au sein des cellules. Depuis l'année 2000, l'ALA-PDT est reconnu comme un traitement spécifique et efficace contre l'acné, malgré sa douloureuse application.^{122,123} Des traitements thérapeutiques photodynamiques ont aussi été développés contre les parodontites chroniques. A cause de l'inflammation due à un biofilm bactérien, cette infection est responsable de la perte de dents chez l'adulte. Le biofilm est constitué d'une centaine de souches différentes et il est généralement retiré de façon mécanique. L'utilisation du bleu de méthylène (Chapitre 2.III.1.2, page 42) comme photosensibilisateur, accompagné d'une lumière rouge (~670 nm), a permis d'améliorer la stérilisation de ces infections dont le nettoyage mécanique était insuffisant. En Europe, la combinaison du bleu de Toluidine (dérivé du bleu de méthylène) et d'une lumière rouge est autorisée pour le traitement des parodontites et la stérilisation des plaies dentaires (Figure 35).^{121,124}

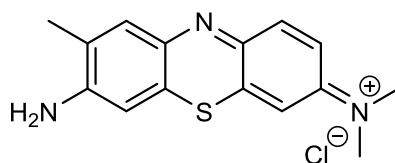


Figure 35. Structure du bleu de Toluidine.

II. Mécanismes photophysiques

Afin de mieux comprendre les avantages et les enjeux de la PDT, nous allons nous intéresser aux mécanismes de la création des ROS basée sur un phénomène photophysique.

II.1. Production de ROS

Comme expliqué précédemment, la production des espèces cytotoxiques nécessite la présence simultanée de trois éléments : un PS, de l'oxygène et de la lumière. Le photosensibilisateur à son état normal est caractérisé par une paire d'électrons dont la somme des spins est de 0. Cette configuration correspond à l'état singulet (^1PS) et tous les électrons occupent les orbitales les plus faibles en énergie (état fondamental PS_0) (Figure 36). Lorsque la molécule est éclairée par une source de lumière, elle peut absorber un photon qui lui fait quitter son état fondamental pour un niveau d'énergie plus élevé, correspondant à un état excité ($^1\text{PS}_n$). Par des conversions internes (CI), comme des relaxations vibrationnelles, le PS descend à son niveau d'excitation le plus bas ($^1\text{PS}_1$). Afin de retrouver son état fondamental, il peut dégager ce surplus d'énergie soit par une désactivation non radiative ou soit par émission de fluorescence. Cependant, à partir de son état excité ($^1\text{PS}_1$), une conversion intersystème (CIS) peut entraîner une inversion de spin ce qui engendre l'état triplet du PS ($^3\text{PS}_1$). Le retour à l'état fondamental s'effectue par une désactivation non radiative ou par la phosphorescence, suivant une inversion de spin qui est une transition dite interdite. La durée de vie à l'état triplet est plus longue (quelque μs) que l'état singulet (quelque ns) ce qui permet les interactions avec l'environnement dont l'oxygène, selon deux type de réactions (I et II).

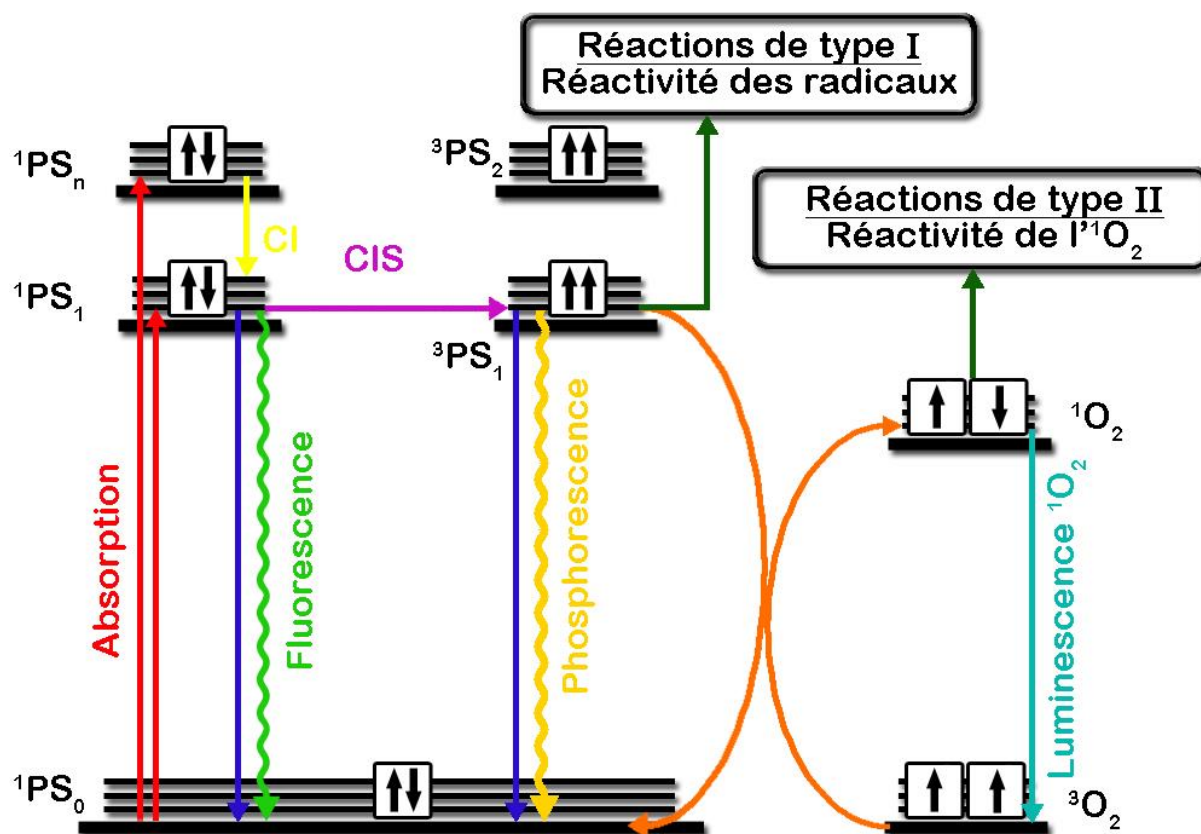
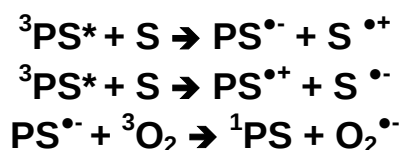


Figure 36. Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski du processus photophysique de la création des ROS par un PS sous une irradiation lumineuse adéquate et en présence de dioxygène.¹²⁵

Ces échanges sont responsables de la production de ROS selon deux catégories de procédés.

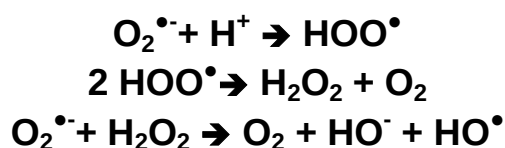
II.1.1. Réactions de type I

Cette catégorie regroupe les espèces radicalaires libres produites suite aux transferts entre l'état triplet du ($^3\text{PS}_1$) et des substrats biologiques (S) selon les équations suivantes (Équation 1) :



Équation 1. Réactions primaires de composés photosensibles.¹²⁶

Ces réactions sont des étapes préliminaires à la formation d'autres ROS. L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) attire un proton pour former le radical hydroperoxyde ($\text{HOO}^\bullet$) qui s'associe en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier réagit avec l'anion superoxyde pour former l'anion hydroxyde (HO^-) et le radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) selon la réaction de Haber-Weiss (Équation 2).



Équation 2. Réactions photochimiques de l'oxygène.¹²⁶

II.1.2. Réactions de type II

Alors que les réactions de type I sont basées sur un transfert d'électron ou d'hydrogène (matière), celles de type II consiste en un transfert d'énergie. Elles nécessitent la présence de dioxygène à proximité du PS. Lorsque ce dernier est à l'état triplet $^3\text{PS}_1$, son énergie peut être transférée au dioxygène ($^3\text{O}_2$) afin de retrouver son état fondamental $^1\text{PS}_0$, selon l'équation suivante (Équation 3) :



Équation 3. Réaction du transfert énergétique entre le PS et O_2 .

Etant donné les orbitales moléculaires de dioxygène, son état fondamental est composé de deux électrons célibataires dans sa couche externe (HOMO). Il est donc à l'état triplet et son passage à l'état singulet $^1\text{O}_2$ nécessite au moins un apport énergétique de 94 kJ.mol^{-1} .¹²⁷ Comme l'énergie transférée dépend du PS à son état triplet, la voie de production des ROS (entre les réactions de type I et II) varie selon le PS utilisé. Ainsi, il est possible de définir une des caractéristiques des PS : le rendement quantique de production d'oxygène singulet Φ_Δ , introduit selon l'équation :

$$\Phi_\Delta = \frac{\text{Quantité d'oxygène singulet formés}}{\text{Quantité de photons absorbés}}$$

Équation 4. Formule du rendement quantique de production d'oxygène singulet sur une même durée.

Ce rendement dépend de plusieurs facteurs tels que la température et l'environnement du PS.¹²⁸ Ainsi il se calcule rarement directement mais il est souvent obtenu en le comparant à une référence dont le rendement est déjà connu dans les mêmes conditions.

La présence d'oxygène singulet peut être observée par spectroscopie. En 1933, J.W. Ellis et H.O. Kneser ont observé deux formes de l'oxygène singulet, qui ont été prédits par R. Mulliken.¹²⁹ Ces deux états sont nommés $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g$ (Figure 37).

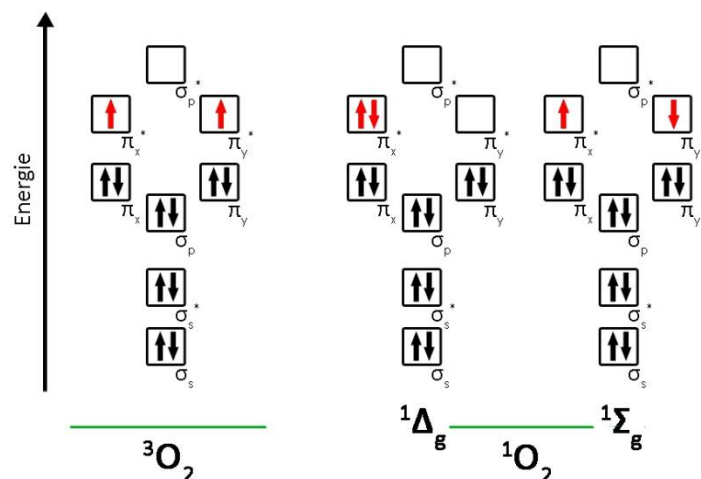


Figure 37. Orbitales moléculaires des différents états du dioxygène.

Ces différents états offrent plusieurs transitions, dont l'une d'entre elle ($^1\Delta_g$ à 3O_2) émet une onde située à 1269 nm. Cette relaxation est ainsi visible par spectroscopie et témoigne de la présence de l'oxygène singulet (Figure 38).

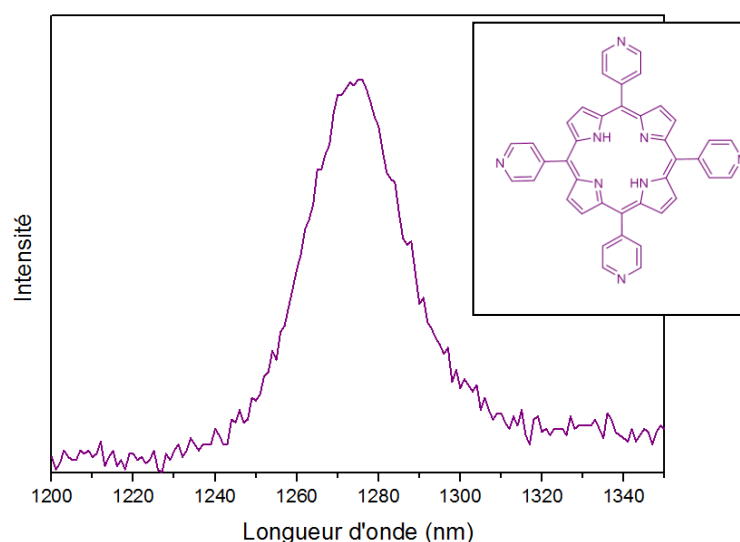


Figure 38. Emission d'oxygène singulet produit par l'excitation de la 5,10,15,20-tetra(pyridyl)-21H,23H-porphyrine dans l'éthanol.¹³⁰

L'oxygène singulet n'a pas une durée de vie très longue. Les états $^1\Sigma_g$ (entre 10^{-11} et 10^{-9} seconde de durée de vie) et $^1\Delta_g$ (entre 10^{-6} et 10^{-3} seconde) se propagent très peu et interagissent avec d'autres molécules à proximité de leur source de production (le PS). En effet, on estime que cette faible durée de vie (10-100 μ s en solvant organique et 2 μ s en solution aqueuse) implique une réactivité délimitée

par une sphère allant de 10 nm à 20 nm au tour du point de production.¹³¹ Cette caractéristique de la PDT est un avantage car cela offre une sélectivité par la proximité, puisque la propagation d'espèces cytotoxiques dans des zones non éclairées est impossible. Une fois créés, les ROS peuvent interagir avec les cellules à proximité et induisent leur mort cellulaire.

II.2. Les ROS au contact des organismes vivants⁸

Les ROS peuvent avoir différentes cibles cellulaires ce qui leur permet d'augmenter leur efficacité. On distingue 4 entités majeures ayant des cinétiques et des niveaux d'activité différents : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) et l'oxygène singulet (1O_2). Les deux premiers ROS sont moins cytotoxiques car leur réactivité est limitée. En effet, ces entités sont déjà naturellement présentes dans les organismes, car elles sont des produits secondaires issus de l'oxygénation des cellules. En plus d'être sensible à leur environnement, les cellules ont la capacité de se défendre contre ces ROS grâce à l'action d'enzymes comme les SOD et les catalases, ou via l'utilisation d'autres antioxydants endogènes (β -carotène par exemple). D'un autre côté, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet sont des ROS très efficaces et impossibles à contrer. Malgré que les bactéries soient particulièrement préparées aux différents stress oxydatifs, l'oxygène singulet a montré une grande efficacité, car son état dû à un transfert d'énergie est considéré comme un élément « non naturel » par les cellules. La production d'oxygène singulet est donc un facteur déterminant pour le choix du PS car ce ROS est le responsable majoritaire de l'effet bactéricide.

L'oxydation induite par les ROS peut intervenir à différents niveaux de la cellule :

- L'oxydation de différents acides aminés change la structure des protéines induisant leur perte d'activité. La modification des cystéines et méthionines permet notamment la création de ponts disulfures. L'activité des ROS sur les protéines est considérée comme la cause majoritaire de la mort cellulaire pour la PDT.¹³²
- Les ROS attaquent rapidement les acides gras membranaires, enclenchant des réactions en chaîne d'oxydation.
- La modification du matériel génétique (oxydation des bases) est aussi une source de la mort cellulaire car elle empêche la traduction (Figure 39).

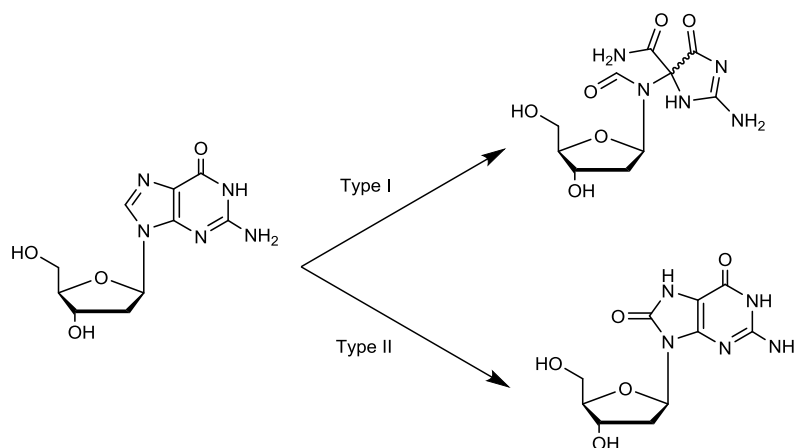


Figure 39. Oxydation de la 2-deoxyguanosine par les deux catégories de ROS.

III. Etat de l'art de l'aPDT

Les prémices de la thérapie photodynamique sont apparus très tôt dans l'Histoire. En effet, des anciennes cultures égyptiennes et asiatiques utilisaient déjà l'effet thérapeutique de différents colorants, appliqués directement sur des maladies cutanées.¹³³ Ces traitements disparurent progressivement et il fallut attendre le début du XX^{ème} siècle pour voir l'introduction du terme photothérapie grâce aux travaux de Raab. En 1900, il observa l'effet cytotoxique de l'acridine sur des paramécies, en présence de lumière (Figure 40).¹³⁴

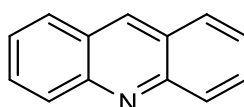


Figure 40. Structure de l'acridine.

Suite aux travaux de Von Tappeiner, l'importance de l'oxygène dans le processus fut démontrée ce qui introduit la notion de Photothérapie dynamique.¹³⁵ Alors que les travaux se multipliaient sur l'effet photobactéricide de cette technique, la découverte des antibiotiques éclipsa ces études et entraîna l'interruption des recherches dans ce domaine. Dans les années 1960, l'inactivation de virus par la PDT et l'apparition des souches résistantes relancèrent l'intérêt pour ces travaux.¹³⁶ Depuis cette période de nombreux résultats précliniques et cliniques ont été publiés¹²¹. De nos jours, l'aPDT intéresse de plus en plus d'équipes de recherche et de laboratoires cherchant une alternative aux antibiotiques.

L'histoire de la PDT est notamment reliée à la découverte et l'optimisation de photosensibilisateurs. Il est ainsi possible de les classer en deux grandes catégories : les PS tétrapyrroliques et les autres PS. Nous allons donc nous intéresser à ces deux familles de manière générale, puis les molécules les plus prometteuses pour l'aPDT seront abordées.

III.1. Les photosensibilisateurs non-tétrapyrroliques

Bien que les travaux retranscrits dans ce manuscrit utilisent uniquement des PS tétrapyrroliques, nous vous proposons ici une brève description de quelques PS non-tétrapyrroliques d'origine naturelle ou synthétique.

III.1.1. Les molécules d'origine naturelle

Les pérylènequinones sont une famille de chromophores d'origine naturelle caractérisée par un pentacycle conjugué. Leurs larges bandes d'absorption dans le rouge en font des pigments très utilisés. Le plus connu d'entre eux, l'**hypéricine** (Figure 41-A) est un photosensibilisateur présent chez la majorité des *Hypericum*, une famille de plante herbacée. Elle fut extraite pour la première fois en 1942.¹³⁷ Son intérêt pour la PDT a été découvert en 1992, puis ses propriétés antibactériennes ont été publiées en 2004.¹³⁸ Malgré que ce PS soit surtout étudié pour son caractère anticarcinogénique, il a montré un effet photobactéricide sur les souches Gram positif. Néanmoins, le caractère hydrophobe de ces molécules réduit fortement leur activité sur les bactéries Gram négatif.¹³⁹

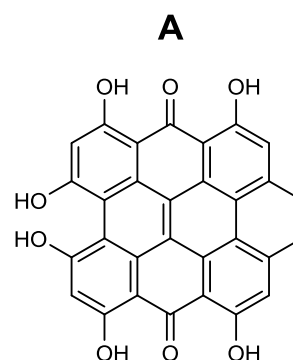


Figure 41. Structure de l'
Hypéricine (A).

Les apiacées sont des plantes riches en furocoumarine.¹⁴⁰ Parmi cette catégorie de molécule, les **psoralènes** (Figure 42-B) sont une sous-famille photosensible. Initialement le méthoxypsoralène, connue sous le nom de **Méladinine®** (Figure 42-C), était utilisé dans le traitement de maladies de peau tel que le psoriasis et l'eczéma.^{141,142} Depuis, la combinaison de psoralène et de la lumière ultraviolette ont fourni des résultats prometteurs contre de nombreux microbes et virus, tel que le virus de la dengue et le Chikungunya.¹⁴³ Des essais précliniques se sont révélés très prometteurs et bien tolérés par les patients.¹⁴⁴

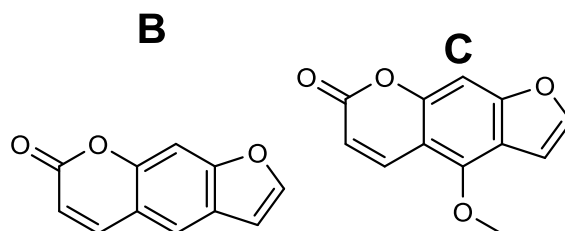


Figure 42. Différents PS non-tétrapyrroliques naturelles. **B** : Psoralène, **C** : Méladinine®.

La **curcumine** (Figure 43-D), appelée aussi diféruloyl-méthane, est extraite à partir du curcuma (*Curcuma longa*), une plante appartenant à la famille des Zingibéracées. Ce pigment naturel est très utilisé comme aliment et épice dans certaines cultures. Grâce aux quelques traitements ancestraux utilisant la curcumine, les chercheurs se sont intéressés à cette molécule et ont mis en évidence des propriétés anticarcinogéniques, anti-inflammatoires et antibactériennes.¹⁴⁵ Ce PS a été le sujet de nombreuses recherches antibactériennes, car il est naturellement intéressant par son caractère non toxique et comestible. La curcumine, irradiée par une lumière bleue ($\lambda_m = 430$ nm dans l'éthanol¹⁴⁶), a montré une très bonne efficacité contre *Streptococcus mutans*.¹⁴⁷ En 2014, Tovsen et son équipe ont travaillé sur un dérivé glycosylé de la curcumine qui a permis d'inactiver des souches Gram positif et Gram négatif.¹⁴⁸ Malgré les difficultés d'utilisation dues à son caractère hydrophobe, les nombreux résultats prometteurs de ce PS ont prouvé sa capacité à être utilisé lors d'essais cliniques.

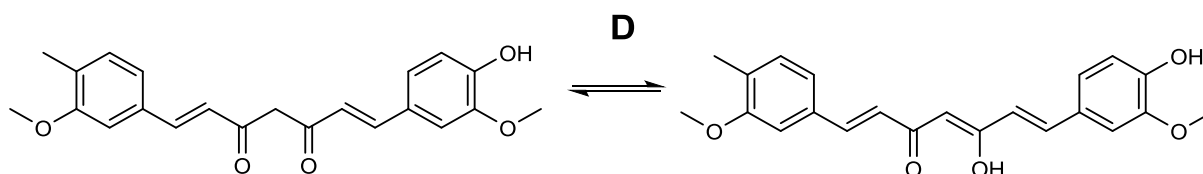


Figure 43. Structure de la curcumine (forme kéto à gauche et éno à droite)(D).

La **riboflavine** (Figure 44-E), aussi connue sous le nom de vitamine B2, est une molécule vitale dans le métabolisme animal car elles sont nécessaires à la synthèse des flavoprotéines. Déjà utilisé en guise de complément alimentaire, ce PS a été utilisé pour l'aPDT. Les travaux préliminaires ont montré l'inactivation de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* après illumination sous une lumière bleue (~470 nm).^{149,150}

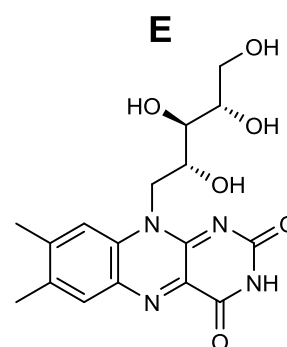


Figure 44. Structure de la riboflavine (E).

Lors d'une agression physique ou due à un pathogène, les plantes se mettent à sécréter des molécules appelées « Phytoalexines », afin de se protéger. La **phénalènone** (Figure 45-F) est une molécule photosensible qui a été retrouvée dans ces sécrétions, ce qui montre que certaines plantes se défendent contre des pathogènes grâce à la production de ROS.¹⁵¹ Les premières analyses ont montré que cette catégorie de PS offrait de très bons rendements quantiques en production d'oxygène singulet (>97%), ce qui a suscité un intérêt certain pour la PDT.¹⁵² Maisch et coll. ont donc cherché à modifier chimiquement ce PS, afin d'augmenter sa solubilité en milieu aqueux, via l'ajout d'une fonction sulfonique¹⁵³ ou d'un groupe pyridinium (« **SAPYR** »).¹⁵⁴ Ce dernier a donné d'excellents résultats contre de nombreuses souches et biofilms bactériens. En effet, en plus de sa forte production d'oxygène singulet, cette molécule se comporte comme un tensio-actif, ce qui permet de déstructurer les biofilms bactériens et de les rendre plus sensibles aux ROS.¹⁵⁵

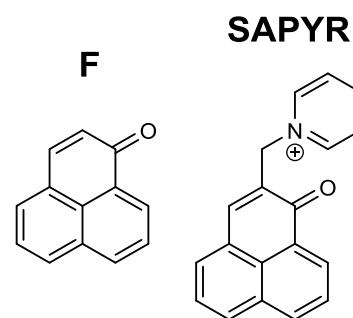


Figure 45. Différents PS non-tétrapyrroliques naturelles (suite) ;
F : Phénalènone et **SAPYR**.

III.1.2. Les molécules synthétiques

Le **bleu de méthylène** (Figure 46-MB) est un PS cationique facilement synthétisable et qui a une bonne solubilité en milieu aqueux.¹⁵⁶ Offrant un rendement quantique satisfaisant ($\Phi_A=0,51$ dans l'éthanol), cette molécule semblait présenter des propriétés intéressantes pour la PDT. Cependant, son manque de stabilité face à certaines enzymes la rend difficilement utilisable en PDT¹⁵⁷ mais très utile dans le cadre d'une application antibactérienne. Son efficacité sur *Staphylococcus aureus* fut initialement démontrée en 1928, puis confirmée pour le bleu de Toluidine en 1930. Depuis, de nombreuses études mettent en avant l'efficacité de ces PS contre une majorité des souches bactériennes. Ainsi ces molécules sont déjà présentes dans le monde médical, notamment en odontologie. De plus, le bleu de méthylène est actuellement utilisé en Allemagne pour la décontamination de plasma récemment congelé.¹²¹

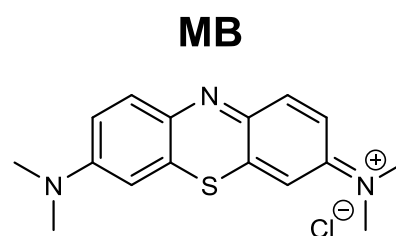


Figure 46. Structure du bleu de méthylène (**BM**).

L'**érythrosine** (Figure 47-E) est un colorant alimentaire (E127) très prometteur en aPDT. En effet, il fut longtemps utilisé comme révélateur de biofilms dentaires grâce à sa capacité à « s'accrocher » à ces derniers.¹⁵⁸ Ainsi la découverte de son effet photobactéricide le rend propice à une utilisation en odontologie. De plus, des travaux ont montré une meilleure efficacité comparée à l'utilisation de bleu de méthylène ou de Photofrin® (Chapitre 2.III.3, page 62).¹⁵⁹

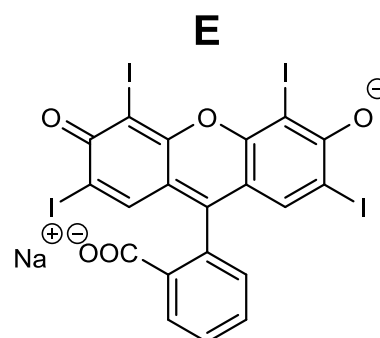


Figure 47. Structure de l'érythrosine (**E**).

Le **Rose de Bengale** (Figure 48-RB) est un autre PS synthétique très courant en PDT. Découvert en 1881, le Rose de Bengale est utilisé comme référence afin de calculer les rendements quantiques de production d'oxygène singulet des PS car le sien fut établi en 1964 ($\Phi_{\Delta}=0,68$ dans l'éthanol). Il fut l'un des premiers PS utilisés lors d'essais antibactériens, en 1969.¹⁶⁰ Il a ensuite été étudié pour la création de surface photobactéricide.^{161,162} (Chapitre 5.II.1, page 159)

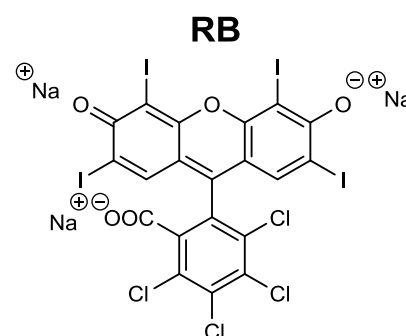


Figure 48. Structure du Rose de Bengale (RB)

Le **vert d'indocyanine** (Figure 49-ICG) est un colorant initialement utilisé pour le diagnostic médical grâce à son spectre d'absorbance et d'émission, situés dans les infrarouges. Ses propriétés photophysiques ont attiré l'attention de la recherche microbiologique. En plus de résultats satisfaisants contre certaines souches MDR, le mécanisme d'action du vert d'indocyanine s'est révélé être différent d'autres PS cationiques.^{163,164} Lors d'essais cliniques, ce PS a permis le traitement d'acné.¹⁶⁵ Leite et son équipe ont suggéré que le vert d'indocyanine pourrait inactiver sélectivement les souches de *Streptococcus pneumonia* responsables d'infections pulmonaires.¹⁶⁶

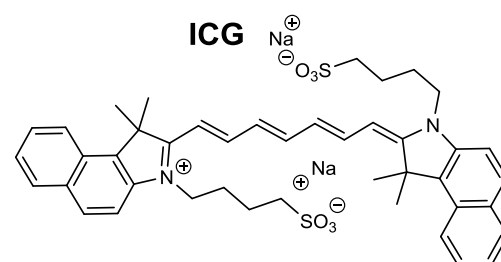


Figure 49. Structure du vert d'indocyanine (ICG)

Les boron-dipyrrométhène ou **BODIPY**, sont une nouvelle famille de PS qui a fortement émergé ces dix dernières années. A l'instar des PS tétrapyrroliques, cette famille offre la possibilité de synthétiser de nombreux dérivés ayant différents groupes fonctionnels. Avec des rendements quantiques de production d'oxygène singulet élevés, une bonne stabilité physico-chimique et des spectres d'absorbances adéquats, ces PS semblaient prometteurs. Cependant ils se sont malheureusement montrés aussi actifs et plus toxiques en absence de lumière, que les autres PS.¹⁶⁷ Au sein de cette famille, nous pouvons citer les travaux de Caruso basés sur l'inactivation de *Staphylococcus xylosus* et *Escherichia coli* par un BODIPY cationique (Figure 50-cBODIPY).¹⁶⁸

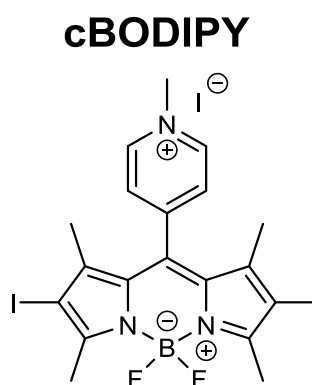


Figure 50. Structure du cBODIPY

L'ensemble de ces PS non-tétrapyrroliques ont un intérêt certain dans la recherche contre les infections bactériennes. Cependant en comparaison des PS tétrapyrroliques, ils sont moins étudiés car ils n'offrent pas autant de possibilité de faire des modifications chimiques, afin d'améliorer leur propriétés (hydrophilicité, ciblage cellulaire). En effet, les molécules ayant des cycles pyrroliques sont le centre d'intérêt de la recherche en PDT, car ces PS ont obtenu les meilleurs résultats à ce jour.

III.2. Les PS tétrapyrroliques

Ils existent plusieurs types de molécules appartenant à cette catégorie. Dans le cadre de ces travaux, nous proposons ici d'introduire les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines et les phtalocyanines.

III.2.1. Structure des porphyrines, des chlorines et des bactériochlorines

Les porphyrines sont des molécules aromatiques dérivées de la porphyrinogène. Cette dernière est composée de quatre noyaux pyrroliques reliés par des ponts méthènes entre les positions α de chaque pyrrole. Basée sur cette structure, la porphyrine a 22 électrons π conjugués dont 18 participants à l'aromaticité.

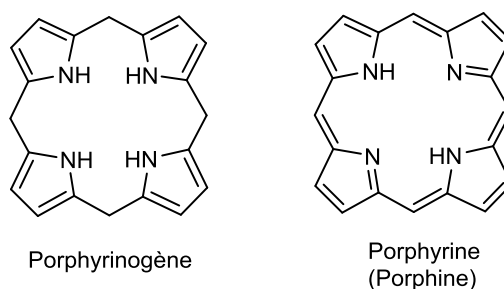


Figure 51. Structures de la porphine (à gauche) et de la porphyrine (à droite).

La structure d'une porphyrine permet de classer les atomes de carbone en trois catégories : les carbones α (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 et 19) reliant les noyaux pyrroliques, les carbones β (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18) et les positions *meso* (5, 10, 15, 20). Quelque soit les groupes substitués en position β ou *meso*, la molécule appartient à la famille des porphyrines. Cette structure possède deux amines tertiaires en son centre pouvant soit partager des électrons, afin de former un cation divalent, soit capter des protons. Ainsi la forme ionique du noyau varie selon le pH. Ce centre peut aussi accueillir un atome métallique. Lorsqu'une porphyrine est métallée, elle s'appelle métalloporphyrine, sinon il s'agit d'une porphyrine à base libre.

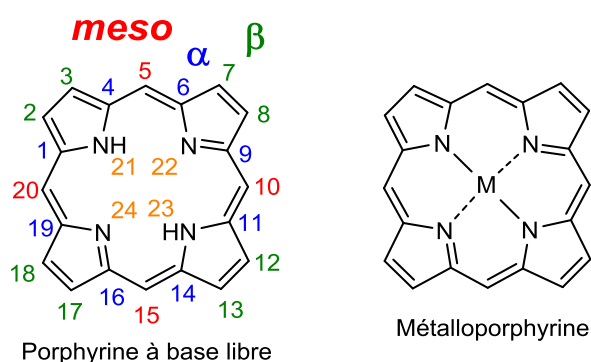


Figure 52. Numérotation des positions d'une porphyrine et structure d'une métalloporphyrine.

Les chlorines et les bactériochlorines ont la même structure de base que les porphyrines, cependant elles se distinguent par la réduction d'une ou deux doubles liaisons respectivement. La bactériochlorine peut aussi se trouver sous la forme d'isobactériochlorine selon l'emplacement relatif des deux doubles liaisons réduites.

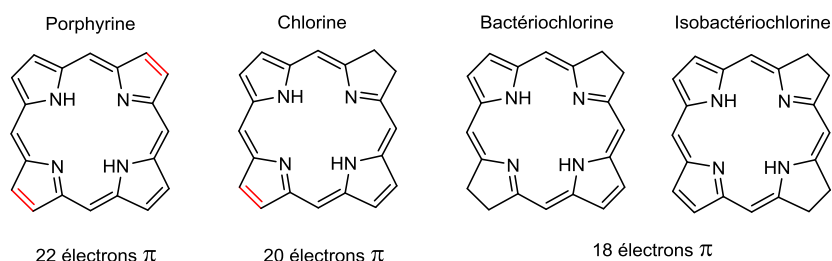


Figure 53. Différence entre une porphyrine, une chlorine et une bactérochlorine.

III.2.2. Propriétés photophysiques

Le nom de porphyrine découle du grecque « *porphyr*a » qui fait référence à sa couleur violette très intense. En effet, comme beaucoup de PS, les porphyrines et ses dérivés se remarquent facilement par leur coloration ce qui fait d'eux de très bons pigments. La conjugaison des électrons π est à l'origine de ces propriétés photophysiques très particulières. Grâce aux développements des techniques spectrométriques, les spectres d'absorption, d'émission et de production d'oxygène singulet des PS ont pu être établis et sont caractérisés pour ces molécules.

➤ Spectres d'absorption des porphyrines et ses dérivés

Les porphyrines et ses dérivées (chlorine et bactérochlorine) absorbent dans le domaine du visible (induisant leur coloration), et présentent ainsi des spectres d'absorption caractéristiques qui permettent de les distinguer. Pour les porphyrines, on distingue deux catégories de bandes d'absorption :

- Une bande d'absorption très intense entre 400 et 430 nm qui est appelée « Bande de Soret » : cette bande s'affine avec une augmentation de la pureté ou une diminution de l'agrégation des porphyrines.
- Quatre bandes situées entre 480 nm et 700 nm qui sont appelées « bandes Q » (de I à IV) : Leurs intensités relatives peuvent varier selon les groupes substitués en β et *meso*. Cependant, ces bandes sont toujours dix à vingt fois plus faibles que la bande Soret. La métallation d'une porphyrine a comme conséquence de faire disparaître deux bandes Q, en raison d'une meilleure symétrie (liée à la présence du métal) en comparaison des porphyrines à base libre.^{169,170}

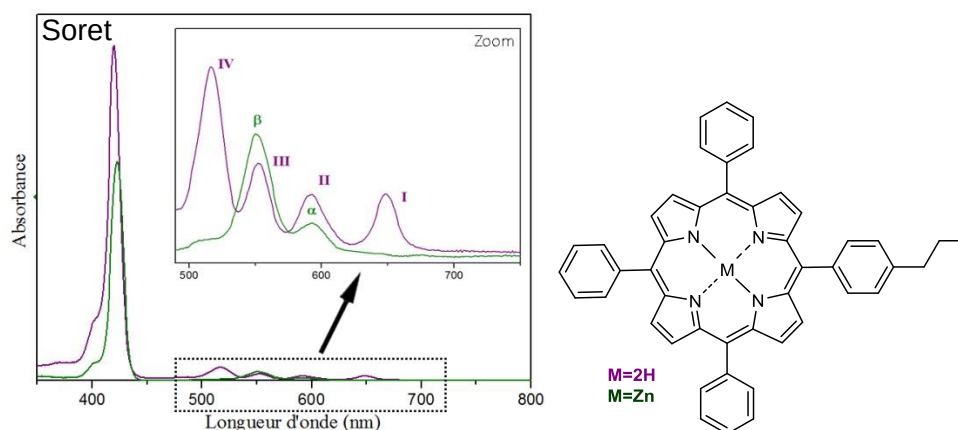


Figure 54. Spectres d'absorbance d'une porphyrine à base libre (violet) et d'une métalloporphyrine (vert) dans le chloroforme.¹⁷¹

Les réductions successives d'une porphyrine entraînent un changement important des propriétés photophysiques, notamment pour le spectre d'absorbance. Les bandes Q sont très représentatives de ces changements : les chlorines ont une bande Q_i bien plus élevée que celle des porphyrines. De plus, cette bande se « déplace » vers le rouge et se situe entre 650 et 700 nm. Il en est de même pour les bactériochlorines qui présentent une bande Q_i intense se situant entre 750 et 800 nm. La bande de Soret varie, quant à elle, très peu lors la première réduction de la porphyrine, mais le passage à la bactériochlorine entraîne un déplacement vers les ultra-violet.

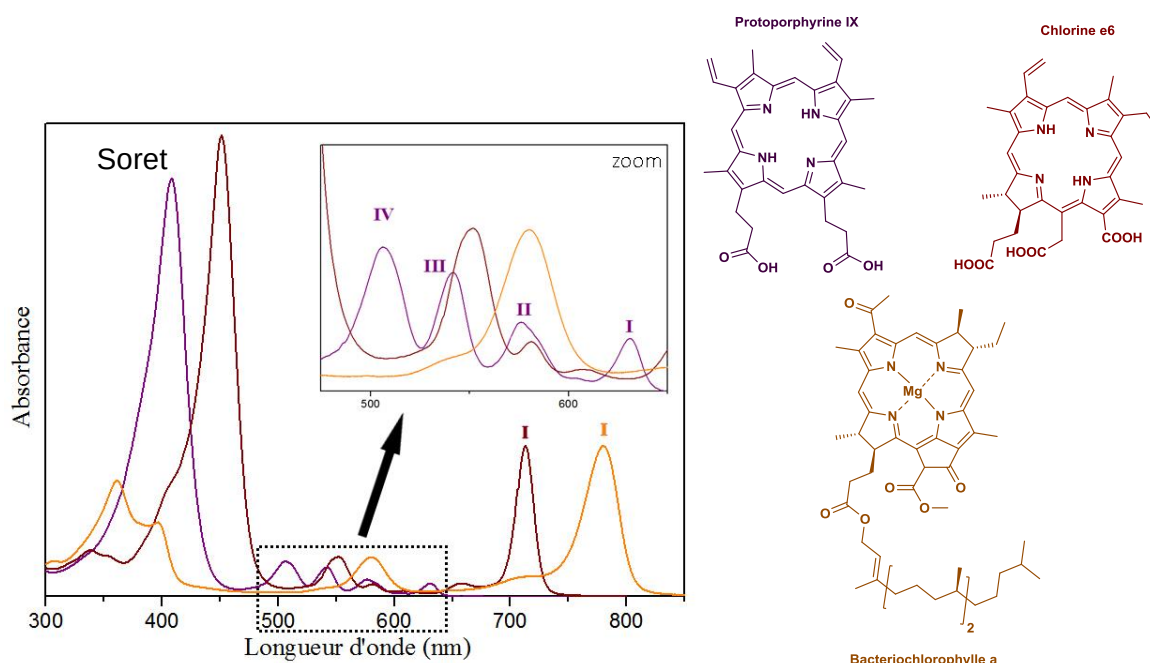


Figure 55. Spectres d'absorbance de la protoporphyrine IX dans le chloroforme (violet), de la chlorine e6 dans l'éthanol (rouge) et de la bactériochlorophylle dans le toluène (orange) (d'après PhotochemCad).

➤ Spectres d'émission des porphyrines et ses dérivés

En accord avec le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 36, page 38), deux types d'émission radiative sont observables après excitation du photosensibilisateur : la fluorescence et la phosphorescence. En ce qui concerne les porphyrines, la phosphorescence présente très peu d'intérêt car elle est très faible et difficilement caractérisable.^{172,173} La fluorescence, quant à elle, est très bien caractérisée. A l'instar du rendement quantique de production d'oxygène singulet (Équation 4, page 39), un rendement permet de relier le nombre de photons émis par fluorescence au nombre de photon absorbé. Comme pour la production d'oxygène singulet, le rendement de fluorescence dépend de l'environnement du PS tel que le solvant, la température et l'atmosphère (Équation 5).¹⁷⁴

$$\Phi_f = \frac{\text{Quantité de photons émis}}{\text{Quantité de photons absorbés}}$$

Équation 5. Formule du rendement quantique de fluorescence sur une même durée.

De manière générale, le spectre de fluorescence des porphyrines est constitué de deux bandes fortes situées entre 550 et 850 nm. Cette fluorescence et son rendement quantique dépendent des différents groupements substitués sur la porphyrine. La présence d'un métal entraîne aussi un changement dans le spectre d'émission. En ce qui concerne les chlorines et les bactériochlorines, leur fluorescence est aussi observable entre 550 et 850 nm mais la deuxième bande est généralement plus faible comparé aux porphyrines. Evidemment, la diversité de leurs groupements substitués fait également varier la fluorescence. Cependant la fluorescence de ces deux dérivés est difficilement caractérisable, car ces composés peuvent s'avérer très insolubles et ont tendance à s'oxyder pour reformer la porphyrine.

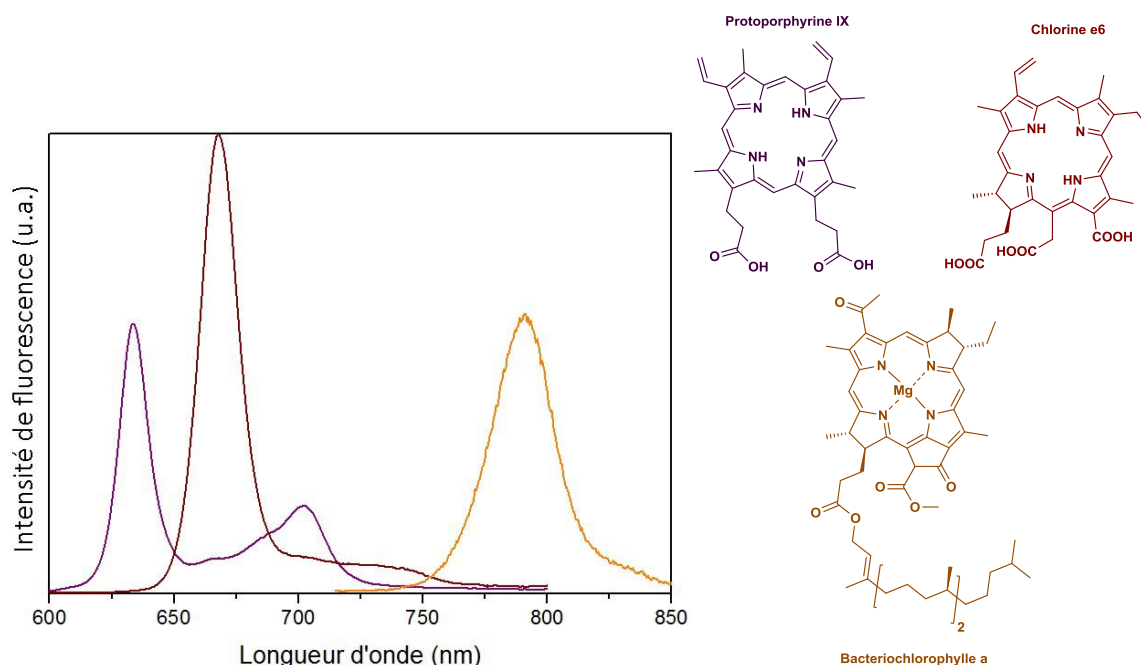


Figure 56. Spectres de fluorescence de la protoporphyrine IX dans le chloroforme (violet), de la chlorine e6 dans l'éthanol (rouge) et de la bactériochlorophylle dans le toluène (orange), d'après PhotochemCad.

Les rendements quantiques de fluorescence des porphyrines et de ses dérivés sont très faibles, notamment à cause de la conversion intersystème permettant le passage à l'état triplet. Ils sont généralement compris entre 0,2 et 0,4.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷

III.2.3. Obtention de PS tétrapyrroliques d'origine naturelle

➤ **Extraction de porphyrine à partir de constituants d'origine naturelle**

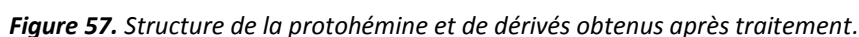
De nombreuses molécules et protéines naturelles sont composées de PS tétrapyrroliques, ainsi les porphyrines et leurs dérivés sont indispensables à de nombreux organismes. Par exemple, la protohème (ou chloroprotoporphyrine de fer(III)) participe au transport d'oxygène chez les animaux. L'extraction de cette molécule a été décrite selon deux procédés :

- Selon Fischer¹⁷⁸ :

En 1941, Fischer extrait la protohème à partir de sang défibriné (privé de fibrogène). Après un traitement en milieu acide à haute température, la protohème est récupérée par filtration ou

- Selon Labbe et Nishida¹⁷⁹ :

L'extraction de la protohème est importante car cette dernière est un précurseur à la synthèse d'autres PS très utilisés. L'hématoporphyrine et la protoporphyrine IX sont obtenues respectivement après un traitement acide et après démétallation de la protohème.



Chapitre 2 : La thérapie photodynamique

protoporphyrine IX au sein des cellules. Ainsi l'ALA-PDT ne nécessite pas l'utilisation directe d'un PS mais seulement de l'acide 5-aminolévulinique et de lumière appliquée sur la zone cancéreuse. Cette technique est actuellement l'une des applications les plus répandues, surtout en dermatologie (malgré une forte douleur chez les patients).

➤ Hémi-synthèse de chlorine

Chez les végétaux, différentes chlorophylles sont responsables de la photosynthèse, permettant aux plantes de transformer la lumière en énergie chimique. Ces chlorophylles appartiennent en fait à la famille des chlorines. Leur extraction, ainsi que leur modification, permettent d'obtenir des chlorines d'origine naturelle. En utilisant des feuilles, des épinards¹⁸² ou des algues, la chlorophylle peut être directement extraite. La purpurine-18 est l'un de ces photosensibilisateurs obtenus à partir de la chlorophylle.

Au sein du LCSN, Drogat et coll. ont optimisé un protocole d'extraction permettant de récupérer la purpurine-18 avec un très bon rendement (99.6%) à partir d'une algue (*Spirulina maxima*).¹⁸³ A partir d'algues lyophilisées, la chlorophylle *a* est extraite lors d'un reflux dans un solvant organique. Ensuite ce pigment est saponifié à l'aide d'une solution concentrée de soude, puis oxydé en présence de dioxygène. Enfin un traitement acide est appliqué afin de démétaller le macrocycle. Cette méthode peut être aussi adaptée afin d'obtenir la bactériopurpurine-18 à partir de la bactériochlorophylle *a*, un pigment extrait à partir de *Rhodobacter sphaeroides*, espèce bactérienne aquatique photosensible.¹⁸⁴

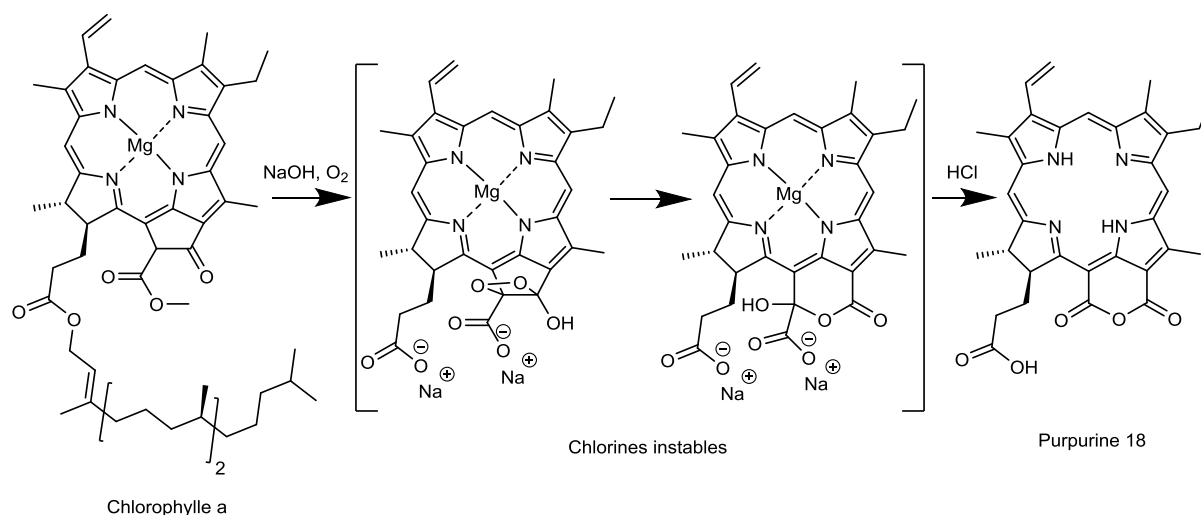


Figure 58. Synthèse de la purpurine-18 à partir de la chlorophylle *a*.

La purpurine-18 est un PS très intéressant puisqu'elle possède une fonction anhydride qui peut facilement réagir avec les amines pour former des amides. Après l'ouverture de l'anhydride, le PS se retrouve sous la forme d'un dérivé de chlorure-e6. Ce dernier, ainsi que le pyrophéophorbide-*a*, sont également des pigments obtenus à partir de la chlorophylle *a*.¹⁴² La démetalation de la chlorophylle permet d'obtenir la phéophytine, qui, après saponification de son groupe phytol, forme la phéophorbide *a*. Le traitement de cette dernière en présence de triméthylpyridine à reflux conduit au pyrophéophorbide.¹⁸⁵ Quand à l'hémi-synthèse de la chlorure-e6, elle est réalisée en trois étapes à partir de la chlorophylle *a* ; une transestérification (formant la méthylphéophorbide), puis l'ouverture du cycle (formant la triméthylchlorure-e6) et enfin la saponification des esters.^{142,186}

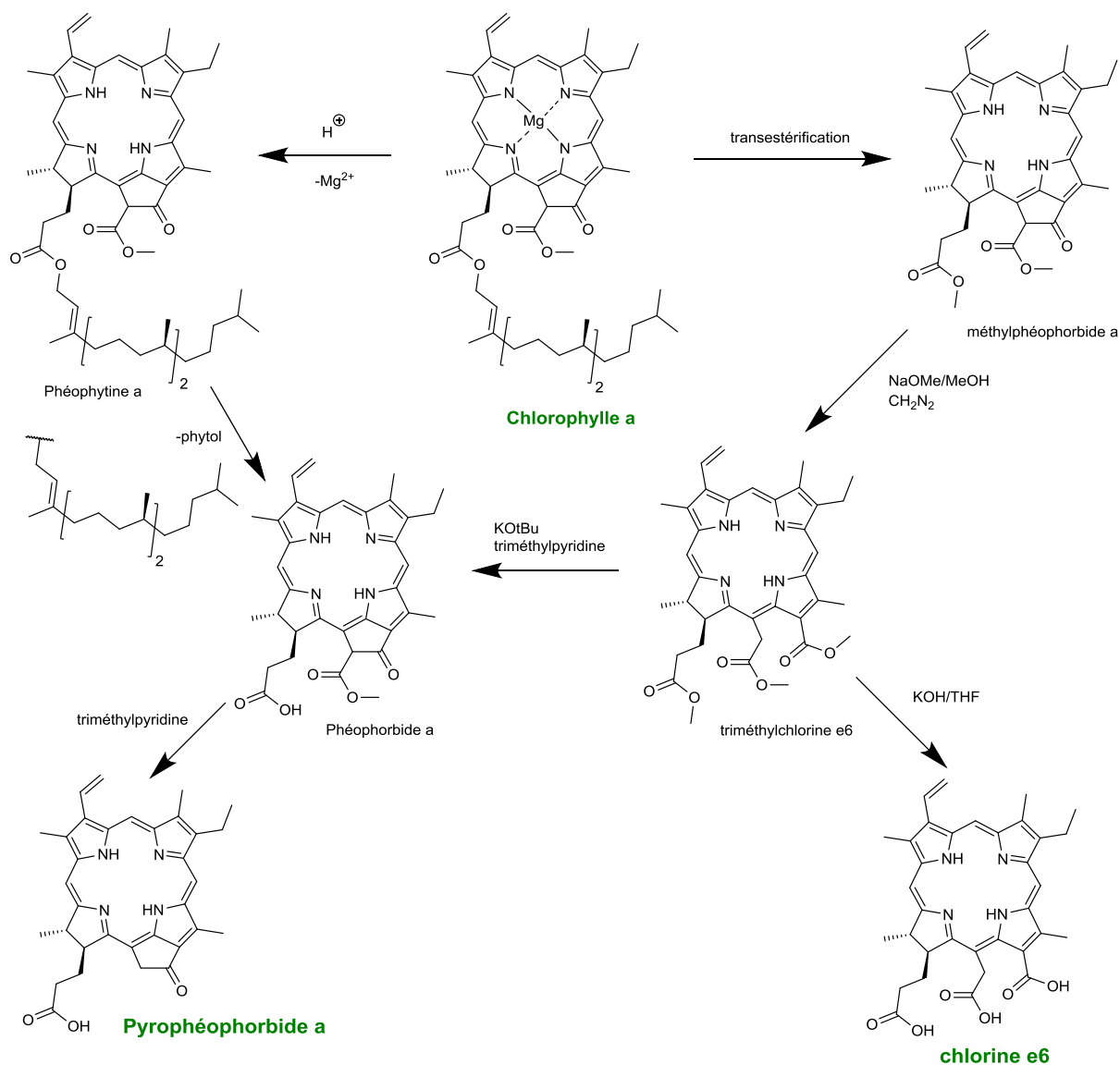


Figure 59. Synthèse de la pyrophéophorbide et de la chlorure *e6* à partir de la chlorophylle *a*

III.2.4. Synthèse des porphyrines

Afin de répondre aux diverses problématiques de la PDT, des protocoles ont été élaborés afin d'obtenir des porphyrines synthétiques différentes de celles d'origine naturelle. Ces diverses stratégies de synthèse suivent cependant le même déroulement basé sur la formation du noyau

porphyrinique (par des substitutions électrophiles sur les positions 2 et 5 des pyrroles) puis l'oxydation de ce dernier. Ces différents protocoles ont été développés afin de pouvoir synthétiser une grande diversité de porphyrines substitués en *meso* ou/et β . Toutes ces synthèses peuvent être classées selon 3 grandes stratégies. La plus ancienne stratégie était basée sur la condensation de quatre unités pyrroliques afin de former le noyau porphyrinique (Figure 60). Cette technique n'offre aucun contrôle sur la stéréochimie du produit formé. Afin de palier à ce problème, deux stratégies ont été élaborées, soit en faisant réagir deux unités dipyrrométhanes préalablement synthétisés (« 2+2 »), soit en incluant une unité pyrrolique dans un précurseur tripyrrane (« 3+1 »). Dans cette partie, nous allons nous intéresser à ces synthèses et tout particulièrement à la condensation des unités pyrroliques, qui sera utilisée lors des travaux réalisés au cours de ce manuscrit.¹⁸⁷

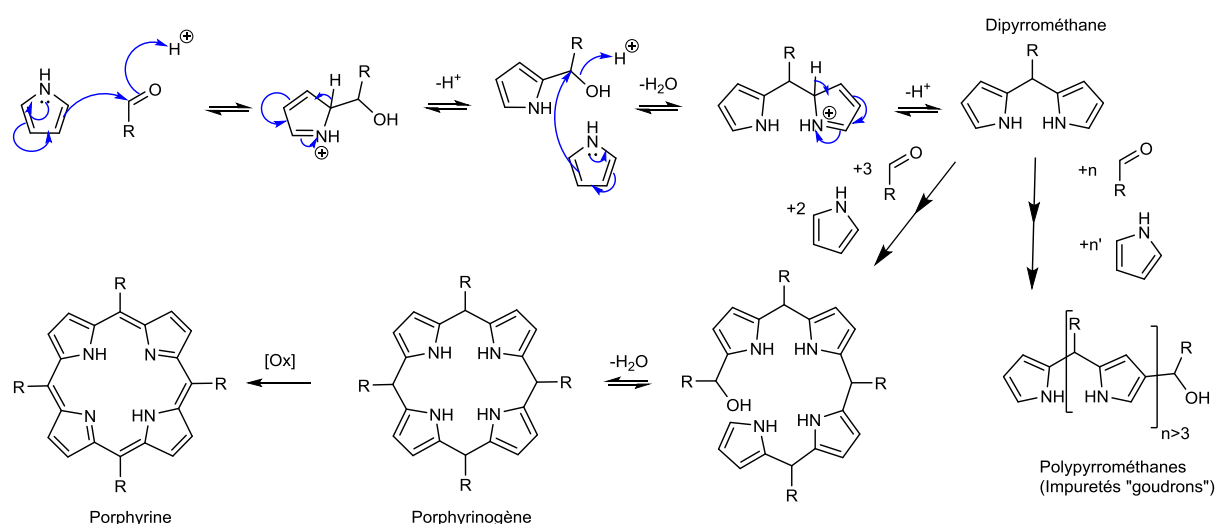


Figure 60. Mécanisme réactionnel de la condensation des pyrroles et des aldéhydes en milieu acide.

➤ Condensation de pyrrole et d'aldéhyde

- Synthèse de Rothemund

Rothemund a décrit pour la première fois la synthèse d'une *meso*-porphyrine substituée en 1935. En chauffant à 220°C un mélange de pyrrole et de benzaldéhyde dans un système fermé en présence de pyridine, Rothemund a obtenu un mélange constitué de la 5,10,15,20-tétra(phényl)-21H,23H-porphyrine (TPP) et de sa chlorure dérivée (10-20%) (Figure 61).¹⁸⁸ Cependant, ce premier protocole offrait un rendement très faible (5 à 10%).¹⁸⁹

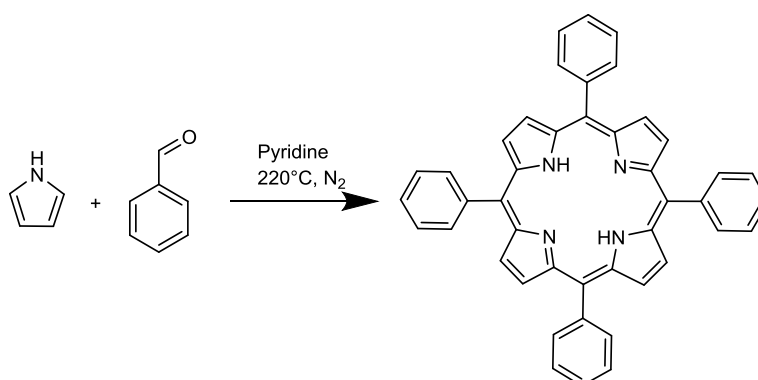


Figure 61. Synthèse de la TPP selon Rothemund.¹⁸⁸

- Synthèse d'Adler et Longo

Les travaux d'Adler et Longo effectués en 1967, ont permis de mettre en évidence les différents facteurs régulant la condensation pyrrolique avec le benzaldéhyde. Outre le rôle de la température, de la quantité d'oxygène, du solvant et des quantités de réactifs, ils ont mis en évidence l'influence de l'acidité du milieu réactionnel. Ainsi le protocole établi suit ces recommandations : la condensation des pyrroles et des aldéhydes doit être effectuée à partir d'un mélange équimolaire dissous dans de l'acide propionique mis à reflux (141°C), à l'air libre pendant au moins trente minutes (Figure 62).¹⁹⁰ En suivant ces indications, la TPP peut être obtenue avec un rendement d'au moins 20%. Comme pour la synthèse précédente de Rothemund, ce protocole oblige d'utiliser des aldéhydes supportant les hautes températures et malgré un meilleur rendement, une grosse majorité des produits formés sont des impuretés. De plus, la présence d'acide propionique dans le brut réactionnel rend la purification plus compliquée en empêchant la cristallisation des porphyrines.

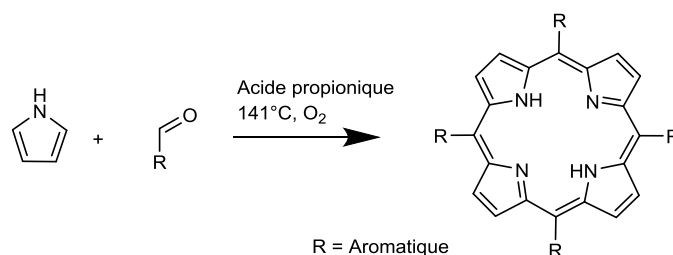


Figure 62. Synthèse de porphyrine substituée par des groupements aromatiques en meso selon Adler et Longo.¹⁹⁰

- Synthèse de Little, dites des « aldéhydes mixtes »

Basé sur les travaux d'Adler et Longo, Little propose, en 1975, la synthèse de porphyrine ayant différents substituants en position *meso* afin de d'obtenir des photosensibilisateurs asymétriques. En utilisant le protocole précédent, un mélange de deux différents aldéhydes peut se condenser avec le pyrrole pour former des porphyrines asymétriques (« aldéhydes mixtes ») (Figure 63).¹⁹¹

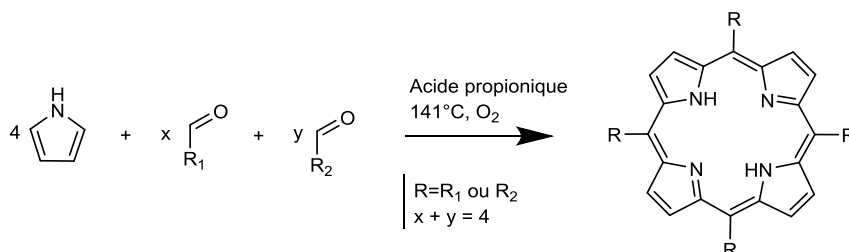


Figure 63. Synthèse de porphyrine asymétrique selon Little.¹⁹¹

Contrairement à la synthèse d'une porphyrine symétrique, le procédé selon Little ne permet pas de synthétiser une seule porphyrine. En effet, l'utilisation d'un mélange de deux aldéhydes a pour conséquence la formation de 6 différentes porphyrines. Lors d'utilisation de ce protocole, un « code » a été instauré afin de reconnaître les divers produits. A partir d'un aldéhyde « A » et un autre « B », les porphyrines obtenues sont nommées ainsi (Figure 64) :

- « A₄ », pour la porphyrine n'ayant que des substituants dûs au réactif A

- « A_3B », pour la porphyrine ayant 3 substituants dûs au réactif A et 1 du à B
- « A_2B_2 », pour la porphyrine ayant 2 substituants dûs au réactif A et 2 dus à B (deux isomères)
- « AB_3 », pour la porphyrine ayant 1 substituant dû au réactif A et 3 du à B
- « B_4 », pour la porphyrine n'ayant que des substituants dûs au réactif B

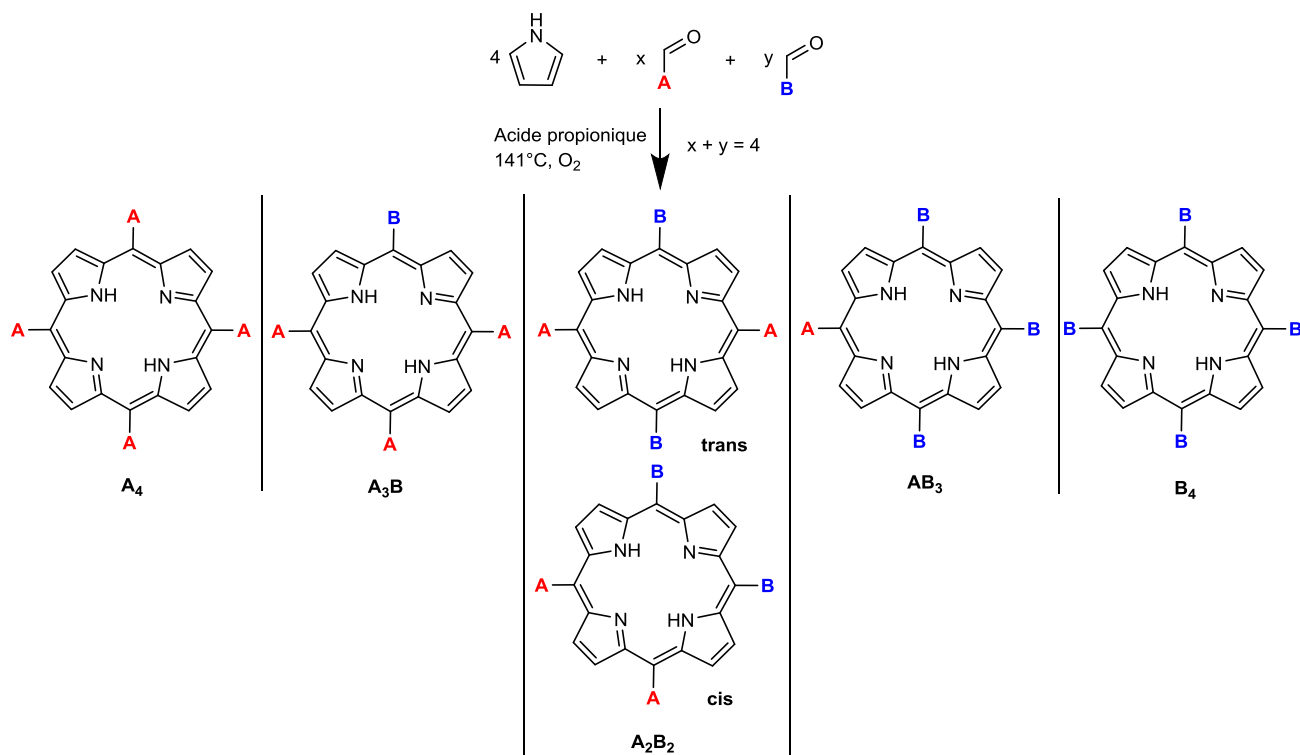


Figure 64. Les différentes porphyrines produites lors d'utilisation d'un mélange de deux aldéhydes.

L'utilisation de ce protocole nécessite donc de prendre en compte la quantité de réactif. Par exemple, afin d'obtenir des porphyrines A_3B , il est préférable d'utiliser 3 équivalents de l'aldéhyde A et 1 équivalent pour le B avec 4 équivalents de pyrrole. La synthèse d'une porphyrine A_3B dépend beaucoup des aldéhydes utilisés et son rendement peut varier entre 5% et 25%.¹⁹² En plus d'avoir les mêmes désavantages que la synthèse selon Adler et Longo, la purification nécessite l'utilisation de techniques chromatographiques afin de séparer les différentes porphyrines formées. Cependant, il reste le protocole le plus utilisé pour former des porphyrines cationiques asymétriques et des porphyrines en quantité massique relativement élevée.

- Synthèse de Lindsey

En 1986, Lindsey offre un nouveau protocole plus optimisé que celui d'Adler et Longo. Afin de pallier aux problèmes des conditions extrêmes et de l'instabilité des aldéhydes, Lindsey propose une synthèse dans un milieu plus doux et plus dilué, ce qui entraîne une augmentation du rendement, l'absence d'acide propionique et réduit les problèmes lors de la purification. La réaction est basée sur un équilibre entre les polypyrrrométhanes et le porphyrinogène, considéré comme le produit thermodynamiquement stable. La formation de ces produits est catalysée par l'utilisation d'un acide de Lewis (BF_3OEt_2 , TFA ou BCl_3) dans du dichlorométhane anhydre sous atmosphère inerte.

(Figure 65). Enfin, le porphyrinogène formé est oxydé lors d'une deuxième étape par l'ajout de DDQ ou *p*-chloranil au milieu réactionnel, afin d'obtenir la porphyrine.¹⁹³

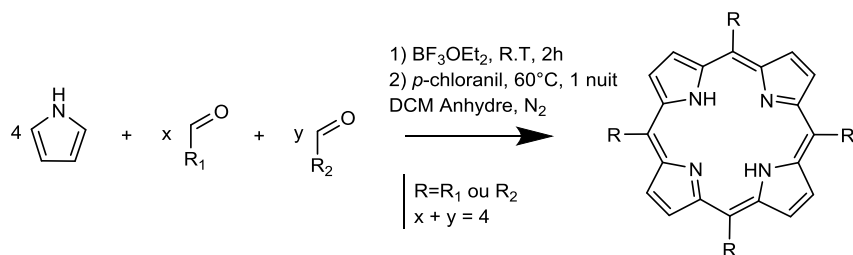


Figure 65. Synthèse de porphyrine selon Lindsey.¹⁹³

Les rendements maximums sont obtenus avec des milieux réactionnels assez dilués ($C < 10^{-2}$ M). Initialement ce protocole était utilisé pour obtenir des porphyrines symétriques (les rendements pouvant atteindre 40-50%). Suivant le principe de Little, cette synthèse fut adaptée à l'utilisation de mélange d'aldéhyde pour la formation de porphyrine asymétrique avec de meilleurs rendements. Cependant, cette synthèse ne fonctionne pas avec certains aldéhydes, et les porphyrines possédant des groupements pyridyls ne peuvent pas être obtenues selon cette technique.

- Autres synthèses

Bien que les synthèses citées ci-dessus restent les protocoles standards pour l'obtention de porphyrine, quelques alternatives ont été explorées afin d'éviter les problèmes majeurs, qui sont les faibles rendements, les purifications difficiles et le manque de régiosélectivité. En 1978, un protocole utilisant la synthèse sur phase solide, est proposé par Svirskaya et Leznoff afin de limiter les étapes de purification.¹⁹⁴ Cette technique est dérivée de la « Solid Phase Peptide Synthesis » (SPPS) qui sera utilisée lors du Chapitre 4 (page 102). Malheureusement, les rendements de synthèses se sont révélés faibles (2-4%), ainsi cette voie fut abandonnée. Au cours du XXI^{ème} siècle, la synthèse de porphyrine sous microondes a montré de nombreux avantages comme l'augmentation du rendement et la diminution du temps de réaction.¹⁹⁵ En plus de faciliter la production de tétra-aryl-porphyrine, l'utilisation du MnO_2 en tant qu'agent oxydant (à la place de quinone) a permis de réduire le coût de la réaction.¹⁹⁶ En plus des microondes, nous avons montré au sein du LCSN, l'intérêt d'utiliser l'iode en tant que catalyseur et cela a permis d'obtenir des rendements de synthèse de 47% pour la TPP.¹⁹⁷ Nous pouvons aussi citer la synthèse de porphyrines à partir de pyrroles-carbinol¹⁹⁸ ou de charbon activé¹⁹⁹. Malgré tous ces protocoles permettant la diminution des produits secondaires issus de la condensation pyrrolique, des étapes de purification sont toujours nécessaires afin d'obtenir la porphyrine souhaitée.

➤ Synthèses « 2+2 » et « 3+1 »

Afin d'améliorer les rendements de synthèse et de résoudre les problèmes issus de la condensation pyrrolique, les synthèses « 2+2 » se sont développées. Elles sont basées sur la préparation préalable des dipyrrométhanés ou de dipyrrométhènes permettant de former une plus grande variété de porphyrines.

- Utilisation des dipyrrométhanés

Comme indiqué sur la Figure 60, les dipyrrométhanes sont obtenus lors de la condensation de deux unités pyrroliques avec un aldéhyde sous catalyse acide.¹⁹⁸ A partir de deux dipyrrométhanes purifiés, Woodward et MacDonald ont réussi à obtenir des porphyrines (Figure 66).^{200,201} Ce protocole suit le même cheminement que la condensation pyrrolique (formation de la porphyrinogène et oxydation), mais ici, les rendements peuvent atteindre 50 à 60%. Malgré la nécessité de préparer préalablement les deux réactifs, cette synthèse permet aussi d'obtenir des porphyrines asymétriques.

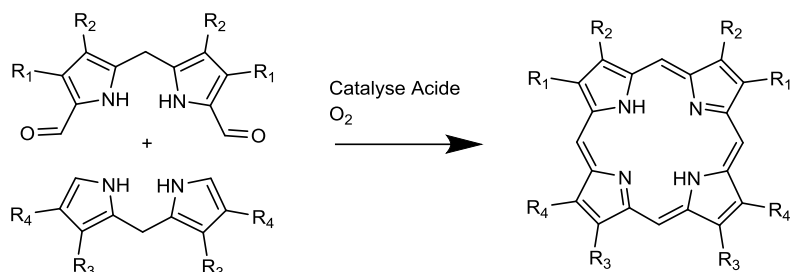


Figure 66. Synthèse de porphyrines selon Woodward et MacDonald.^{200,201}

Afin d'éviter la préparation de diformyldipyrrométhane, des variantes utilisant des aldéhydes aromatiques en addition aux dipyrrométhanes, ont été développées. Ces réactions permettent de synthétiser des di-aryl-porphyrines avec d'excellents rendements (73-92%).^{202,203} Elles sont réalisées en présence de TFA comme catalyseur acide, et nécessitent également l'utilisation de *p*-chloranil en tant qu'oxydant (Figure 67).

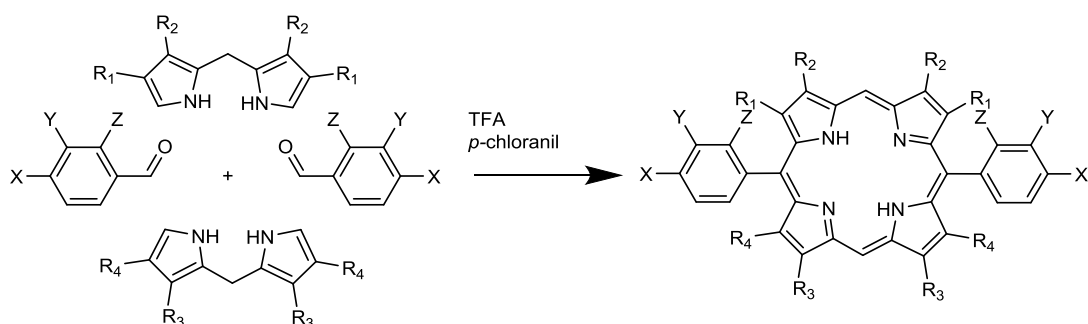


Figure 67. Synthèse de di-aryl-porphyrines à partir de dipyrrométhanes.

D'autres techniques utilisant les dipyrrométhanes ont été développées. Nous pouvons citer, par exemple, les travaux de Montierth²⁰⁴ et de Naik²⁰⁵ se servant de la synthèse sur phase solide ou encore les recherches de Temelli²⁰⁶ combinant les dipyrrométhanes avec des imines.

- Utilisation des dipyrrométhènes

Les dipyrrométhènes sont la forme cationique des dipyrrométhanes obtenue en milieu acide. Cette forme ionique a pour conséquence de modifier la stabilité et la réactivité de la molécule.

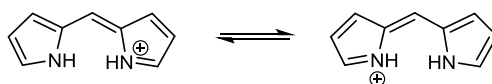


Figure 68. Structure des dipyrrométhènes.

Fischer (Prix Nobel en 1930) fut le premier à synthétiser des porphyrines à partir de dipyrrométhènes avec des rendements assez hétérogènes (0.2 à 2%).²⁰⁷ Ces synthèses permettaient uniquement d'obtenir des porphyrines symétriques du fait des conditions extrêmes de réaction (200°C).¹⁷¹ Se déroulant initialement dans un milieu moyennement acide (acide tartrique), la combinaison d'acide formique et de dibrome a permis d'atteindre des rendements de 40%.²⁰⁸ En 1988, un nouveau protocole établi par Paine permet d'atteindre des rendements de 80-90% (Figure 69).²⁰⁹

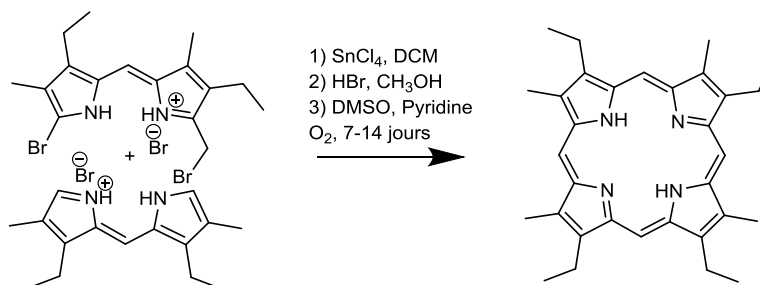


Figure 69. Synthèse de porphyrines utilisant des dipyrrométhènes selon Paine.²⁰⁹

- Synthèse « 3+1 »

La synthèse « 3+1 » consiste à faire réagir un tripyrrane avec un pyrrole afin de former un porphyrinogène. Le tripyrrane peut être préparé à partir d'un pyrrole ayant deux fonctions alcools. Taniguchi a montré que le tripyrrane peut réagir avec un autre diol pyrrolique pour former une porphyrine (après oxydation).²¹⁰ Hatscher et Senge ont modifié cette méthode en utilisant des aldéhydes à la place du diol, afin d'obtenir des porphyrines mono ou disubstituées en position *méso* avec des rendements dépendants des aldéhydes utilisés (entre 4 et 75%) (Figure 70).²¹¹

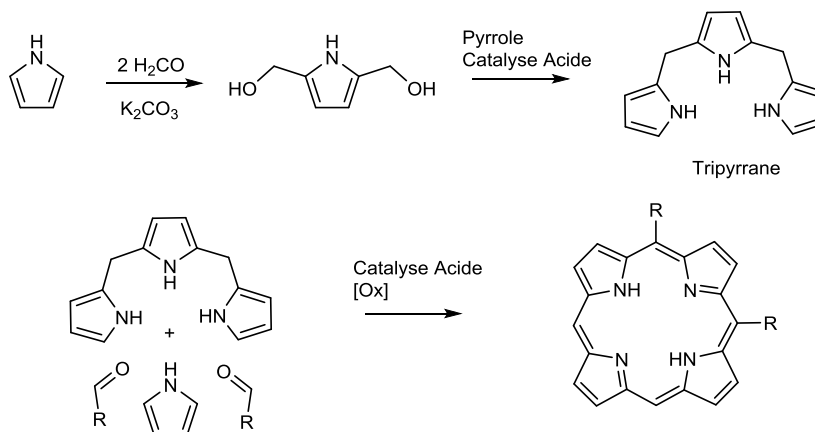


Figure 70. Préparation du tripyrrane et synthèse "3+1" d'après Hatscher et Senge.²¹¹

➤ **Obtention de porphyrine « ABCD »**

- Utilisation d'organolithiens

Les organolithiens sont des nucléophiles très réactifs à cause de la différence d'électronégativité importante entre l'atome de carbone et de lithium. Senge et coll. a développé une méthode permettant de fonctionnaliser un noyau porphyrinique afin d'obtenir une grande variété de porphyrine. Ainsi l'obtention de porphyrine ayant 4 groupements substitués différents

(« ABCD ») est possible, contrairement à la synthèse de Little.²¹² Cependant l'utilisation d'organolithiens entraîne toujours des conditions très strictes car ces réactifs peuvent se révéler être dangereux et non stables (Figure 71).

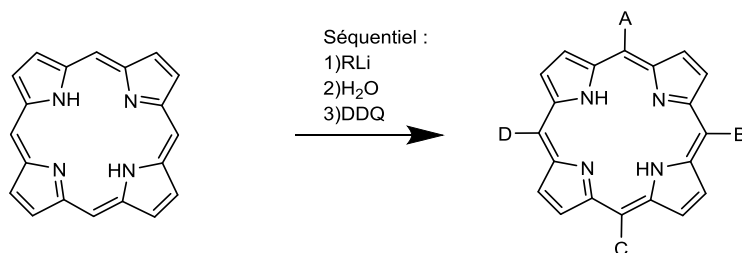


Figure 71. Fonctionnalisation d'une porphyrine avec des organolithiens.

- Précurseur de type « bilane »

Une autre stratégie pour obtenir des porphyrines « ABCD » consiste à utiliser un précurseur de type « bilane ». Ce réactif est constitué d'une chaîne tétrapyrrolique comprenant déjà les divers groupes substitués. Le bilane obtenu après de nombreuses réactions successifs peut être cyclisé et oxydé afin d'obtenir la porphyrine souhaitée (Figure 72). En 2007, Lindsey a montré que cette synthèse présentait de nombreux avantages. Leurs travaux se sont portés sur les conditions optimales de cyclisation du bilane. Ils ont pu atteindre un rendement de 65% sur la production d'une porphyrine « ABCD » en utilisant du bromure de magnésium et du DBU (1,8-DiazaBicyclo[5.4.0]Undéc-7-ène).²¹³ Cette étape finale offre un bon rendement, mais la longue synthèse du bilane doit être prise en compte afin de comparer le rendement global de cette synthèse aux autres.

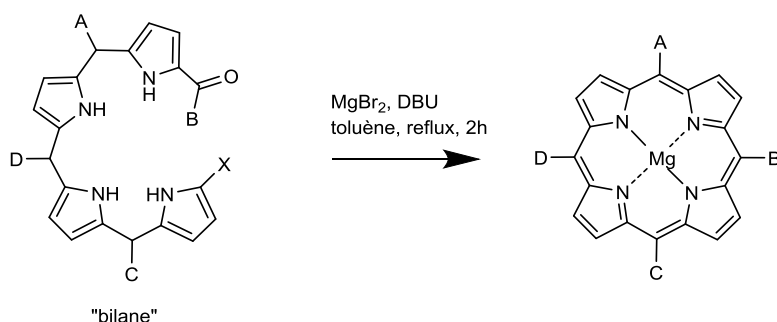


Figure 72. Synthèse d'une porphyrine "ABCD" à partir de bilane d'après Lindsey.²¹³

➤ Réduction des porphyrines

Les chlorines et les bactériochlorines sont des composés présentant une ou deux insaturations de moins que les porphyrines. La majorité des stratégies de synthèses de chlorine est basée sur la réduction de porphyrine. La première observation de ce phénomène a été faite par Fischer qui affirma avoir obtenu un mélange de chlorine et de bactériochlorine à partir d'une porphyrine traitée par du sodium dans de l'éthanol. Cependant, Eisner et son équipe seront les premiers à publier officiellement des travaux sur la réduction de l'octaéthylporphyrine par du sodium, en 1957.²¹⁴ Utilisant le même protocole qu'Eisner, Schlesinger réussit à réduire l'éthiohème (porphyrine d'origine naturelle).²¹⁵ Il obtint un rendement de 34% pour la chlorine et de 40% pour la

bactériorchlorine. En 1969, Whitlock proposa un nouveau protocole utilisant du *p*-toluènesulfonylhydrazine (*p*-TSH) permettant d'atteindre 72% de rendement (Figure 73).²¹⁶

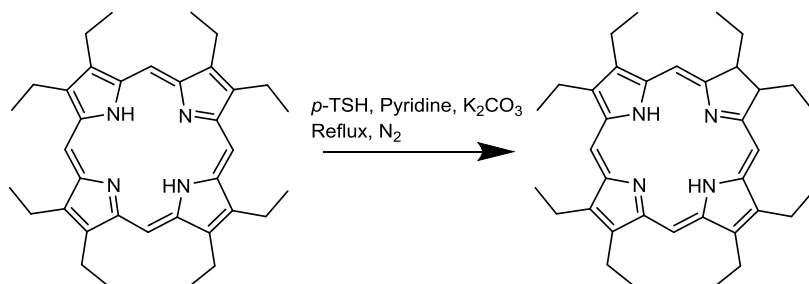


Figure 73. Réduction de l'octaéthylporphyrine en octaéthylchlorine selon Whitlock.²¹⁶

Malgré cette optimisation, un problème persiste lors de la formation de chlorine. Le milieu réducteur entraîne la formation de bactériorchlorine au détriment de la chlorine. L'une des solutions proposées consiste à favoriser la formation des bactériorchlorines qui seront ensuite oxydées sélectivement en chlorine à l'aide d'*o*-chloranil.²¹⁷

➤ Autres stratégies de synthèse

D'autres procédés permettent d'obtenir des chlorines à partir de porphyrines. Ces derniers diffèrent des simples réductions car ils permettent aussi d'inclure un nouveau groupe fonctionnel sur le macrocycle. Nous pouvons citer les travaux réalisés par Bonnett décrivant un protocole permettant d'obtenir des oxochlorines²¹⁸ (Figure 74–A) ou ceux de Callot utilisant des carbènes pour former des cyclopropylchlorines (Figure 74–B).²¹⁹ Une oxydation des porphyrines est aussi réalisable à l'aide de tétraoxyde d'osmium et permet de synthétiser une chlorine ayant deux fonctions hydroxyles en β ²²⁰ (Figure 74–C). Des stratégies ont également été élaborées pour obtenir des chlorines à partir de nitroporphyrines.^{221,222}

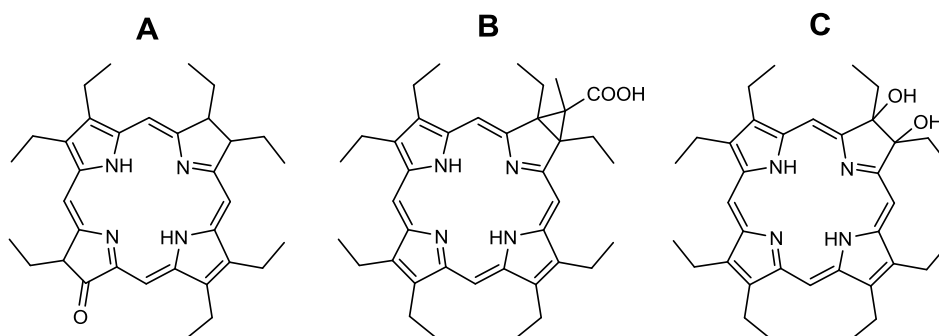


Figure 74. Différentes chlorines obtenues après traitement de l'octaéthylporphyrine. A : oxochlorine, B : cyclopropylchlorine, C : dihydroxychlorine.

La stratégie « 2+2 » reste aussi possible pour la formation de chlorine. Les travaux de Battersby ont montré que l'utilisation de deux entités dipyrroliques, dont l'une déjà réduite, permet d'obtenir la chlorine.^{223,224} D'un autre côté, Burns établit un protocole utilisant deux dipyrrométhanones.²²⁵ A l'instar des porphyrines, des études ont montré que la synthèse de chlorines pouvait être optimisée à l'aide des microondes.¹⁹⁶

III.2.5. Les phtalocyanines

Même si nous ne les avons pas utilisées dans cette thèse, les phtalocyanines appartiennent à la famille des photosensibilisateurs tétrapyrroliques et sont très étudiées. En 1907, Braun et Tcherniac ont observé la présence d'une impureté de couleur bleue lors de la mise en reflux d'une solution éthanoïque d'*o*-cyanobenzamide.²²⁶ Il faudra attendre l'année 1930 pour que la synthèse de plusieurs phtalocyanines métallées soit décrite par Linstead.²²⁷ Depuis, de nombreux protocoles ont été développés à l'instar des porphyrines, permettant d'obtenir des phtalocyanines symétriques ou asymétriques. Une majorité de ces stratégies repose sur la condensation de petites molécules, tel que des benzènes substitués en position *ortho*, des phthalonitriles, des phtalimides, des anhydrides ou acides phtaliques. Ces condensations nécessitent souvent la présence d'un métal afin d'assurer de meilleur rendement (Figure 75).²²⁸

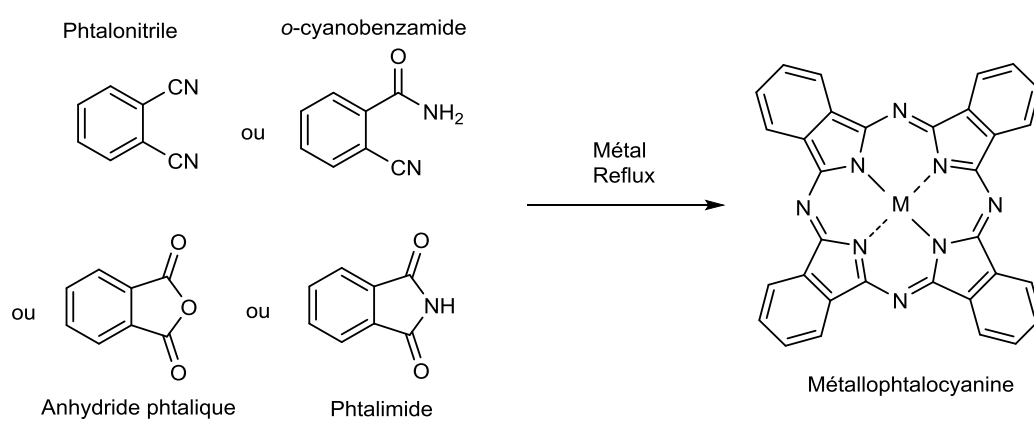


Figure 75. Exemples de réactifs permettant de former une métallophtalocyanine.

Malgré leur origine synthétique et leurs problèmes de solubilité, les phtalocyanines sont très présentes dans la recherche en PDT, car leurs propriétés photophysiques sont particulièrement intéressantes. En effet, les bandes d'absorption les plus fortes de ces PS se situent vers 650-700 nm et donc plus proches de la fenêtre thérapeutique que les porphyrines par exemple (Figure 76).

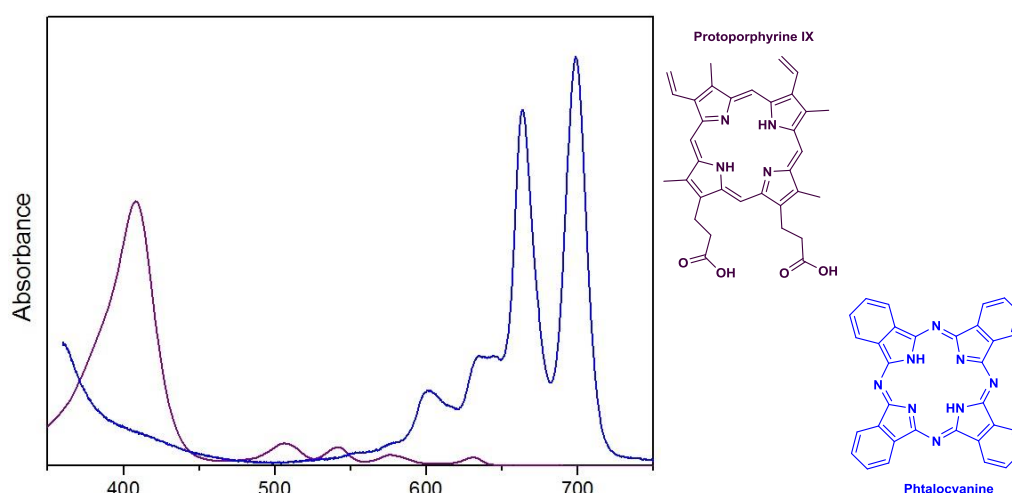


Figure 76. Spectre d'absorbance de la protoporphyrine IX dans le chloroforme (violet) et de la phtalocyanine dans le chloronaphtalène (bleu), d'après PhotochemCad.

Malgré ces propriétés photophysiques favorisant théoriquement les applications thérapeutiques, les problèmes de solubilité des phtalocyanines rendent les expérimentations difficiles. Ainsi de nombreux travaux ont pour objectif de coupler les phtalocyanines à des groupes hydrophiles par exemple.^{229–231}

Les synthèses de PS tétrapyrroliques sont apparues ces dernières années afin de pouvoir obtenir de nouvelles molécules actives répondant au problème de sélectivité récurant avec les premiers produits d'origine naturelle.

III.3. Les générations de photosensibilisateurs tétrapyrroliques

Hausmann fut indéniablement le premier à intégrer les photosensibilisateurs de type porphyrinique en PDT avec ses travaux sur l'hématoporphyrine en 1911. La cytotoxicité de ce PS fut ensuite confirmée par Meyer-Betz en 1913, notamment au cours d'expérimentations qu'il exerça sur son propre corps.^{232,233} Les découvertes sur la cytotoxicité de l'hématoporphyrine, après exposition à la lumière, offrirent une nouvelle opportunité aux chercheurs dans le combat contre le cancer. En effet, des 1924, Policard observa une fluorescence rouge chez certaines tumeurs, qu'il supposa être une accumulation de porphyrine.²³² Cette théorie fut confirmée par la suite par Auler et Banzer.²³⁴ Ainsi débuta les recherches basées sur l'hématoporphyrine afin de réduire les zones tumorales. De nombreux dérivés de ce PS furent obtenus, dont le Photofrin® qui est le premier photosensibilisateur introduit sur le marché en 1993 contre les tumeurs de la vessie.^{181,235} Même si le Photofrin® est toujours le PS le plus utilisé, il engendre certains problèmes. En plus de propriétés photophysiques contraignantes, cette molécule est très lentement éliminée par l'organisme du patient ce qui provoque une photosensibilité de ce dernier. Des précautions doivent être suivies plusieurs semaines après le traitement sous peine de brûlures. De plus, ce PS n'est pas sélectif des cellules tumorales.²³⁶ L'hématoporphyrine et ses dérivés sont considérés comme les PS de première génération en PDT. Les inconvénients du Photofrin® ont initié les études de nouveaux PS tétrapyrroliques appartenant à une deuxième génération. Au sein de cette catégorie, quelques molécules ont été autorisées cliniquement en PDT, notamment le Foscan®, la Visudyne®, le Tookad® et l'ALA.

Le Photofrin® a aussi montré des résultats intéressants contre les bactéries. Des expérimentations ont permis de décrire l'effet cytotoxique de ce PS sur les MRSA.²³⁷ Comme dans le cadre des applications anticancéreuses, ces résultats prometteurs entraînèrent le développement de nouveaux PS à des fins antibactériennes.

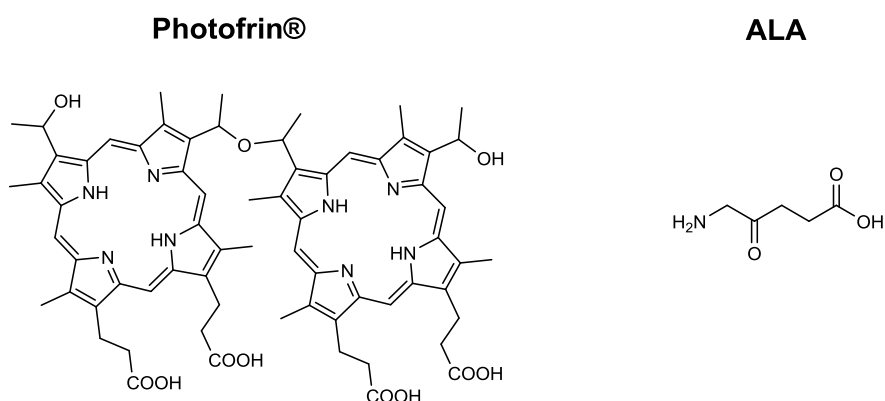


Figure 77. Deux molécules autorisées en PDT : Le Photofrin® et l'acide 5-aminolévulinique (ALA).

III.3.1. Optimisation de l'aPDT

L'adaptation de la PDT en tant que traitement anti-infectieux est apparue au cours des années 1990.²¹ Rapidement les expérimentations montrèrent une différence d'efficacité entre les bactéries Gram positif, très sensibles à l'effet de l'aPDT, et les bactéries Gram négatif, généralement assez résistantes.^{10,11} Ce contraste provient de la différence de structure des deux types de parois bactériennes (Chapitre 1.1.3, page 9). Les bactéries Gram positif, du fait de l'absence de la deuxième membrane plasmique, ne peuvent pas empêcher les PS d'atteindre le cytoplasme. D'un autre côté, les bactéries Gram négatif sont protégées de ces intrusions grâce à la présence de la deuxième membrane plasmique. Cette imperméabilité repose également sur les interactions ioniques : comme décrit précédemment, la paroi bactérienne Gram négatif a une charge anionique très forte, notamment à cause des LPS. Ainsi les PS anioniques et parfois neutres ont montré des efficacités extrêmement réduites du fait de la répulsion anionique. Etant donné le processus d'inactivation, basé sur la production des ROS et leur faible durée de vie, l'affinité du PS pour sa cible est essentielle.

A partir de ces observations, plusieurs stratégies ont émergé²³⁸ (Figure 78) :

- L'utilisation de photosensibilisateurs cationiques permet de favoriser une interaction entre le PS et la bactérie chargée négativement.¹²
- Un PS associé à un agent de ciblage, tel qu'un peptide ou polymère cationique²³⁹⁻²⁴¹, permet de guider la molécule active jusqu'à la bactérie. Il s'agit ici du principe de vectorisation.
- La paroi bactérienne peut être affaiblie par un agent, ce qui permettra l'intégration du PS dans le cytoplasme. Les agents les plus connus sont l'acide éthylène diamine tétraacétique²⁴² (EDTA) et un nonapeptide dérivé de la Polymyxin B.²¹

En plus de fortement augmenter l'efficacité de l'aPDT, les deux premières stratégies permettaient aussi une vectorisation des produits actifs vers les bactéries, ce qui pourrait aussi préserver les cellules humaines. En effet, à cause de la présence de stérols au sein de leur membrane, ces dernières sont considérées comme neutres et ont moins d'affinité pour les composés chargés.

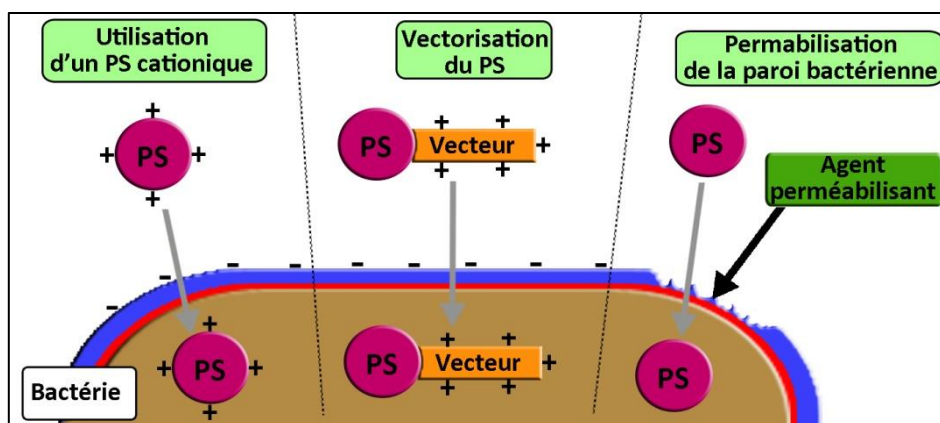


Figure 78. Les stratégies d'optimisation de l'aPDT.

III.3.2. Les composés photobactéricides

➤ A base de porphyrines

Afin d'obtenir des porphyrines cationiques, des groupements pyridyls peuvent être fixés en position méso du macrocycle. Ce groupe présente une amine tertiaire ayant un pKa à environ 5,23 et l'alkylation de cette dernière permet d'obtenir une charge cationique permanente, offrant une meilleure solubilité en milieu aqueux. De nombreuses études antibactériennes furent développées à partir de cette catégorie de porphyrines présentant des groupes pyridiniums. L'une d'entre elle s'intéressa à la relation entre l'efficacité de la molécule et le nombre de ces groupements.¹⁴ Bien que la 5,10,15,20-tétra(*N*-méthylpyridyl)-21H,23H-porphyrine (Figure 79-TMPyP) ait montré d'excellents résultats dont certains contre des biofilms bactériens²⁴³, cette étude exposa une meilleure efficacité de la part d'une porphyrine asymétrique comportant trois groupements pyridiniums et un pentafluorophényl (Figure 79-TriPydMeFPP). Les porphyrines comportant ce genre de groupements sont donc devenues incontournables en aPDT et font régulièrement office de référence en terme d'efficacité. Cependant, d'autres types de PS sont apparus, comme une porphyrine bi-cationique (Figure 79-XF70) qui a montré une efficacité à large spectre (notamment contre MRSA et *E.coli*) même en absence de lumière.^{244,245} En effet, la stratégie utilisant des porphyrines présentant des fonctions ammoniums ou des groupements pyridiniums, est en total adéquation avec l'utilisation des sels d'ammoniums en tant qu'agent antibactérien présent dans de nombreux détergents. En effet, de nombreuses souches (surtout Gram positif) se sont montrées vulnérables aux ammoniums quaternaires, grâce à leur capacité à fragiliser la paroi bactérienne (pouvant entraîner jusqu'à la lyse de cette dernière).²⁴⁶ Les porphyrines pyridiniums réunissent l'effet de l'aPDT et l'effet de ces sels, responsable d'une efficacité modérée à l'obscurité. Malheureusement, les molécules présentées ci-dessus ne sont pas encore au stade d'essais cliniques.

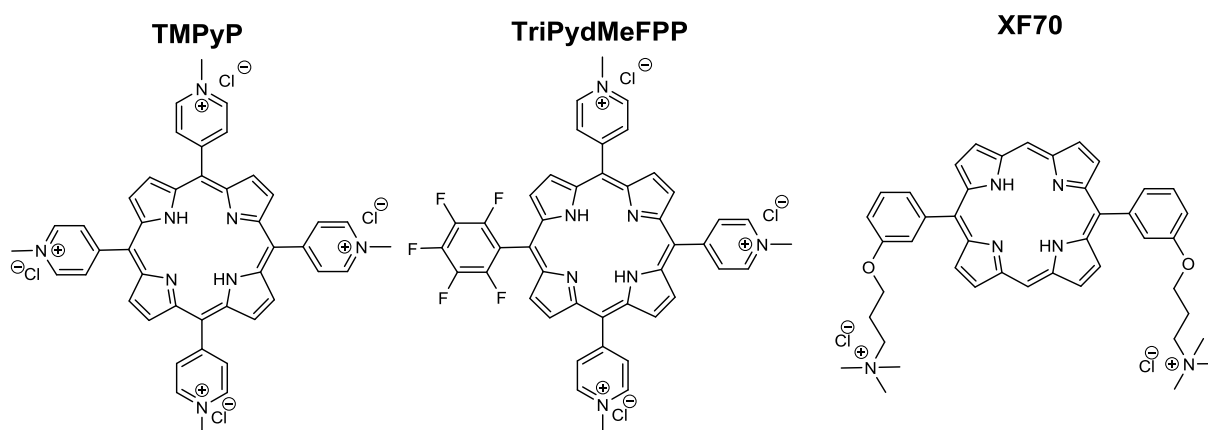


Figure 79. Exemples de porphyrines cationiques, de gauche à droite : TMPyP, TriPydMeFPP, XF70.

En effet, bien que cette catégorie de PS ait permis d'établir des records d'efficacité en aPDT, leur vectorisation et leur interaction avec les bactéries restent encore insuffisantes, ce qui peut entraîner des effets secondaires sur les cellules eucaryotes et une perte d'efficacité due à d'éventuels relargages. Conformément à la deuxième stratégie d'optimisation de l'aPDT, Reddi et coll. ont combiné des porphyrines cationiques à des peptides antimicrobiens (Apidaecine 1b, Magainine, Buforine) afin de pallier à ce manque d'interaction. Malheureusement, ils montrèrent que la combinaison de porphyrines cationiques avec les peptides entraînaient une perte d'efficacité sans améliorer l'interaction. Cependant, ils obtinrent de bons résultats avec des couplages à base des

porphyrines neutres, qui exposèrent une interaction forte pour les bactéries Gram négatif malgré une efficacité généralement en dessous des porphyrines cationiques et une interaction augmentée pour des cellules de l'épiderme humain (fibroblastes).²⁴⁷⁻²⁴⁹

➤ Les autres PS tétrapyrroliques antimicrobiens

Dans le but de se rapprocher de la fenêtre thérapeutique dans le cadre d'infections plus profondes, des chlorines et des bactériochlorines ont aussi été développées. Le Foscan® (Figure 80-Foscan), un PS de deuxième génération en PDT, a été étudié dans des travaux antibactériens. A cause de son insolubilité en milieu aqueux, ce dernier est utilisé sous forme encapsulé au sein de liposomes.²⁵⁰ Ce PS a obtenu de bons résultats contre *Enterococcus faecalis*, mais de bien meilleurs ont été retenus lorsque le liposome a été couplé à des agents de vectorisation tel que des groupes cationiques²⁵⁰, des lectines spécifiques²⁵¹ ou encore un peptide antimicrobien.¹²¹ Confirmant de nouveau l'intérêt de la vectorisation, des dérivés de chlorine-e6 (Figure 80-c6) ont montré de très bons résultats.^{239,252,253} Ce PS couplé à des agents tel qu'une polyéthylèneimine (PEI), une polylysine ou un anticorps ont permis d'inactiver des nombreuses souches dont *S.aureus*, *A.baumannii* et *P.aeruginosa*. Ces résultats prometteurs et l'origine naturelle de ces PS ont permis à ces molécules d'être appliqués *in vivo*. La confirmation de son efficacité par des essais sur souris et sur chiens ont récemment fait passer la chlorine-e6 à l'étape clinique.^{254,255} L'utilisation de lumière infrarouge afin de désinfecter les plaies est assez controversée car l'inactivation bactérienne doit essentiellement se dérouler en surface de zones infectées et donc la nécessité d'irradier en profondeur en aPDT n'est pas indispensable. C'est l'une des raisons pour laquelle il n'existe que très peu de travaux utilisant les bactériochlorines (en plus d'être facilement oxydables). Cependant on retrouve quelques études basées sur le même principe que les porphyrines cationiques, avec des bactériochlorines efficaces présentant des fonctions ammoniums ou des groupements pyridiniums.^{256,257} (Figure 80-THPTS)

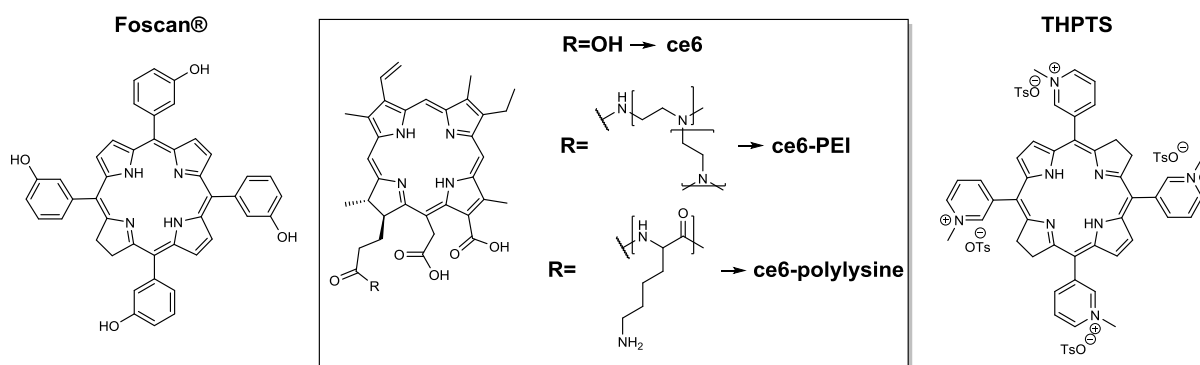


Figure 80. Quelques chlorines et bactériochlorines antibactériennes, de gauche à droite : Foscan®, dérivés de chlorine-e6 (ce6), THPTS.

Une phtalocyanine cationique (Figure 81-Zn-PPC) a montré de bons résultats sur *E.coli*, notamment grâce à sa capacité à remplacer les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} stabilisant la membrane externe.¹² Cependant son efficacité fut surpassée par une autre phtalocyanine cationique (Figure 81-RLP068), qui a depuis confirmé son utilité lors d'essais *in vivo* sur des souris infectés par MRSA.²⁵⁸⁻²⁶⁰

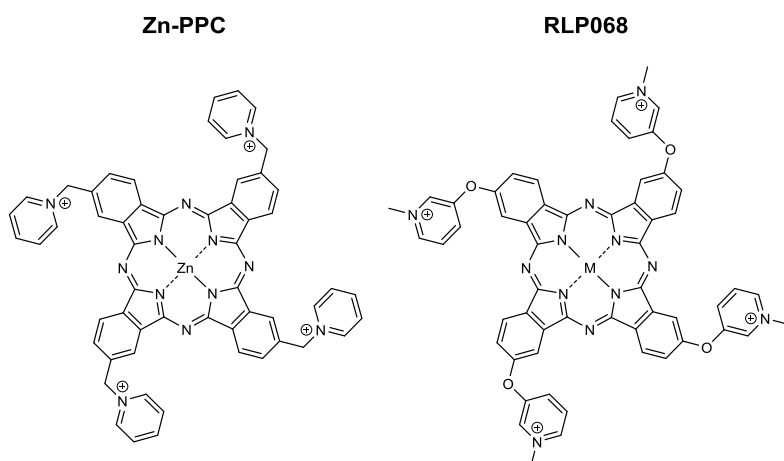


Figure 81. Exemples de phtalocyanines cationiques : Zn-PPC et RLP068.

Le tableau récapitulatif ci-dessous permet de comparer de manière non-exhaustive les résultats des PS antibactériens cités dans ce chapitre.

Tableau 1. Récapitulatif non-exhaustif des PS pour l'aPDT.

Molécule (Figure et Page)	Famille	Type de Lumière	Activité à large spectre	Essais validés (Phases)
Efficacité élevée				
TMPyP (Figure 79 - 64)	Porphyrine	Rouge ou bleue	Oui	<i>In vitro</i>
TriPydMeFPP (Figure 79 - 64)	Porphyrine	Rouge ou bleue	Oui	<i>In vitro</i>
XF70 (Figure 79 - 64)	Porphyrine	Rouge ou bleue	Oui	<i>Ex vivo</i>
C6-polylysine (Figure 80 - 65)	Chlorine	Rouge	Oui	<i>In vivo</i>
C6 (Figure 80 - 65)	Chlorine	Rouge	Oui	Cliniques
Zn-PPC (Figure 81 - 66)	Phtalocyanine	Rouge	Oui	<i>In vitro</i>
RLP068 (Figure 81 - 66)	Phtalocyanine	Rouge	Oui	<i>In vivo</i>
Efficacité moyenne				
PPIX via ALA (Figure 57 - 50)	Porphyrine	Rouge ou bleue	Non	Cliniques
Photofrin® (Figure 77 - 62)	Porphyrine	Rouge ou bleue	Non	Cliniques
Foscan® (Figure 80 - 65)	Chlorine	Rouge	Non	Cliniques
THPTS (Figure 80 - 65)	Bactéριοchlorine	Infrarouge	Non	<i>In vitro</i>
MB (Figure 46- 44)	Phenothiazinium	Rouge	Oui	Cliniques
TBO (Figure 35 - 37)	Phenothiazinium	Rouge	Oui	Cliniques
Méladinine® (Figure 42 - 43)	Psoralène	Ultraviolet A	Oui	Cliniques
cBODIPY (Figure 50 - 45)	BODIPY	Verte	Oui	<i>In vitro</i>
Efficacité réduite				
Curcumine (Figure 43 - 43)	Curcuminoïde	Bleue	Non	Cliniques
Riboflavine (Figure 44 - 43)	Flavine	Bleue	Incertain	Cliniques
Hypéricine (Figure 41 - 42)	Pérylènequinone	Jaune	Non	<i>In vitro</i>
ICG (Figure 49 - 45)	Indocyanine	Infrarouge	Non	Cliniques
Erythrosine (Figure 47 - 44)	Xanthène	Verte	Non	Cliniques

IV. Objectifs du travail

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont pour objectif de combiner la thérapie photodynamique antimicrobienne avec la prophylaxie antibiotique.

Alors que la polymyxine est utilisée comme un antibiotique de derniers recours, ce peptide a montré la capacité d'interagir fortement avec le lipide A des LPS et de perméabiliser les membranes bactériennes. D'un autre côté, après plusieurs années de recherche en aPDT, l'élaboration de nouveaux photosensibilisateurs à base de porphyrines a permis d'obtenir un effet photobactéricide sur des nombreuses souches, et tout particulièrement sur les bactéries Gram positif. Malheureusement, ces PS ne montrent pas de forte interaction pour les bactéries Gram négatif, malgré une efficacité reconnue de la part des dérivés cationiques. Dans le chapitre 2, nous avons mis en avant l'une des stratégies d'optimisation de l'aPDT, basée sur l'utilisation d'agent vecteur associé aux PS. Ainsi, certaines études utilisent des peptides antimicrobiens afin d'améliorer la capacité de ciblage des PS neutres.^{247–249,261}

L'association directe de PS et de la polymyxine pourrait permettre d'obtenir un composé photobactéricide d'une grande efficacité et ayant une affinité pour les bactéries, préservant ainsi les cellules eucaryotes après irradiation. De plus, l'efficacité d'un tel composé pourrait offrir un large spectre d'activité puisque l'aPDT a déjà montré son efficacité sur les bactéries Gram positif, et que le couplage avec la polymyxine permettrait une meilleure activité et une meilleure vectorisation vers les bactéries Gram négatif, conformément aux travaux de Nitzan.²¹ Plusieurs travaux ont été réalisés autour de l'idée de cette association et sont présentés dans les chapitres suivants :

- Une étude sur de nouvelles porphyrines cationiques a tout d'abord été réalisée (Chapitre 3, page 69). Dans cette partie, de nouveaux PS cationiques ont été synthétisés, caractérisés et testés afin d'offrir de nouvelles données permettant d'accompagner les études ultérieures dans le choix de la porphyrine cationique et du type de fonction en cas de couplage avec d'autres composés.

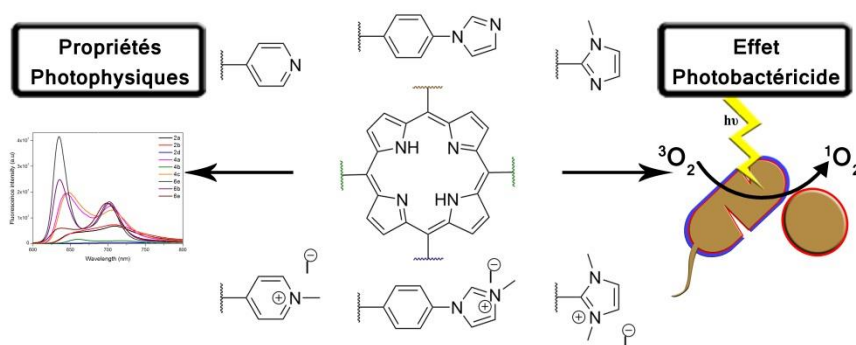


Figure 82. Schématisation de la première étude.

- Ensuite, de nouvelles molécules associant une porphyrine cationique et des dérivés de polymyxine ont été étudiées (Chapitre 4, page 102). Dans un premier temps, un nouveau composé basé sur une polymyxine active et proche de la structure d'origine a été élaboré afin d'assurer une interaction forte avec la paroi des bactéries Gram négatif. Puis, une étude additionnelle utilisant un dérivé de polymyxine à base de lysine a été réalisée afin de modifier l'activité du précédent composé.

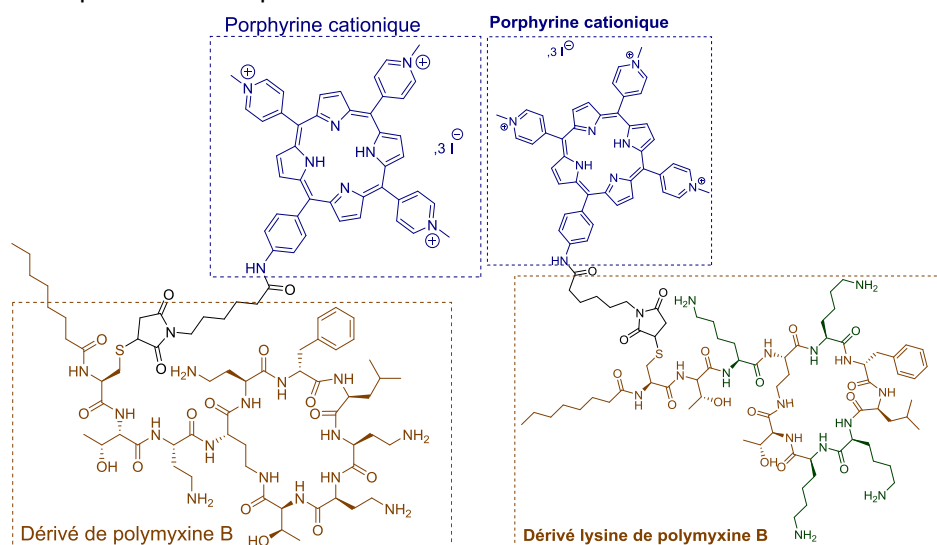


Figure 83. Structures chimiques des différents couplages.

- Enfin, la dernière partie traitera de l'élaboration d'un nouveau matériel photobactéricide (Chapitre 5, page 152). Des nanocristaux de cellulose ont été partiellement recouverts de PS d'origine naturelle (chlorine-e6) et de polymyxine B commerciale. Ces nanoparticules ont montré de bons résultats ce qui pourrait permettre leur intégration au sein de formulations.

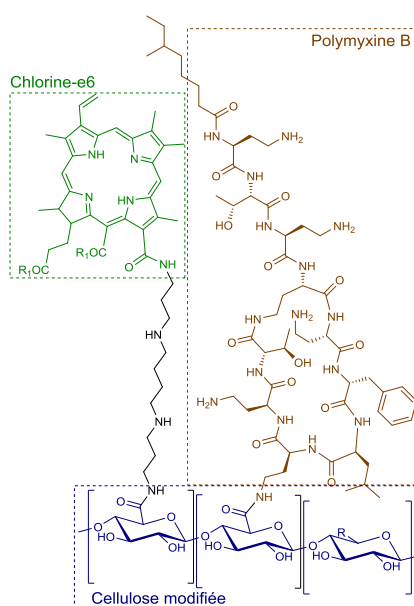


Figure 84. Structure des nanocristaux finaux $CNCs_{c6-PMB}$ (3).

Chapitre 3 : Caractérisation de porphyrines cationiques pour des applications photobactéricides

Dans cette partie, nous proposons une étude comparant la synthèse, la réactivité, les propriétés photophysiques et l'activité photobactéricide de différentes porphyrines cationiques.

I. Principe

En plus d'une bonne solubilité en milieu aqueux, les photosensibilisateurs cationiques sont généralement considérés comme des références en terme d'efficacité en aPDT. Il en est donc de même pour les porphyrines cationiques qui sont décrites dans de nombreux travaux. Comme ces PS ont suscité un intérêt sous leur forme symétrique (ou A4), des chercheurs ont proposé d'utiliser des porphyrines cationiques portant une fonction particulière (A3B), afin de permettre d'associer ces dernières à un vecteur ou un matériau. Cependant, il existe très peu de données sur les conséquences qu'engendre la modification structurale sur les propriétés photophysiques de ces PS. De plus, alors que ces PS sont généralement constitués de groupe *N*-méthylpyridyl (ou pyridinium) en position *meso*, il existe peu d'études qui traitent de porphyrines portant des groupements *N*-méthylimidazol (ou imidazolium) en aPDT. Etant donné que la littérature associe l'efficacité des PS à leur charge cationique, de telles porphyrines pourraient montrer un intérêt pour la photoinactivation de bactérie.

Dans cette étude, nous nous proposons d'étudier de nouvelles familles de porphyrines cationiques de type phénylimidazol (**3**), phénylimidazolium (**4**), méthylimidazole (**5**) ou méthylimidazolium (**6**) (Figure 85). Les capacités photobactéricides de chaque famille ont été comparées afin de soutenir l'utilisation des porphyrines pyridinium ou peut-être afin de mettre en avant une nouvelle famille de porphyrine. Une étude photophysique a été intégrée, comparant les porphyrines A4 à différentes porphyrines A3B1 (ou A2B2) selon 3 types de groupements fonctionnalisés (« carboxylic acid », « oxyethanoic acid » et « amine »). L'objectif de ce travail était d'offrir de nouvelles données permettant d'accompagner les études ultérieures dans le choix de la porphyrine cationique et du type de fonction en cas de couplage.

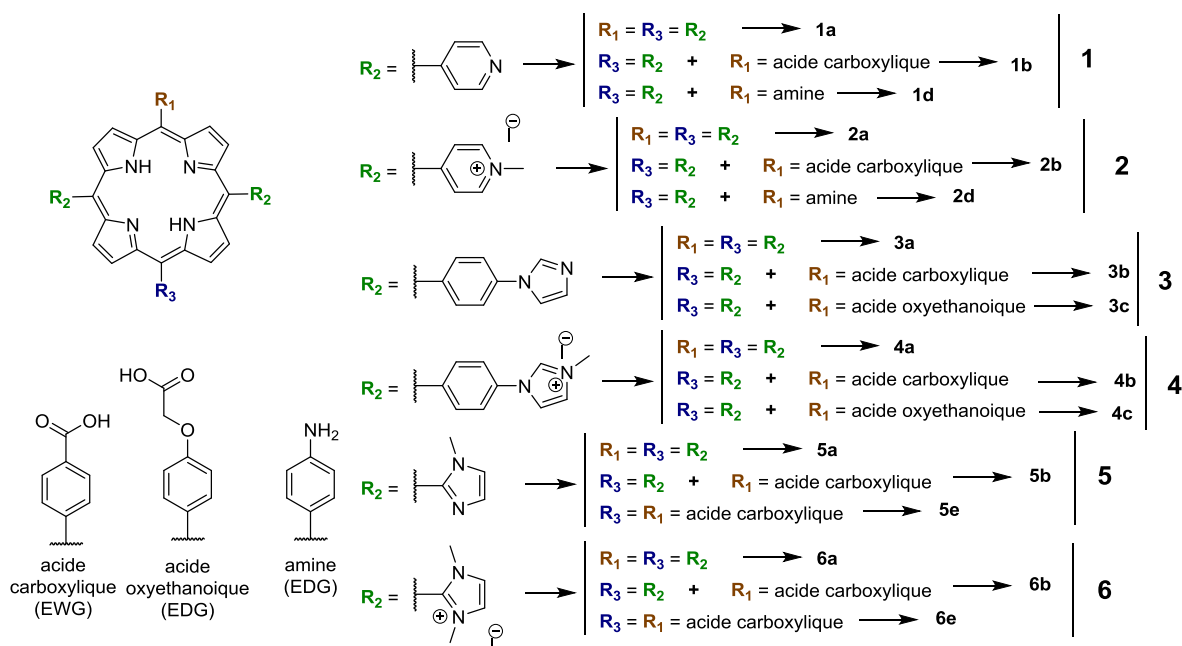


Figure 85. Les différentes porphyrines cationiques étudiées.



Journal Name

ARTICLE

Photophysical properties of cationic porphyrins for photodynamic antimicrobial chemotherapy

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Florent Le Guern,^a Stéphanie Leroy-Lhez,^a Issabayev Yerzhan,^b Yesmurzayeva Nurlykyz,^b Tan-Sothea Ouk,^a Phillipe Arnoux,^b Céline Frochot,^b Vincent Sol^{*a}

Despite advances achieved over the last decade, infections caused by multi-drug resistant bacterial strains are increasingly important societal issues that need to be addressed. New approaches have already been developed in order to overcome this problem. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) could provide an alternative to fight infectious bacteria. Many studies have highlighted the value of cationic photosensitizers in order to improve this approach. In this study, the well-known *N*-methylpyridyl (pyridinium) porphyrin family has been compared to new families of cationic porphyrins in PACT. Methylimidazolium and phenylimidazolium porphyrins have shown different behaviors in their synthesis, their photophysical properties and their biological activities. These new photosensitizers may offer good alternative to the classical pyridinium porphyrins for the photoinactivation of bacterial strains. This study may also ease preliminary studies which attend to couple a cationic porphyrin to different molecule through the formation of an amide function.

Introduction

Since the introduction of penicillin in the 1940's, the era of antibiotics was considered as miraculous, given that these treatments had significantly decreased the number of deaths resulting from bacterial infections.¹ Despite the well-known rise of antibiotic-resistant bacteria, these drugs have been wrongly used all around the world, due in particular to faulty communications and common beliefs.² In addition to antibioresistance, leading to the emergence of superbugs or multidrug resistant (MDR) strains, the pace of new antibiotic discoveries has gradually slowed down in the recent years.^{3,4} The issues due to microbial resistance are currently recognized worldwide by health organizations.⁵ Consequently, alternative approaches to reduce the impact of microbial infections have been investigated.

Around the world, laboratories have focused their attention towards a recent and promising alternative to antibiotics, namely photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). This technique relies on the light activation of photosensitizers (PS) in presence of molecular oxygen (³O₂). Under appropriate light irradiation, PS activation leads to the production of singlet oxygen (¹O₂) by energy transfer, or oxygen radicals by electron

transfer. These species, called reactive oxygen species (ROS), are able to rapidly react with a large panel of substrates (proteins, lipids, nucleic acids). The number and diversity of the cellular damages greatly limit the rise of bacterial strains that resist to this treatment.^{6,7} Owing to their very short life span, ROS do not end up in the waste system unlike common sanitizers, and are thus environmentally friendly.^{6,8} PACT was first tried out against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), with promising results.⁹ Unfortunately, Gram-negative bacteria have shown a poor sensitivity to the firstly studied PS, mainly due to their outer membrane.^{10,11} Although PACT exhibits many advantages for bacterial photoinactivation, its lack of specificity is a major drawback, since it causes damages to the host tissues as well.¹² Nevertheless, it has been shown that cationic PS exhibited a good affinity for bacteria by interacting through electrostatic interactions, with the highly negatively charged cell wall components such as lipoteichoic acid (LTA) in Gram-positive and lipopolysaccharide (LPS) in Gram-negative bacteria.^{13–15} Thus, cationic porphyrins displayed photoinduced activity against a broad spectrum of bacteria,^{15,16} and this trend was also confirmed with several families of cationic PS.^{17–19}

^a Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN), EA 1069, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France.

^b Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274 CNRS, ENSIC, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [NMR Analyses]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

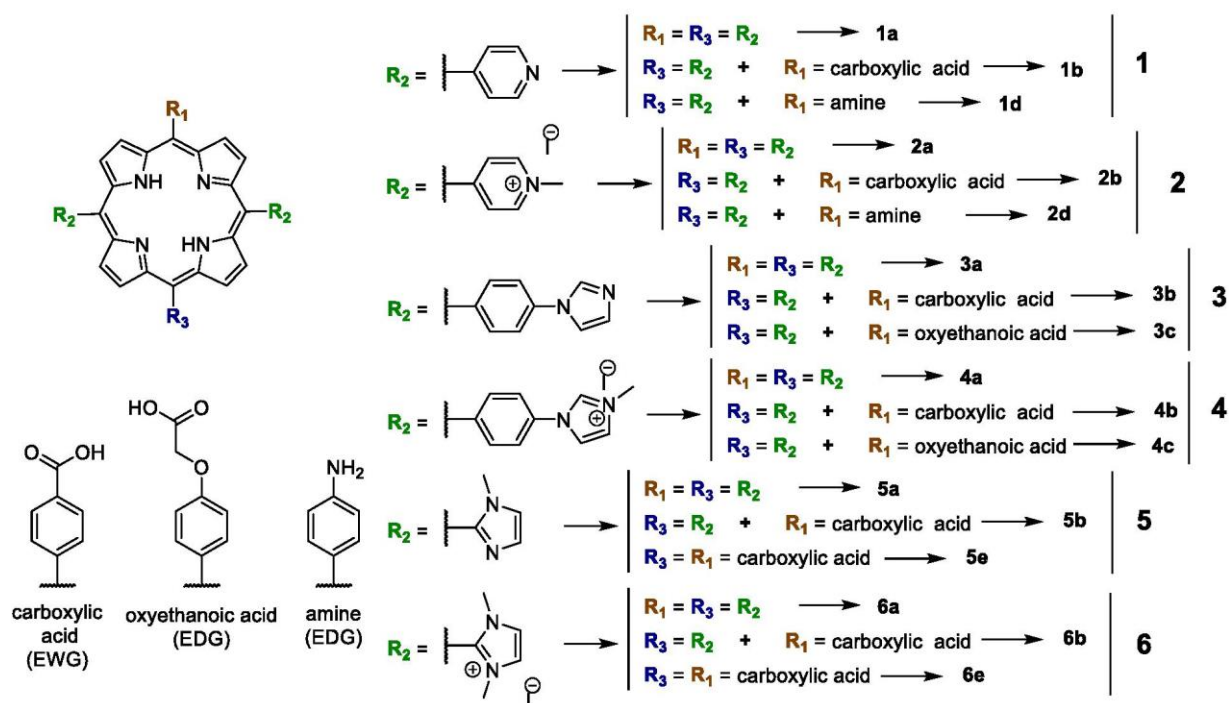


Figure 1. Studied cationic porphyrins

Since the cationic porphyrins have proven their relevance in PACT, those PS have been used across many studies.^{14,15,20,21} As members of the tetrapyrrolic photosensitizers, these compounds can be classified according to the functions substituted at the *meso* positions: A_4 porphyrins are related to symmetric and uniform compounds, A_3B to asymmetric compounds with one *meso* position substituted by a different function and A_2B_2 to porphyrins equally substituted by two different functions (*cis* or *trans* isomers).²² Unfortunately, a lack of data comparing cationic porphyrins may be problematic at the beginning of a study. Except for aryl porphyrins carrying ammonium derivatives,^{23,24} these cationic PS are generally obtained by using *N*-methylated pyridyl (called also pyridinium) groups.^{14–16,25,26} Pyridinium porphyrins, as well as aryl porphyrin carrying ammonium derivatives, are well-known in PACT since these PS have shown very good activities against several strains. As their efficacy is partially due to their quaternary ammonium functions¹⁵, porphyrins carrying imidazole groups should also show interesting results. Anyway, even if imidazole metalloporphyrins have been studied for their conductivity properties^{27–29} or their antioxidant potencies,³⁰ their photocytotoxicity have rarely been spotlighted^{31,32} and especially in PACT. In the same way, phenylimidazole porphyrins were also presented in few communications, but never as A_4 porphyrins.³³ Thus, herein we report the synthesis, photochemical and photophysical characterization of six different families of porphyrin in order to compare their efficiency towards different bacterial strains and to highlight a new efficient family or consolidate the current use of pyridinium porphyrins in PACT. To support further potential studies using A_3B porphyrins, the photophysical properties of such cationic PS have been

established. In connection with our research studies in PACT,^{34–39} we have devised synthetic routes to obtain porphyrin derivatives, which have designed to selective target bacteria. It occurred to us that amine or carboxylic acid functions are very important to form an amide bond between the PS and the targeting agents. Thus, these functions have been distributed among the families of porphyrins synthesized in the study (Figure 1).

Results and discussion

Synthesis and characterization

Studied cationic porphyrins were successfully prepared using the Little⁴⁰ and Adler-Longo⁴¹ conditions. Six families have been gathered following their *meso*-substituted groups: **1**: pyridyl, **2**: *N*-methylpyridyl (or pyridinium), **3**: phenylimidazole, **4**: phenylimidazolium, **5**: methylimidazole and **6**: methylimidazolium. In these groups, A_4 porphyrins were firstly obtained (**1a** to **6a**). Then, in each main family, A_3B porphyrins were synthesized to observe the consequence of different functions on the photophysical properties. Generally, these functions are included into the porphyrin structure by mixing a functionalized benzaldehyde with others aldehydes during the synthesis, following the protocol of Little. Different functionalized benzaldehydes have been chosen to provide reactive groups after deprotection, respectively methyl 4-formylbenzoate for an acid carboxylic function (**b**, electron-withdrawing group (EWG)), 4-acetamidobenzaldehyde for a primary amine function (**e**, electron-donor group (EDG)) and ethyl 4-formylphenoxyacetate for an acid carboxylic function on a hydroxyl based porphyrin (**c**, EDG). Finally, A_2B_2 porphyrins were also prepared to support the prospective

works using two coupling agents (**5e** and **6e**). In order to offer a global and efficient procedure with all porphyrins, only protected functionalized aldehydes have been included in these syntheses. These protections ease the purification steps, which have the reputation to be difficult. Indeed, the purification of porphyrins carrying a free acid carboxylic function mainly depends on the used silica gel. 4-acetamidobenzaldehyde was chosen to obtain porphyrins carrying an amine function, but these compounds may be also provided by using a 4-nitrobenzaldehyde according to different studies.^{42,43} *N*-methylated A₃B porphyrins carrying a carboxylic acid function were directly prepared from the respective A₃B porphyrins (**1b** to **2b**, for example), since this group only reacts with iodomethane under its carboxylate form. To obtain the *N*-methylated A₃B porphyrin carrying a primary amine **2d**, the *N*-methylation had to be applied before the deprotection to avoid any methylation of the primary amine. Because the solubility of this porphyrin in water and the impossibility of washing out the excess salts, TFA have been used instead of HCl for the deprotection since this acid may be totally removed by successive evaporations and freeze-drying procedures. Lastly, the different deprotection steps have been applied with good yields.

The porphyrin syntheses have presented some yield fluctuations, depending on the kind of family and on the functionalized aldehyde. The synthesis of pyridyl porphyrins **1** is well-known from the literature, whereas the phenylimidazole **3** and methylimidazole porphyrins **5** are more uncommon in PACT. Unfortunately, the outcoming yield for **5a** is lower than to the data from the literature (generally about 10-12%) because of the interaction of the compound with the used silica gel. Thus, alumina is usually advised for such compounds.³¹ **3a** was the easiest porphyrin to purify as its yield was more sufficient. Whereas the formation of A₃B porphyrins from **1** and **5** leads to similar yields, asymmetric porphyrins from **3** have been obtained with very good yields, which are 2 or 3 times higher than others. Carboxylic porphyrins (**b** and **c**) have been recovered with similar results, but the use of 4-acetamidobenzaldehyde have induced a significant decrease of the yield. Furthermore, methyl 4-formylbenzoate seemed to be very reactive as the presence of all possible porphyrins were observed into the crudes (B₄, AB₃, A₂B₂) in despite of the advised reactant proportions for A₃B synthesis (3 eq of A, 1 eq for B).

Different solubilities were observed for the porphyrins. Generally, phenylimidazole porphyrins **3** were less soluble than other porphyrins, even if a high purity of porphyrin usually involves some dissolving issues which can be resolved by adding few amount of methanol into usual apolar solvents. *N*-methyl porphyrins are supposed to be water soluble but a primary dissolution into a DMSO solution is strongly advised to avoid any incomplete dissolution. Because of the solubility issues, the analysis of porphyrins may appear difficult in classical solvent. To obtain NMR analysis of **1**, **3**, and **5**, a mixture with CDCl₃ and CD₃OD have been used which may involves some peak shifting and multiplications according to the device. Fortunately, all porphyrins were analyzed by MS

(ESI+) and ¹H NMR (Figure S1 to S18). Due to the asymmetric methylimidazole group in **5**, different stereoisomers were actually obtained. Thus, NMR spectra of these porphyrins **5** have shown some peak multiplications, especially for those of the protons of the *N*-methyl. The total *N*-methylation of the imidazole group, to reach **6**, led to symmetric signals which may suppose the equal repartition of the positive charge in the imidazole.

The carboxylic acid's reactivity of the different water-soluble porphyrins was also investigated. The *N*-methylation of **1b** (to reach **2b**) induced a negative contribution to the reactivity of the carboxylic function. Indeed, **2b** has shown a poor reactivity in different conditions (buffers or DMSO), in spite of the use of different catalysts (carbodiimide or uronium salts). Thus, in order to obtain a conjugate based on **2a**, the coupling should be applied before the *N*-methylation, which implies that the new moiety should not react with iodomethane afterward. Otherwise, the carboxylic acid of **1b** should be activated by coupling an *N*-hydroxysuccinimide group before the *N*-methylation.⁴⁴ On the other hand, others porphyrins (**4b**, **4c**, **6b**, **6e**) were able to react with these catalysts, leading then to the formation of an amide function in presence of a primary amine.

Photophysical properties

The photophysical properties of the different porphyrins have been investigated in ethanol (Figures 2-3 and Tables 1-2). For cationic porphyrins, additional analyses were carried out in deuterium oxide (D₂O) in order to correlate with the following biological trials (Figure 3-D).

Despite few discrepancies due to the poor solubility of pyridinium porphyrins in ethanol, absorption spectra of **1** and **2** are fairly similar (Figure 2). Contrariwise, the type of function has a consequent impact on the fluorescence emission of these porphyrins (Figure 3-A). Surprisingly, fluorescence spectra of **1a** and **2a** are similar in ethanol, which indicate that the different substituents (pyridyl or *N*-methylpyridinium) have no significant influence on the excited state properties in this solvent. The lifetimes are also consistent with the usual data of porphyrins (*ca.* 10 ns). However, for these porphyrins, the band Q(0,0) is less intense than the band Q(0,1) (ratio Q(0,0)/Q(0,1)<1), which differs from the usual fluorescence emission spectra of porphyrins (Table 2). According to Vergeldt and co-workers⁴⁵, this discrepancy is due to the electron-accepting properties of pyridyl groups which has a direct influence on the Q(0,0) bands. Thus, the presence of one "carboxylic acid" group instead of a pyridyl or pyridinium group into **1b** and **2b** respectively leads to a ratio Q(0,0)/Q(0,1)>1. Moreover, a red-shift of the fluorescence emission of **2b** is observed, which is coherent with its absorption spectrum. In D₂O, in addition to a lower fluorescence quantum yield, the ratio Q(0,0)/Q(0,1) has passed below 1 for **2b**, and the emission spectrum of this compound became then very similar to the well-known structureless broad band obtained spectrum of **2a** in D₂O.⁴⁵ As the fluorescence emission of **2a** and **2b** are similar in D₂O, it could mean that the "carboxylic acid" group has equal electron-

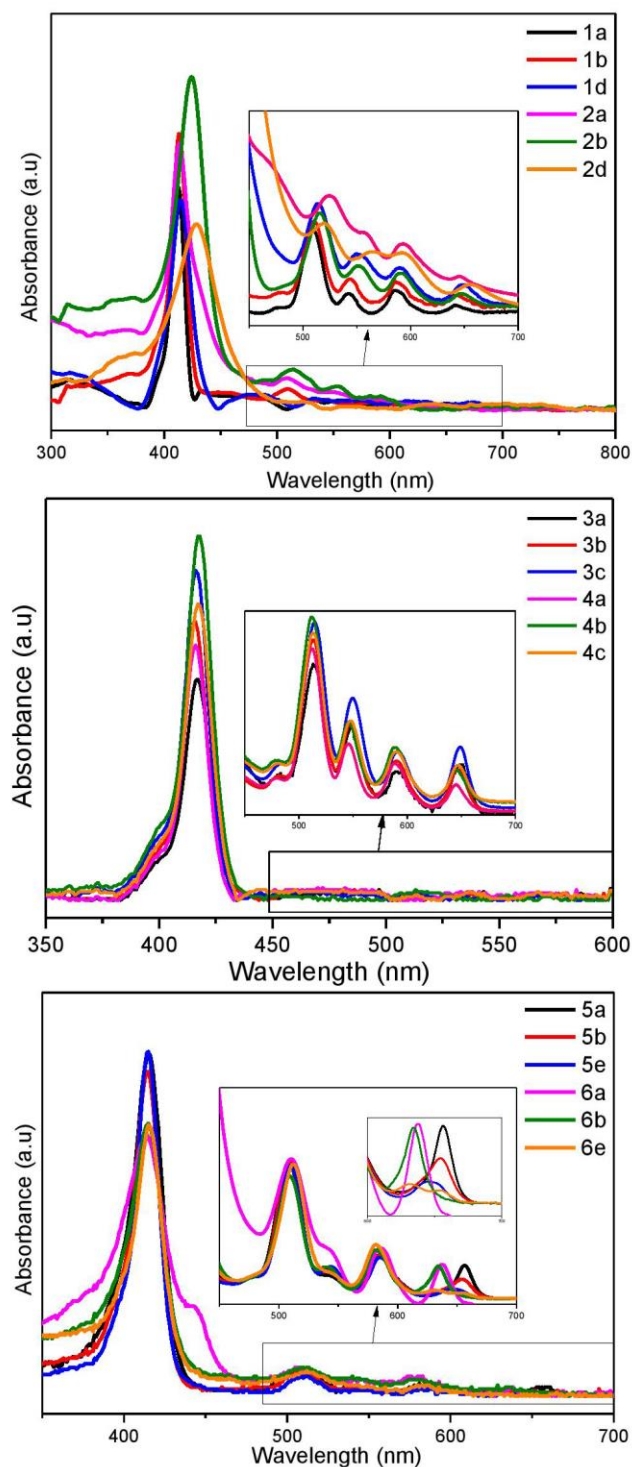


Figure 2. Absorption spectra of the different porphyrins in ethanol

accepting properties than the pyridinium group in this solvent. These involvements on the fluorescence and the shorter lifetimes may also indicate a new non-radiative deactivation path. On the other hand, the aniline group into **1d** and **2d** causes a drastic quenching of the fluorescence in both solvents. Indeed, primary amines (because of their lone-pair) are well-known to favor intramolecular electron-transfers

Compd	λ_{max} (nm) ($\epsilon \log \text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)				
	Soret	$Q_y(1,0)$	$Q_y(0,0)$	$Q_x(1,0)$	$Q_x(0,0)$
1a	414 (3.92)	509 (2.56)	546 (2.00)	588 (2.00)	645 (1.75)
1b	415 (5.10)	512 (3.86)	544 (3.51)	589 (3.44)	645 (3.15)
1d	416 (4.82)	519 (3.93)	555 (3.78)	594 (3.67)	655 (3.54)
2a	415 (5.16)	524 (4.44)	556 (4.26)	594 (4.19)	646 (3.87)
2b	426 (5.40)	517 (4.26)	554 (3.91)	592 (3.82)	649 (3.43)
2d	428 (5.16)	520 (4.10)	566 (3.93)	593 (3.92)	657 (3.54)
3a	417 (3.71)	516 (2.22)	558 (2.09)	592 (1.97)	650 (1.91)
3b	417 (5.14)	515 (3.80)	549 (3.55)	592 (3.36)	648 (3.28)
3c	418 (5.23)	516 (4.07)	555 (3.92)	593 (3.78)	652 (3.74)
4a	416 (5.62)	513 (4.24)	547 (3.86)	590 (3.71)	645 (3.45)
4b	417 (5.67)	513 (4.30)	547 (3.94)	590 (3.78)	646 (3.57)
4c	418 (5.57)	514 (4.20)	549 (3.89)	591 (3.69)	649 (3.55)
5a	416 (5.44)	509 (4.24)	543 (3.48)	585 (3.75)	658 (3.63)
5b	415 (5.28)	510 (4.04)	543 (3.36)	586 (3.54)	655 (3.20)
5e	415 (5.45)	511 (4.12)	545 (3.52)	586 (3.62)	650 (3.01)
6a	415 (4.58)	510 (3.41)	545 (3.25)	582 (3.32)	637 (3.08)
6b	416 (5.42)	510 (4.23)	542 (3.66)	583 (3.86)	634 (3.69)
6e	417 (5.59)	514 (4.35)	544 (3.68)	583 (3.97)	632 (3.21)

Table 1. Wavelengths of absorption (λ) and their molar attenuation coefficient (ϵ) in ethanol

(IET), which cause emissions quenching.⁴⁶ The lifetimes (shorter and bi-exponential for **1d** and even not determined for **2d**) are consistent with this behavior. The decrease of pH (drops of acid acetic, data not shown) induces a partial restoration of **2d** fluorescence emission.

The porphyrins **3** and **4** have similar absorption profile. Moreover, their fluorescence emission spectra are also similar to a classic porphyrin pattern showing a stronger $Q(0,0)$ band (Figure 3-B). The families **3** and **4** have close and comparable photophysical properties to those of TPP.⁴⁷ However, porphyrins **4** have a lower fluorescence quantum yield than others porphyrins in ethanol. In D_2O , unlike **2**, the ratio $Q(0,0)/Q(0,1)$ is still higher than 1 for **4** (Table 2). Whereas the increase of the polarity leads to an enhancement of the fluorescence emission (twice the yield in ethanol) for **4a** and **4c**, it also causes the emission quenching of **4b**. Based on the results with **2b**, this is probably due to the enhanced electron-withdrawing properties of the “carboxylic acid” group in these conditions. Moreover, the core of porphyrins **4** seems to have a lower pKa than others (data not shown), which seems to indicate that the phenylimidazole groups behave as EDG. Thus, in D_2O , in the case of **4b**, a photoinduced intramolecular

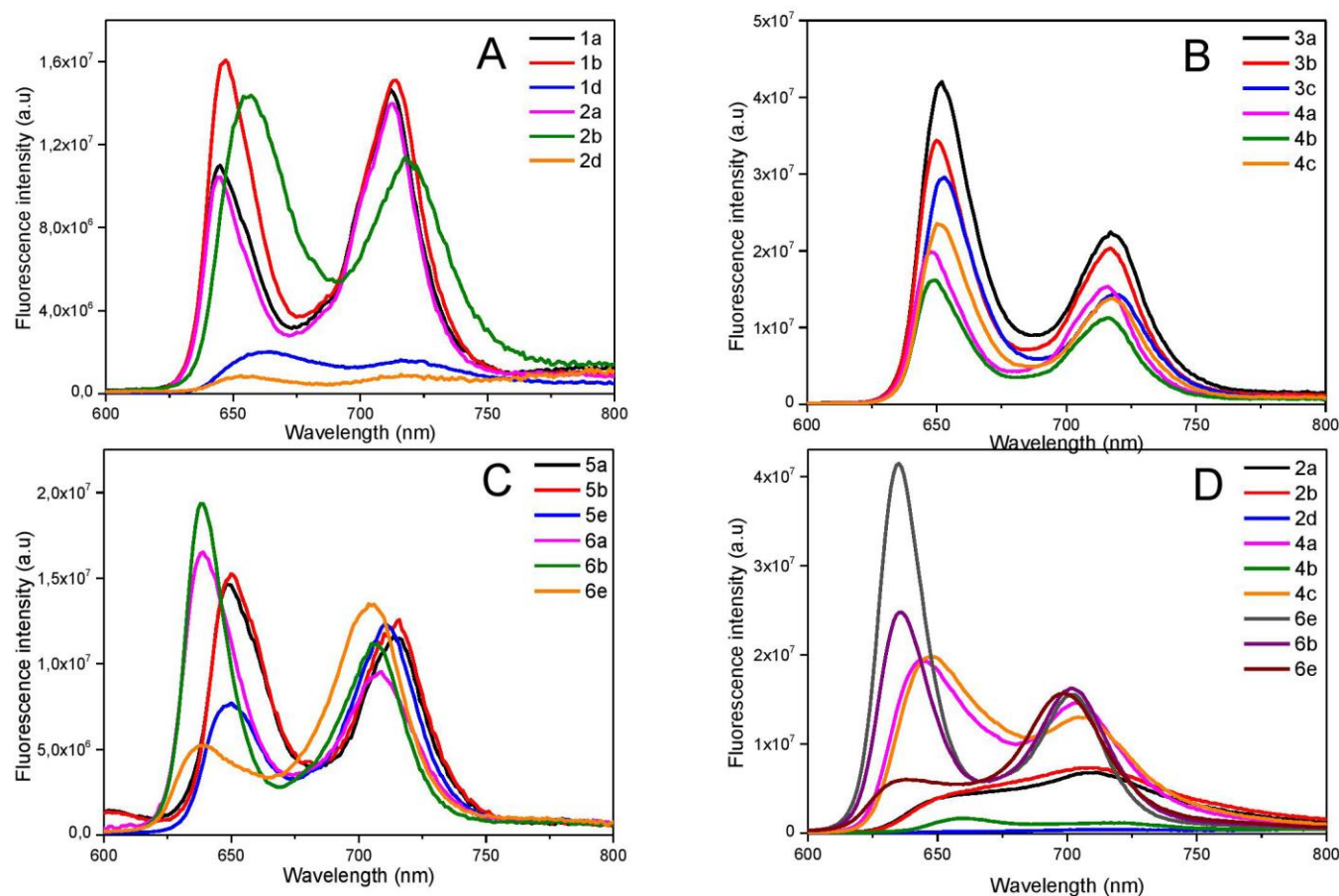


Figure 3. Fluorescence spectra of the different porphyrins in ethanol: A; **1** and **2**, B; **3** and **4**, C; **5** and **6**. In deuterium oxide: D; **2**, **4** and **6** ($\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$)

charge-transfer (ICT) may occur, since this compound is behaving as a Donor-Acceptor (phenylimidazolium groups and carboxylic acid groups respectively). ICT are well-known to lead to red-shifted and lower fluorescence emissions. In order to verify this hypothesis, an additional porphyrin carrying a primary amine, from this family (**4d**), has been checked and no quenching was observed (data not shown). Since the replacement of the EWG by an EDG involved the recovery of the emissions, our hypothesis seems to be consistent.

Even if **5** and **6** seemed to have similar absorption spectra, some discrepancies have been spotted. Firstly, the $Q_x(0,0)$ band is very sensitive to the number of carboxylic functions. Indeed, for family **5**, a slight blue shift ($\Delta\lambda = 3 \text{ nm}$) of $Q_x(0,0)$ band, as well as an hypochromic effect and a full width at half maximum (fwhm) decrease were observed from **5a** to **5b** to **5c**, following the increasing number of "carboxylic acid" group on the bay region of the porphyrin (Table 1). In case of porphyrins **6a** and **6b**, $Q_x(0,0)$ is also red-shifted ($\Delta\lambda = 3 \text{ nm}$), but the hypochromic effect is less pronounced. Whatever, the intense hypochromic effect and enlargement of the $Q_x(0,0)$ band was observed for **6e**. For this compound, moreover, a split of this band was recorded. In the case of **5e**, a split can almost be distinguished. The symmetrization of the porphyrin leads to this effect, in accordance with the four orbital model

of Gouterman.⁴⁸ Secondly, a shoulder at 444 nm was recorded in the absorption spectra of **6a** (Figure 2). It is probably due to an aggregation phenomenon which seems to disappear in diluted analyses (data not shown). Whereas the weak shift of the fluorescence of **5** and **6** are consistent to their absorbance, usual profile with a stronger $Q(0,0)$ band was obtained for **5a**, **5b**, **6a** and **6b** in ethanol (Figure 3-C). In comparison of **1** and **2**, imidazole groups seem to have a weaker electron-withdrawing effect probably because of the steric hindrance (and thus no planarity and lack of conjugation), in an identical manner to the *ortho*-pyridinium groups.⁴⁵ Once again, the "carboxylic acid" group has a weak involvement on the fluorescence in ethanol, whereas the decrease of the ratio $Q(0,0)/Q(0,1)$ of **6b** in D_2O indicates a stronger electron-withdrawing effect of this group in a polar solvent. On the other hand, **5e** and **6e** have a weak $Q(0,0)$ band, which is consistent with the low epsilon value recorded from their respective bands $Q_x(0,0)$ and $Q_y(0,0)$

Singlet oxygen production

Singlet oxygen quantum yields of **1** and **2** are significantly high in both solvent ($0.65 < \phi_{\Delta} < 0.93$) (Table 2). The presence of one "carboxylic" group seems to slightly increase the different yields, even if **2a** has a lower yield in ethanol, probably because of its aggregation. For **1d** and **2d**, a very low singlet oxygen production (even not measurable) was observed,

because of the quenching of emissions by the IET once again. Nevertheless, after addition of drops of acid acetic (data not shown), a characteristic singlet oxygen emission was observed for **2d**. According to the literature, the presence of bacteria may also induce a restoration of the production of singlet oxygen, since this PS has shown a photobactericidal activity.⁴⁹ As previously, families **3** and **4** have shown similar results as TPP. Indeed, the singlet oxygen production of these porphyrins in ethanol is *ca.* 0.55 ($0.49 < \phi_{\Delta} < 0.66$), which is very similar to TPP-COOH value (0.54). However, in D₂O, porphyrins **4a** and **4c** have shown a significant singlet oxygen production increase ($\phi_{\Delta} = 0.83$ and 0.62 respectively). Efficient singlet oxygen productions have also been observed from porphyrins **5** and **6** ($0.58 < \phi_{\Delta} < 0.86$) in ethanol. In D₂O, these values are once again slightly higher. In both families **5** and **6**, in ethanol as in D₂O, the singlet oxygen production quantum yield increases with the number of carboxylic group and the symmetrization of the porphyrin ($\phi_{\Delta} = 0.86$ for **6e** in D₂O).

Based on this study, different phenomena have been described according to the each family of porphyrins. Whereas the pyridyl, phenylimidazole and their *N*-methyl derivatives has shown their ability to do intramolecular transfers (especially in aqueous solution), methylimidazole groups induce less effect on the porphyrin core. Moreover, the symmetrization of imidazole porphyrins has a good impact on their singlet oxygen production. Thus, studies based on asymmetric cationic porphyrins should include a judicious selection of the porphyrin in order to avoid any quenching of the PS in aqueous solution (especially when they are used as control). The presence of one "carboxylic acid" group on **1**, **2**, **5**, **6** seems to slightly increase the production of singlet oxygen, whereas "carboxylic" group should be avoid in **4**. On the other hand, imidazolium porphyrins seem to be promising candidates for the studies which plane to use two coupled agents in *trans* positions, since **4e** has shown a significant singlet oxygen production in aqueous solution.

Table 2. Photophysical properties of the porphyrins in ethanol ($\lambda_{\text{exc}} = 414$ nm).

Compd	Ethanol							D ₂ O						
	λ_{f1}^a (nm)	λ_{f2}^b (nm)	$\lambda_{f1}/\lambda_{f2}$	ϕ_F^c	ϕ_{Δ}^d	τ_F (ns)	τ_{Δ}^e (μ s)	λ_{f1}^b (nm)	λ_{f2}^c (nm)	$\lambda_{f1}/\lambda_{f2}$	ϕ_F^c	ϕ_{Δ}^f	τ_F (ns)	τ_{Δ}^g (μ s)
1a	645	712	0.75	0.10	0.74	10.0	15							
1b	646	713	1.06	0.12	0.77	10.1	17							
1d	663	716	1.29	0.02	0.05	3.2 (57%)	16							
						8.5 (43%)								
2a	645	713	0.75	0.09	0.65	10.0	16	657	709	0.63	0.07	0.90	6.1	69
2b	656	716	1.27	0.12	0.82	8.9	16	655	709	0.59	0.07	0.93	4.8	66
2d	654	719	0.97	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	0.01	nd	4.6	nd
3a	652	718	1.89	0.13	0.66	9.5	16							
3b	650	717	1.7	0.09	0.57	10.1	17							
3c	653	719	2.05	0.08	0.49	9.8	16							
4a	648	716	1.3	0.06	0.51	10	16	644	704	1.33	0.14	0.83	11.2	65
4b	649	716	1.43	0.07	0.54	9.4	15	660	719	1.45	0.01	nd	10.8	nd
4c	651	718	1.7	0.07	0.53	9.6	16	648	707	1.53	0.14	0.62	10.1	68
5a	648	714	1.26	0.14	0.74	8.7	15							
5b	650	714	1.25	0.15	0.78	12.3	16							
5e	649	711	0.62	0.10	0.81	9.7	15							
6a	639	709	1.75	0.13	0.63	12.7	17	635	702	2.66	0.15	0.60	17.4	60
6b	638	705	1.73	0.13	0.58	10.4	15	636	702	1.53	0.13	0.83	16.1	67
6e	639	704	0.39	0.11	0.78	11.9	15	638	698	0.39	0.09	0.86	14.9	69

^aQ(0,0). ^bQ(0,1). ^cTPP as standard ($\Phi_F(\text{toluene}) = 0.11$). ^dTPP-COOH as standard ($\Phi_{\Delta}(\text{EtOH}) = 0.54$). ^eLiterature value ~ 14.5 μ s in EtOH. ^fTPPyP as standard ($\Phi_{\Delta}(\text{D}_2\text{O}) = 0.90$). ^gLiterature value ~ 67 μ s in D₂O.^{53,54}

MBC (μM)	2a	4a	6a
<i>S. aureus</i>	5.0	1.5	6.2
<i>E. coli</i>	18.0	2.5	40.0
<i>P. aeruginosa</i>	20.0	22.0	25.0

Table 3. MBCs of the cationic porphyrins against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* after 20 hours of white light irradiation (4.83 mW/cm^2) at 37°C . In these conditions, those concentrations inhibited at least 99.99% of bacteria compared to the untreated control. For each condition, experiments were conducted six times at a minimum.

Bacterial photoinactivation

To obtain relevant results, commercial bacterial strains, used in this study, are known to be involved in nosocomial infections (*S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*). The aim of this work was to compare the bacterial photoinactivation efficiency of each porphyrin family. This antibacterial study has been focused on *N*-methylporphyrins. Anyhow, pyridinium porphyrin **2a** is already renowned as a better PS than **1a** in PACT,²⁶ which may suggest a similar trend between others porphyrins and their respective *N*-methyl form. Since functionalized porphyrins (**2b**, **2c**, **4b**, **4c**, **6b**, **6e**) are meant to be coupled before utilization, only *A*₄ porphyrins **2a**, **4a** and **6a** was used in this biological assay. Moreover, the impact due to the different cationic groups can be compared in a better way without any involvement due to others groups, which may present additional interactions with bacteria.

The photoinactivation capacity of these compounds has been confirmed (Table 3). Indeed, no significant efficiency has been observed in the dark condition, whereas the light irradiation led to bacterial inhibition of all strains. Minimum bactericidal concentration (MBC) has been determined thanks to serial dilutions of the porphyrins. Despite the narrow range of these MBCs, the porphyrin **4a** seemed to be more efficient against *S. aureus* ($1.5 \mu\text{M}$). The assays against *E. coli* have shown significant discrepancies between the different PS. Whereas **4a** has once again shown a low MBC ($2.5 \mu\text{M}$), a concentrated solution of **2a** and **6a** was required to photoinactivate this strain ($>18.0 \mu\text{M}$). For the assays against *P. aeruginosa*, all MBCs were sharply obtained in the same range ($\sim 20.0 \mu\text{M}$). In comparison of porphyrin **2a** (already known as an efficient PS⁵⁵), **6a** have shown higher MBCs against all strains which involve a worse efficiency for PACT. Based on the presumption of the relation between the efficacy and the positive charge of the PS, this result was not expected as this porphyrin has the same positive charge but a smaller size, then a higher positive charge repartition. Thus, this lower activity is probably due to the lower production of singlet oxygen. On its part, the porphyrin **4a** has shown promising result against *S. aureus* and especially against *E. coli*. Considering the MBCs, the efficiency of **4a** may be estimated as 7 times better against *E. coli* than **2a**. The photophysical properties and, especially, the respective singlet oxygen productions of these PS do not offer enough discrepancy to justify these results. Thus, a special

interaction between **4a** and *E. coli* may be the reason of this enhanced result.

Conclusions

In order to photoinactive MDR strains, previous studies have highlighted the efficiency of cationic PS, including pyridinium porphyrins. In this work, different families of cationic porphyrin have been investigated to support future studies. Even if pyridinium *A*₄ porphyrins are still very efficient, the functionalization of this family may induce some reactivity issues (in particular in the case of the carboxylic acid function) or emissions quenching (by the presence of primary amine functions). Even if the participation of a carboxylic acid function leads to the emission quenching of these PS (according an ICT), phenylimidazolium porphyrins have shown several advantages, as easier syntheses, stable and close properties with TPP, and a significant activity against *E. coli*. Finally, as the methylimidazolium groups have not a strong effect on the porphyrin core and as **6e** has a significant singlet oxygen production, these porphyrins should be considered for studies using two targeting agents in *trans* position.

Experimental

General methods

All organic materials and microbial nutriment were purchased from commercial suppliers (Acros Organics, Alfa Aesar, Grosseron, Sigma-Aldrich, TCI). All reactants for the synthesis of porphyrins were obtained from Sigma-Aldrich and directly used, except for ethyl 4-formylphenoxyacetate which has been prepared from 4-hydroxybenzaldehyde. Solvents used for the UV-Vis and fluorescence measurements were of spectroscopic grade and were stored in a dark place. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck 60F254 silica gel. Column chromatography was carried out with silica gel (60 ACC, 15–40 μm , Merck). Reverse phase chromatography was performed on RediSep® Rf C18 column (43g), mounted on an Interchim® puriFlash™ 430 apparatus, with acetonitrile (HPLC grade +0.1% TFA) and distilled water (+0.1%TFA) as eluents. Continuous monitoring of effluent absorbance allowed the detection of cationic porphyrin conjugate ($\lambda = 418 \text{ nm}$). ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹H-NMR and ¹³C-NMR) spectra were recorded in deuterated solvents, with Bruker DPX 400 and 500 spectrometers. Chemical shifts are reported as δ (parts per million), downfield from internal TMS. Multiplicities are reported as follows: s = singlet, d = doublet, m = multiplet. Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a Sciex 4000 Q-TRAP®, monitored by Sciex Analyst 1.6.2.

Chemical synthesis

Preparation of ethyl 4-formylphenoxyacetate.

4-hydroxybenzaldehyde (1.00 g, 8.20 mmol, 1 eq), ethyl bromoacetate (0.90 mL, 8.20 mmol, 1 eq) and a large excess of K₂CO₃ (3 g) were stirred in a solution of DMF (100 mL) for 3 hours at 95°C . The reaction was monitored by TLC (hexane/ethyl acetate (70/30, v/v)). After removal the solvent

in vacuo, the product was extracted in CHCl_3 , washed with distilled water and dried over MgSO_4 . The solvent was removed to afford the protected aldehyde as a yellowish powder (1.53 g, yield 90%).

General procedure for the synthesis of porphyrins.

Freshly distilled pyrrole (6.66 mL, 96.0 mmol, 4 eq) was added dropwise to a refluxed solution of propionic acid (120 mL) containing respectively, aromatic aldehyde (4-pyridylcarboxaldehyde, 4-imidazolebenzaldehyde or *N*-methyl-4-imidazolecarboxaldehyde, 4 eq for A_4 porphyrins, 3 eq for A_3B porphyrins, 2 eq for A_2B_2 porphyrins) and functionalized aldehyde (methyl 4-formylbenzoate, 4-acetamidobenzaldehyde or ethyl 4-formylphenoxyacetate, 1 eq for A_3B porphyrins, 2 eq for A_2B_2 porphyrins). The mixture was stirred under reflux for 3 hours. After removal of propionic acid *in vacuo*, the crude solid was dissolved in CHCl_3 filtered through a small pad of silica gel and washed with $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (90/10, v/v). After removal of the solvent under vacuum, porphyrins were purified by silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (98/2, v/v)) to afford A_4 porphyrin (yield 10% for **1a**, yield 15% for **3a**, yield 2% for **5a**), A_3B porphyrin (yield 2-5% for **1**, yield 10-13% for **3**, yield 5% for **5**) or A_2B_2 porphyrin (yield 5% for **5**) as light purple powders.

1a : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 9.06 (d, J = 6.0 Hz, 8H, *Ho*-py), 8.87 (s, 8H, *Hpyrr*), 8.16 (d, J = 6.0 Hz, 8H, *Hm*-py), -2.90 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{40}\text{H}_{26}\text{N}_8$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 310.11, found 310.31.

3a : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 9/1 CD_3OD) : δ (ppm) = 8.92 (s, 8H, *Hpyrr*), 8.36 (d, J = 8.3 Hz, 8H, *Ho*-phe), 8.26 (s, 4H, *Him*-2), 7.86 (d, J = 8.3 Hz, 8H, *Hm*-phe), 7.67 (s, 4H, *Him*-5), 7.34 (s, 4H, *Him*-4), -2.96 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{56}\text{H}_{38}\text{N}_{12}$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 440.16, found 440.04.

5a : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 9/1 CD_3OD) : δ (ppm) = 8.88 (m, 8H, *Hpyrr*), 7.67 (m, 4H, *Him*-5), 7.51 (d, 4H, *Him*-4), 3.45 (m, 12H, *N*- CH_3), -2.92 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_{12}$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 316.13, found 316.26.

General procedure for the deprotection of carboxylic acid.

Ester of A_3B porphyrins (0.2 mmol) were saponified in a refluxing solution of KOH (2 mL, 2 mol/L) and EtOH (for methyl ester) or MeOH (for ethyl ester) (50 mL) for 24 hours. After removal the solvent, an excess of HCl was added until the green coloration of the solution appeared. The crude product was extracted in CHCl_3/TEA (99/1, v/v), washed with distilled water and dried over MgSO_4 . The residue was purified by silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (80/20, v/v)) to obtain A_3B porphyrins with carboxylic acid as purple solids (yield around 90%).

1b : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 9/1 CD_3OD) : δ (ppm) = 9.40 (d, J = 6.5 Hz, 6H, *Ho*-py), 8.98 – 8.86 (m, 8H, *Hpyrr*), 8.92 (d, J = 6.5 Hz, 6H, *Hm*-py), 8.58 (d, J = 8.0 Hz, 2H, *Ho*-phe), 8.42 (d, J = 8.0 Hz, 2H, *Hm*-phe), -2.80 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{42}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_2$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 331.61, found 331.64.

3b : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 9/1 CD_3OD) : δ (ppm) = 8.90 (s, 8H, *Hpyrr*), 8.46 (d, J = 7.6 Hz, 2H, *Ho*- phe_{COOH}), 8.35 (d, J = 7.6 Hz, 2H, *Hm*- phe_{COOH}), 8.30 (d, J = 8.3 Hz, 6H, *Ho*-phe), 8.24 (s, 3H, *Him*-2), 7.86 (d, J = 8.3 Hz, 6H, *Hm*-phe), 7.68 (s, 3H, *Him*-

5), 7.34 (s, 3H, *Him*-4), -2.91 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{54}\text{H}_{36}\text{N}_{10}\text{O}_2$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 429.15, found 429.03.

3c : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 9/1 CD_3OD) : δ (ppm) = 8.88 (m, 8H, *Hpyrr*), 8.31 (d, J = 8.1 Hz, 6H, *Ho*-phe), 8.19 (s, 3H, *Him*-2), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H, *Ho*- phe_o), 7.78 (d, J = 8.1 Hz, 6H, *Hm*-phe), 7.59 (s, 3H, *Him*-5), 7.38 (s, 3H, *Him*-4), 7.31 (d, J = 8.5 Hz, 2H, *Hm*- phe_o), 4.77 (s, 2H, *O*- CH_2 -), -2.75 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{55}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_3$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 444.15, found 444.17.

5b : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 9/1 CD_3OD) : δ (ppm) = 8.88 (m, 8H, *Hpyrr*), 8.42 (m, 2H, *Ho*- phe_{COOH}), 8.19 (m, 2H, *Hm*- phe_{COOH}), 7.65 (m, 3H, *Him*-5), 7.51 (m, 3H, *Him*-4), 3.45 (m, 9H, *N*- CH_3), -2.96 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_2$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 336.13, found 336.15.

5e : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 8.85 (m, 8H, *Hpyrr*), 8.43 (m, 4H, *Ho*- phe_{COOH}), 8.19 (m, 4H, *Hm*- phe_{COOH}), 7.67 (s, 2H, *Him*-5), 7.47 (s, 2H, *Him*-4), 3.44 (m, 6H, *N*- CH_3), -2.78 (m, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{42}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_4$] : calcd [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$ 356.12, found 356.16.

General procedure for the N-methylation of porphyrins.

An excess of iodomethane (60 eq for A_4 porphyrins, 45 eq for A_3B porphyrins, 30 eq for A_2B_2 porphyrins) was added to a solution of dissolved porphyrin (1 eq) in anhydrous DMF (25 mL). The mixture was stirred for 3 hours at 140 °C. The DMF and excess iodomethane were removed with a rotary vane pump under heating (70 °C) to obtain *N*-methyl porphyrins in quantitative yield as light purple powders without further purification.

2a : ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) : δ (ppm) = 9.51 (d, J = 6.6 Hz, 8H, *Ho*-py), 9.18 (s, 8H, *Hpyrr*), 9.00 (d, J = 6.6 Hz, 8H, *Hm*-py), 4.74 (s, 12H, *N* $^+$ - CH_3), -3.08 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{N}_8$] : calcd [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$ 169.83, found 169.81.

2b : ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) : δ (ppm) = 9.49 (d, J = 6.5 Hz, 6H, *Ho*-py), 9.15 – 8.99 (m, 8H, *Hpyrr*), 9.01 (d, J = 6.5 Hz, 6H, *Hm*-py), 8.41 (m, 4H, *Hphe*), 4.73 (s, 9H, *N* $^+$ - CH_3), -2.99 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_2$] : calcd [M] $^{2+}$ 353.14, found 352.65.

4a : ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) : δ (ppm) = 10.13 (s, 4H, *Him*-2), 8.93 (s, 8H, *Hpyrr*), 8.65 (s, 4H, *Him*-4), 8.53 (d, J = 8.3 Hz, 8H, *Ho*-phe), 8.27 (d, J = 8.3 Hz, 8H, *Hm*-phe), 8.14 (s, 4H, *Him*-5), 4.10 (s, 12H, *N* $^+$ - CH_3), -2.88 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{60}\text{H}_{50}\text{N}_{12}$] : calcd [M] $^{4+}$ 234.60, found 234.70.

4b : ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) : δ (ppm) = 10.13 (s, 3H, *Him*-2), 8.93 (s, 8H, *Hpyrr*), 8.65 (s, 3H, *Him*-4), 8.54 (d, J = 8.2 Hz, 6H, *Ho*-phe), 8.42 (d, J = 8.1 Hz, 2H, *Ho*- phe_{COOH}), 8.36 (d, J = 8.1 Hz, 2H, *Hm*- phe_{COOH}), 8.26 (d, J = 8.3 Hz, 6H, *Hm*-phe), 8.14 (s, 3H, *Him*-4), 4.10 (s, 9H, *N* $^+$ - CH_3), -2.88 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{57}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{O}_2$] : calcd [M] $^{3+}$ 300.47, found 300.41.

4c : ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) : δ (ppm) = 10.13 (s, 3H, *Him*-2), 8.92 (m, 8H, *Hpyrr*), 8.65 (s, 3H, *Him*-4), 8.54 (d, J = 8.3 Hz, 6H, *Ho*-phe) 8.26 (d, J = 8.3 Hz, 6H, *Hm*-phe), 8.15 (d, J = 8.6 Hz, 2H, *Ho*- phe_o), 8.14 (s, 3H, *Him*-5), 7.40 (d, J = 8.6 Hz, 2H, *Hm*- phe_o), 4.99 (s, 2H, *O*- CH_2 -), 4.10 (s, 9H, *N* $^+$ - CH_3), -2.87 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{58}\text{H}_{47}\text{N}_{10}\text{O}_3$] : calcd [$\text{M}+\text{H}$] $^{3+}$ 310.79, found 310.75.

6a : ^1H NMR (500 MHz, DMSO_{d6}) : δ (ppm) = 9.40 (s, 8H, *Hpyrr*), 8.55 (s, 8H, *Him*), 3.75 (s, 24H, *N*- CH_3), -3.22 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{N}_{12}$] : calcd [M] $^{4+}$ 172.59, found 172.54.

6b : ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) : δ (ppm) = 9.23 (m, 8H, Hpyrr), 8.52 (s, 6H, Him), 8.47 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Ho-phe_{COOH}), 8.39 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Hm-phe_{COOH}), 3.75 (m, 18H, N-CH₃), -3.00 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{42}\text{H}_{39}\text{I}_3\text{N}_{10}\text{O}_2$] : calcd $[\text{M}]^{3+}$ 238.44, found 238.50.

6e : ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) : δ (ppm) = 9.15 (m, 8H, Hpyrr), 8.51 (s, 4H, Him), 8.43 (d, J = 8.1 Hz, 4H, Ho-phe_{COOH}), 8.38 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Hm-phe_{COOH}), 3.75 (s, 12H, N-CH₃), -2.81 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{44}\text{H}_{36}\text{I}_2\text{N}_8\text{O}_4$] : calcd $[\text{M}]^{2+}$ 370.14, found 370.04.

Synthesis of 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin (1d).

5-(4-acetamidophenyl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin (250 mg, 0.373 mmol) was dissolved into a solution of HCl (5 M, 250 mL) under reflux for 3 hours. After removal of the solvent *in vacuo*, the product was extracted in CHCl_3/TEA (90/10, v/v), washed with distilled water and dried over MgSO_4 . The solvent was removed to afford **1d** as a purple powder with a quantitative yield.

1d : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 9.02 (d, J = 5.5 Hz, 6H, Ho-py), 9.02 – 8.80 (m, 8H, Hpyrr), 8.16 (d, J = 5.5 Hz, 6H, Hm-py), 7.98 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ho-phe), 7.08 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Hm-phe), -2.91 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{41}\text{H}_{28}\text{N}_8$] : calcd $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 317.12, found 316.93.

Synthesis of 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridyl)-21H,23H-porphyrin (2d).

5-(4-acetamidophenyl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin is directly *N*-methylated, following the previous procedure described. Then, the crude was diluted in a solution of $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (75/25, v/v) and stirred under reflux for 5 hours at room temperature. The aqueous solution was removed and the product was freeze-dried to obtain **2d** as a purple-brown powder with a quantitative yield.

2d : ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) : δ (ppm) = 9.49 (d, J = 6.5 Hz, 6H, Ho-py), 9.11 – 8.80 (m, 8H, Hpyrr), 9.00 (d, J = 6.5 Hz, 6H, Hm-py), 7.94 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ho-phe), 7.15 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Hm-phe), 4.73 (s, 9H, N⁺-CH₃), -2.96 (s, 2H, NH) ; MS (ESI+) [$\text{C}_{44}\text{H}_{37}\text{I}_3\text{N}_8$] : calcd $[\text{M}]^{3+}$ 225.77, found 225.74.

Spectroscopic Measurements

Absorption spectra were recorded on a UV-3600 UV-visible double beam spectrophotometer (Shimadzu, Marne La Vallée, France). Fluorescence spectra were recorded on a Fluorolog FL3-222 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a 450 W Xenon lamp, a thermostated cell compartment (25°C), a UV-visible R928 photomultiplier (Hamamatsu Japon) and an InGaAs infrared detector (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc, Phoenixville, PA, USA). Excitation beam was diffracted by a double ruled grating SPEX monochromator (1200 grooves/mm blazed at 330 nm). Emission beam was diffracted by a double ruled grating SPEX monochromator (1200 grooves/mm blazed at 500 nm). Singlet oxygen emission was detected through a double ruled grating SPEX monochromator (600 grooves/mm blazed at 1 μm) and a long-wave pass (780 nm). All spectra were recorded from solutions introduced in four-face quartz cuvettes. All the emission spectra (fluorescence and singlet oxygen

luminescence) have been displayed with the same absorbance (less than 0.2) with lamp and photomultiplier correction. Fluorescence quantum yields (Φ_F) were determined using a tetraphenyl porphyrin (TPP) solution in toluene as the fluorescence standard (Φ_F = 0.11). Quantum yield of $^1\text{O}_2$ production was determined by direct analysis of the $^1\text{O}_2$ near-infrared luminescence at 1270 nm. Whereas TPP-COOH was used as standard in ethanol (Φ_A = 0.54), Tetra(*N*-methylpyridyl)porphyrin (**2a**) was chosen as the reference solution in D_2O due to its high $^1\text{O}_2$ quantum yield (Φ_A = 0.90). Time-resolved experiments were performed using for excitation a pulsed laser diode emitting at 407 nm (LDH-P-C-400M, FWHM < 70 ps, 1 MHz) coupled with a PDL 800-D driver (both from PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) and for detection an avalanche photodiode SPCM-AQR-15 (EG & G, Vaudreuil, Canada) coupled with a 550 nm long-wave pass filter as detection system. Acquisition was performed by a PicoHarp 300 module with a PHR-800 4 channel router (both PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Fluorescence decays were recorded using the single photon counting method. Data were collected up to 1000 counts accumulated in the maximum channel and analyzed using Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) software (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) based on iterative reconvolution using a Levensberg-Marquand algorithm, enabling the obtention of multi-exponential profiles (mainly one or two exponentials in our cases). Singlet oxygen lifetime measurements have been performed on a TEMPRO-01 spectrophotometer (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) composed of a SpectraLED-415 pulsed diode excitation source emitting at 415 nm, a cell compartment, a Seya-Namioka type emission monochromator (600 – 2000 nm) and a H10330-45 near-infrared photomultiplier tube with thermoelectric cooler (Hamamatsu, Japan) as detection system. The system was monitored by a FluoroHub-B single photon counting controller and the DataStation and DAS6 softwares (Horiba Jobin Yvon). Emission spectra have been performed on a Fluorolog FL3-22 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a 450 W Xenon lamp, a xenon flash lamp, a thermostated cell compartment (25 °C) and a R928 UV-visible photomultiplier (Hamamatsu Japan). The system was monitored by a FluoroHub-B single photon counting controller. The FluorEssence software (Horiba Jobin Yvon) was used for recording the emission spectra; the DataStation and DAS6 softwares (Horiba Jobin Yvon) were used for phosphorescence lifetime measurements.

Bacterial cultures

Gram-positive (*S. aureus* CIP76.25) and Gram-negative (*P. aeruginosa* CIP76110 and *E. coli* CIP54.8T) bacterial strains were obtained from Institut Pasteur (Paris, France). These strains were cultured in liquid tryptic soy (pancreatic casein extract 17 g/L, soy flour papaic digest 3 g/L, dextrose 2.5 g/L, NaCl 5 g/L, and K_2HPO_4 2.5 g/L) and incubated overnight 37 °C under aerobic conditions. Square plates were kept warm inside a SR1000 Thermosi incubator. Antimicrobial experiments used a Heidolph Unkubator 1000 equipped with an Unimax 1010

orbital platform shaker. An Isotech Lightmeter 1335 light meter was used to measure the effective irradiation power.

Bacterial photoinactivation

To establish this comparison, A₄ porphyrins were incubated in contact of bacteria in their log phase. Moreover, **1a**, **3a** and **5a** have poor solubility in DMSO and in aqueous solution. The bacterial assays have revealed that compounds aggregated and precipitated during the incubation which prevents any significant bacterial photoinactivation in these conditions (data not shown). Fresh solutions of porphyrin **2a**, **4a** and **6a** in DMSO were mixed with tryptic soy culture medium. DMSO concentration never exceeded 1% (v/v). From these mixtures, 1 mL of serial dilutions (100 µM down to 156 nM) was transferred into two 24-well plates (BD Falcon). 1 mL of a culture at a concentration of 2.10⁵ UFC/ml was deposited in each well. The 24-well plates were irradiated with LED visible light. The fluence rate (4.83 mW/cm²) was measured with a light meter. Plates were incubated under gentle shaking (200 rpm) at 37 °C for 20 hours (totaling 348 J/cm² fluence). Controls consisting of 24-well plates were prepared in the same conditions but kept in the dark. Six independent experiments were performed with each strain. Bacterial count was performed after a 10-fold serial dilution of each well. Each dilution was spread on tryptic soy agar plates using an automatic plater (easySPIRAL®, Interscience). After incubation at 37 °C for 24 hours, colonies were counted to determine total CFU per mL (CFU/mL). The minimum bactericidal concentration (MBC) corresponds to the concentration of the active compound for which 99.99% of the bacteria have been killed (i.e. 4 log reduction compared to the untreated control).

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank the 'Conseil Régional du Limousin' for financial support. The authors are indebted to Emilie Pinault and Dr Yves Champavier (BISCEm – University of Limoges) for respectively ESI-MS and NMR analysis.

Notes and references

- 1 L. M. Prescott, J. Willey, L. Sherwood and C. J. Woolverton, *Microbiologie*, De Boeck, 4th edn., 2013.
- 2 C. Cabral, J. Ingram, P. J. Lucas, N. M. Redmond, J. Kai, A. D. Hay and J. Horwood, Influence of clinical Communication on Parents' Antibiotic Expectations for Children with Respiratory Tract Infections, *Ann. Fam. Med.*, 2016, **14**, 141–147.
- 3 C. L. Ventola, The Antibiotic Resistance Crisis, *Pharm. Ther.*, 2015, **40**, 277–283.
- 4 M. Wainwright, T. Maisch, S. Nonell, K. Plaetzer, A. Almeida, G. P. Tegos and M. R. Hamblin, Photoantimicrobials—are we afraid of the light?, *Lancet Infect. Dis.*, 2017, **17**, e49–e55.
- 5 J. O'Neill, Tackling Drug-Resistant Infections Globally : Final report and recommendations. Review on Antimicrobial resistance.
- 6 F. Vatansever, W. C. M. A. de Melo, P. Avci, D. Vecchio, M. Sadasivam, A. Gupta, R. Chandran, M. Karimi, N. A. Parizotto, R. Yin, G. P. Tegos and M. R. Hamblin, Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013, **37**, 955–989.
- 7 A. Tavares, C. M. B. Carvalho, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, J. P. C. Tomé, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha, N. C. M. Gomes, E. Alves and A. Almeida, Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment, *Mar. Drugs*, 2010, **8**, 91–105.
- 8 J. S. Dysart and M. S. Patterson, Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro, *Phys. Med. Biol.*, 2005, **50**, 2597–2616.
- 9 X. Fu, Y. Fang and M. Yao, Antimicrobial Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection, *BioMed Res. Int.*
- 10 B. W. Henderson and T. J. Dougherty, How Does Photodynamic Therapy Work?, *Photochem. Photobiol.*, 1992, **55**, 145–157.
- 11 M. R. Detty, S. L. Gibson and S. J. Wagner, Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3897–3915.
- 12 T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, Photodynamic Therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, **90**, 889–905.
- 13 A. Minnock, D. I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, J. H. Parish and S. B. Brown, Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of Escherichia coli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **44**, 522–527.
- 14 E. Reddi, M. Ceccon, G. Valduga, G. Jori, J. C. Bommer, F. Elisei, L. Latterini and U. Mazzucato, Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins, *Photochem. Photobiol.*, 2002, **75**, 462–470.
- 15 E. Alves, L. Costa, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha and A. Almeida, Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins, *BMC Microbiol.*, 2009, **9**, 70.
- 16 E. Saino, M. S. Sbarra, C. R. Arciola, M. Scavone, N. Bloise, P. Nikolov, F. Ricchelli and L. Visai, Photodynamic action of Tri-meso (N-methyl-pyridyl), meso (N-tetradecyl-pyridyl) porphine on Staphylococcus epidermidis biofilms grown on Ti6Al4V alloy, *Int. J. Artif. Organs*, 2010, **33**, 636–645.
- 17 S. Schastak, S. Ziganishyna, B. Gitter, P. Wiedemann and T. Claudepierre, Efficient Photodynamic Therapy against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using THPTS, a Cationic Photosensitizer Excited by Infrared Wavelength, *PLOS ONE*, 2010, **5**, e11674.
- 18 O. Simonetti, O. Cirioni, F. Orlando, C. Alongi, G. Lucarini, C. Silvestri, A. Zizzi, L. Fantetti, G. Roncucci, A. Giacometti, A. Offidani and M. Provinciali, Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with a single treatment of RLP068/Cl in an experimental model of Staphylococcus aureus wound infection, *Br. J. Dermatol.*, 2011, **164**, 987–995.

- 19 E. Caruso, S. Banfi, P. Barbieri, B. Leva and V. T. Orlandi, Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2012, **114**, 44–51.
- 20 G. V. Gyulkhandanyan, R. K. Ghazaryan, M. H. Paronyan, A. G. Gyulkhandanyan, M. A. Sheyranyan, B. M. Dzharagov, E. S. Tuchina, M. A. Korchenova and V. V. Tuchin, eds. V. V. Tuchin, K. V. Larin, M. J. Leahy and R. K. Wang, 2014, p. 894212.
- 21 C. Simões, M. C. Gomes, M. G. P. M. S. Neves, Â. Cunha, J. P. C. Tomé, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, A. Almeida and M. A. F. Faustino, Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number and charge distribution effects, *Catal. Today*, 2016, **266**, 197–204.
- 22 K. M. Kadish, K. M. Smith and R. Guilard, *The Porphyrin Handbook: Synthesis and organic chemistry*, Elsevier, 2000.
- 23 T. Maisch, C. Bosl, R.-M. Szeimies, N. Lehn and C. Abels, Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivatives on Prokaryotic and Eukaryotic Cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, **49**, 1542–1552.
- 24 C. S. Prasanth, S. C. Karunakaran, A. K. Paul, V. Kussovski, V. Mantareva, D. Ramaiah, L. Selvaraj, I. Angelov, L. Avramov, K. Nandakumar and N. Subhash, Antimicrobial Photodynamic Efficiency of Novel Cationic Porphyrins towards Periodontal Gram-positive and Gram-negative Pathogenic Bacteria, *Photochem. Photobiol.*, 2014, **90**, 628–640.
- 25 M. S. Sbarra, C. R. Arciola, A. Di Poto, E. Saino, H. Rohde, P. Speziale and L. Visai, The photodynamic effect of tetra-substituted N-methyl-pyridyl-porphine combined with the action of vancomycin or host defense mechanisms disrupts *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *Int. J. Artif. Organs*, 2009, **32**, 574–583.
- 26 R. Dosselli, C. Tampieri, R. Ruiz-González, S. De Munari, X. Ragàs, D. Sánchez-García, M. Agut, S. Nonell, E. Reddi and M. Gobbo, Synthesis, Characterization, and Photoinduced Antibacterial Activity of Porphyrin-Type Photosensitizers Conjugated to the Antimicrobial Peptide Apidaecin 1b, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 1052–1063.
- 27 A. E. H. Machado, W. R. Gomes, D. M. S. Araújo, H. S. Miglio, L. T. Ueno, R. D. Paula, J. A. S. Cavaleiro and N. M. B. Neto, Synthesis and Spectroscopic Characterization of Two Tetrasubstituted Cationic Porphyrin Derivatives, *Molecules*, 2011, **16**, 5807–5821.
- 28 Milgrom, Dempsey and Yahioğlu, 5,10,15,20-Tetrakis(N-protected-imidazol-2-yl) porphyrins, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 9877–9890.
- 29 D. Kalita, M. Morisue and Y. Kobuke, Synthesis and electrochemical properties of slipped-cofacial porphyrin dimers of ferrocene-functionalized Zn-imidazolyl-porphyrins as potential terminal electron donors in photosynthetic models, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 77–92.
- 30 R. Kachadourian, C. A. Johnson, E. Min, I. Spasojevic and B. J. Day, Flavin-dependent antioxidant properties of a new series of meso-N,N'-dialkyl-imidazolium substituted manganese(III) porphyrins, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **67**, 77–85.
- 31 D. H. Tjahjono, T. Akutsu, N. Yoshioka and H. Inoue, Cationic porphyrins bearing diazoliun rings: synthesis and their interaction with calf thymus DNA, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, 1999, **1472**, 333–343.
- 32 P. Mroz, J. Bhaumik, D. K. Dogutan, Z. Aly, Z. Kamal, L. Khalid, H. L. Kee, D. F. Bocian, D. Holten, J. S. Lindsey and M. R. Hamblin, Imidazole metalloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: Role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production, *Cancer Lett.*, 2009, **282**, 63–76.
- 33 V. Seng, X. Wang, R. Ali, W. Fang, F. Charles-Pierre, S. Bhagan and A. G. Hyslop, Synthesis of imidazole and imidazolium porphyrins, *J. Heterocycl. Chem.*, 2006, **43**, 1077–1081.
- 34 V. Sol, P. Branland, R. Granet, C. Kaldapa, B. Verneuil and P. Krausz, Nitroglycosylated meso-arylporphyrins as photoinhibitors of gram positive bacteria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 3007–3010.
- 35 V. Sol, P. Branland, V. Chaleix, R. Granet, M. Guilloton, F. Lamarche, B. Verneuil and P. Krausz, Amino porphyrins as photoinhibitors of Gram-positive and -negative bacteria, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 4207–4211.
- 36 C. Ringot, S. Naima, R. Granet, P. Bressollier, V. Sol and P. Krausz, Meso-functionalized aminoporphyrins as efficient agents for photo-antibacterial surfaces, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 2010, **14**, 925–931.
- 37 C. Ringot, V. Sol, M. Barrière, N. Saad, P. Bressollier, R. Granet, P. Couleaud, C. Frochot and P. Krausz, Triazinyl Porphyrin-Based Photoactive Cotton Fabrics: Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1716–1723.
- 38 J.-P. Mbakidi, K. Herke, S. Alvès, V. Chaleix, R. Granet, P. Krausz, S. Leroy-Lhez, T.-S. Ouk and V. Sol, Synthesis and photobiocidal properties of cationic porphyrin-grafted paper, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **91**, 333–338.
- 39 F. Le Guern, V. Sol, C. Ouk, P. Arnoux, C. Frochot and T.-S. Ouk, Enhanced photobactericidal and targeting properties of a cationic porphyrin following attachment of Polymyxin B, *Bioconjug. Chem.*, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.7b00516.
- 40 R. G. Little, J. A. Anton, P. A. Loach and J. A. Ibers, The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins, *J. Heterocycl. Chem.*, 1975, **12**, 343–349.
- 41 A. D. Adler, F. R. Longo, J. D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour and L. Korsakoff, A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine, *J. Org. Chem.*, 1967, **32**, 476–476.
- 42 S. Meng, Z. Xu, G. Hong, L. Zhao, Z. Zhao, J. Guo, H. Ji and T. Liu, Synthesis, characterization and in vitro photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid–porphyrin conjugates, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **92**, 35–48.
- 43 D. Kumar, K. P. Chandra Shekar, B. Mishra, R. Kurihara, M. Ogura and T. Ito, Cationic porphyrin–quinoxaline conjugate as a photochemically triggered novel cytotoxic agent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 3221–3224.
- 44 J. P. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, M. Soncin, M. Magaraggia, S. Ferro and G. Jori, Synthesis and Antibacterial Activity of New Poly-S-lysine–Porphyrin Conjugates, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 6649–6652.
- 45 F. J. Vergeldt, R. B. Koehorst, A. van Hoek and T. J. Schaafsma, Intramolecular interactions in the ground and excited states of tetrakis (N-methylpyridyl) porphyrins, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 4397–4405.
- 46 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science & Business Media, 2007.
- 47 G. D. Dorough, J. R. Miller and F. M. Huennekens, Spectra of the Metallo-derivatives of α , β , γ , δ -Tetraphenylporphine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4315–4320.
- 48 M. Gouterman, G. H. Wagnière and L. C. Snyder, Spectra of porphyrins, *J. Mol. Spectrosc.*, 1963, **11**, 108–127.
- 49 H. Li, O. Fedorova S., A. N. Grachev, W. R. Trumble, G. A. Bohach and L. Czuchajowski, A series of meso-tris(N-methyl-pyridiniumyl)-(4-alkylamidophenyl)porphyrins: Synthesis, interaction with DNA and antibacterial activity, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1354**, 252–260.

- 50 R. Redmond W. and J. Gamlin N., A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **70**, 391–475.
- 51 P. Couleaud, PhD Thesis, Université de Lorraine, 2011.
- 52 S. Mathai, T. A. Smith and K. P. Ghiggino, Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 995.
- 53 F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross, Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1995, **24**, 663–1021.
- 54 P. R. Ogilby and C. S. Foote, Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen (1.DELTA.g), *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 3423–3430.
- 55 T. Maisch, Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2015, **150**, 2–10.

III. Informations supplémentaires

III.1. Analyse ^1H RMN de **1a**

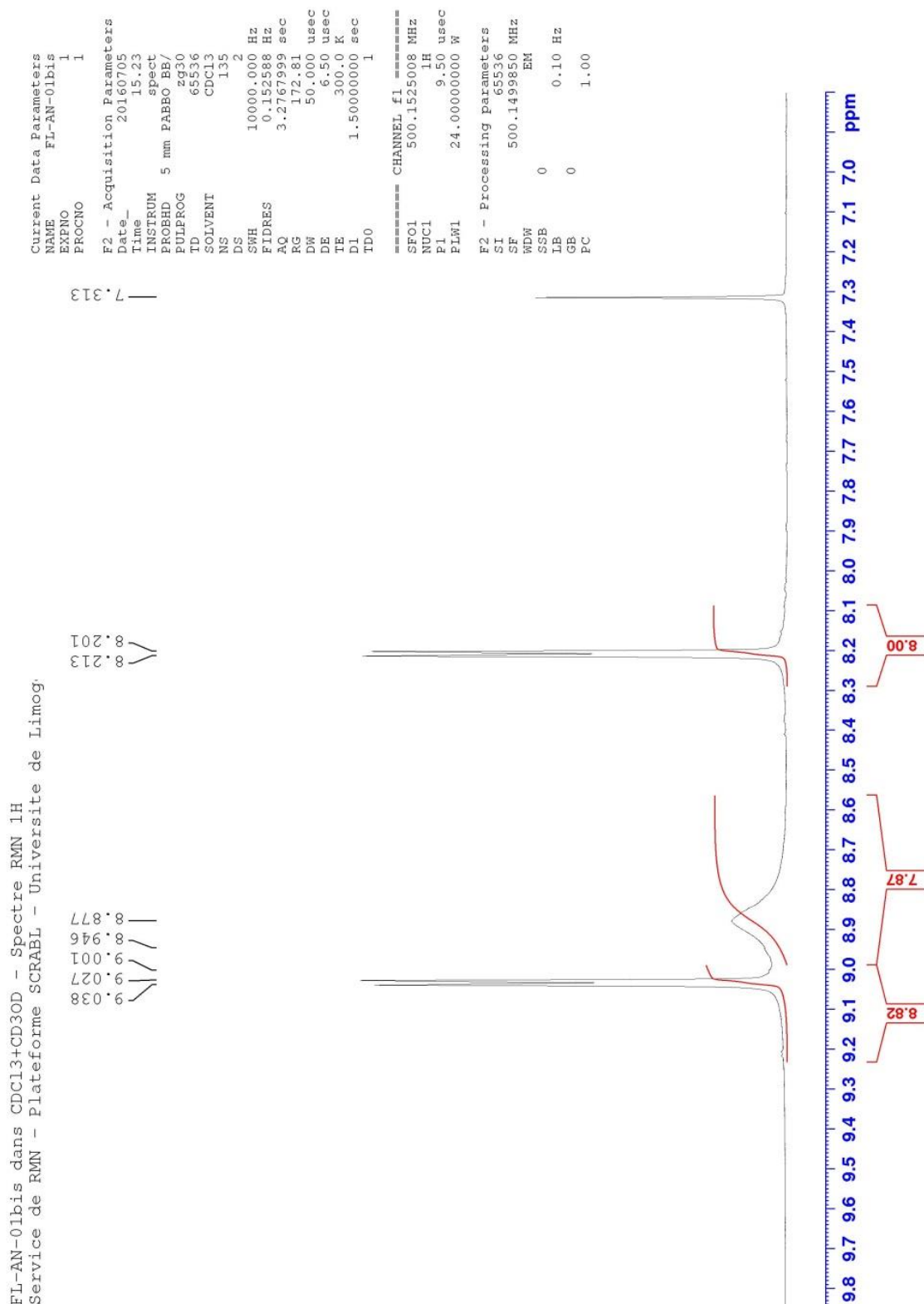


Figure 86 (S1). ^1H NMR analysis of **1a**.

III.2. Analyse ^1H RMN de 1b

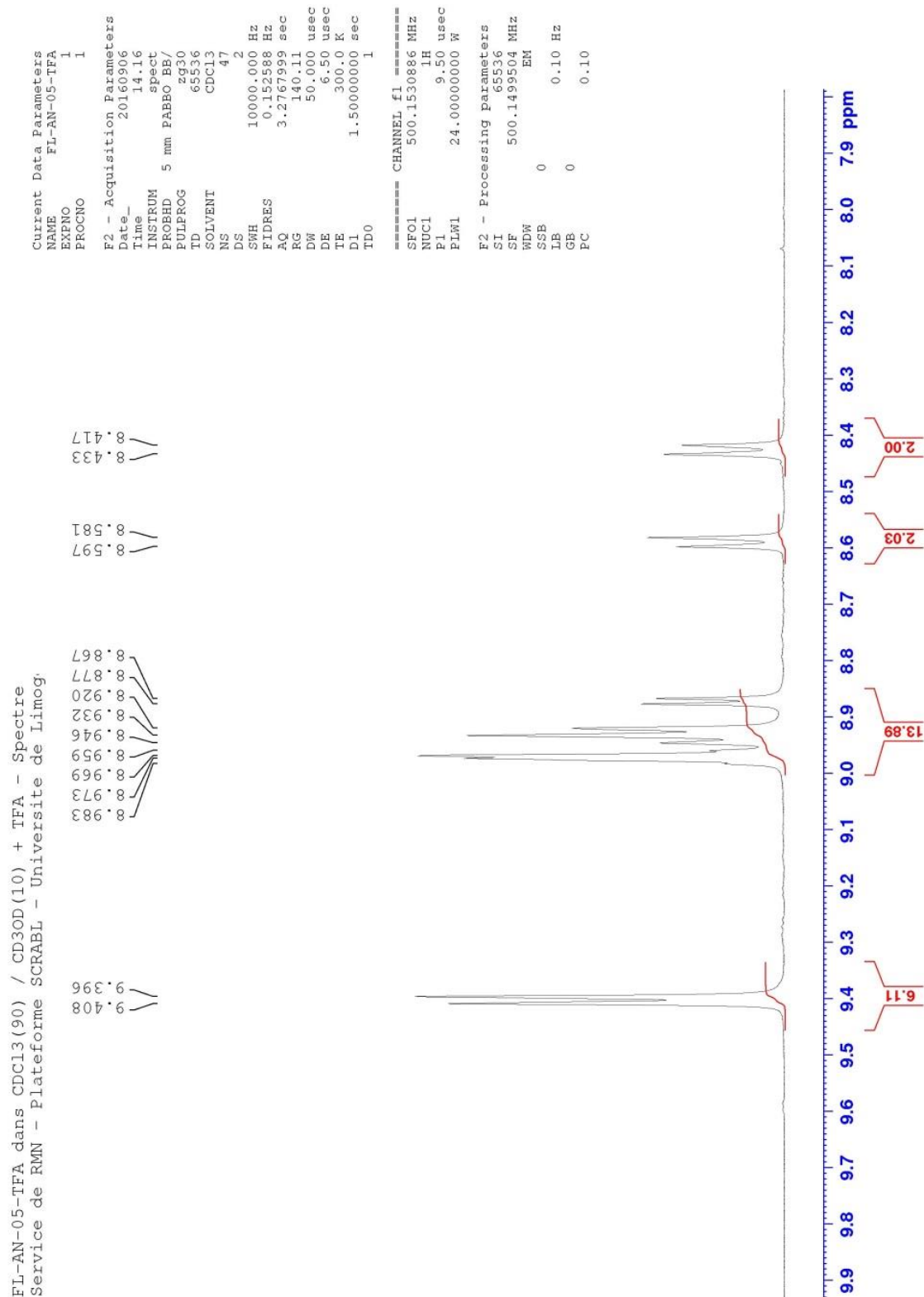


Figure 87 (S2). ^1H NMR analysis of 1b.

III.3. Analyse ^1H RMN de 1d

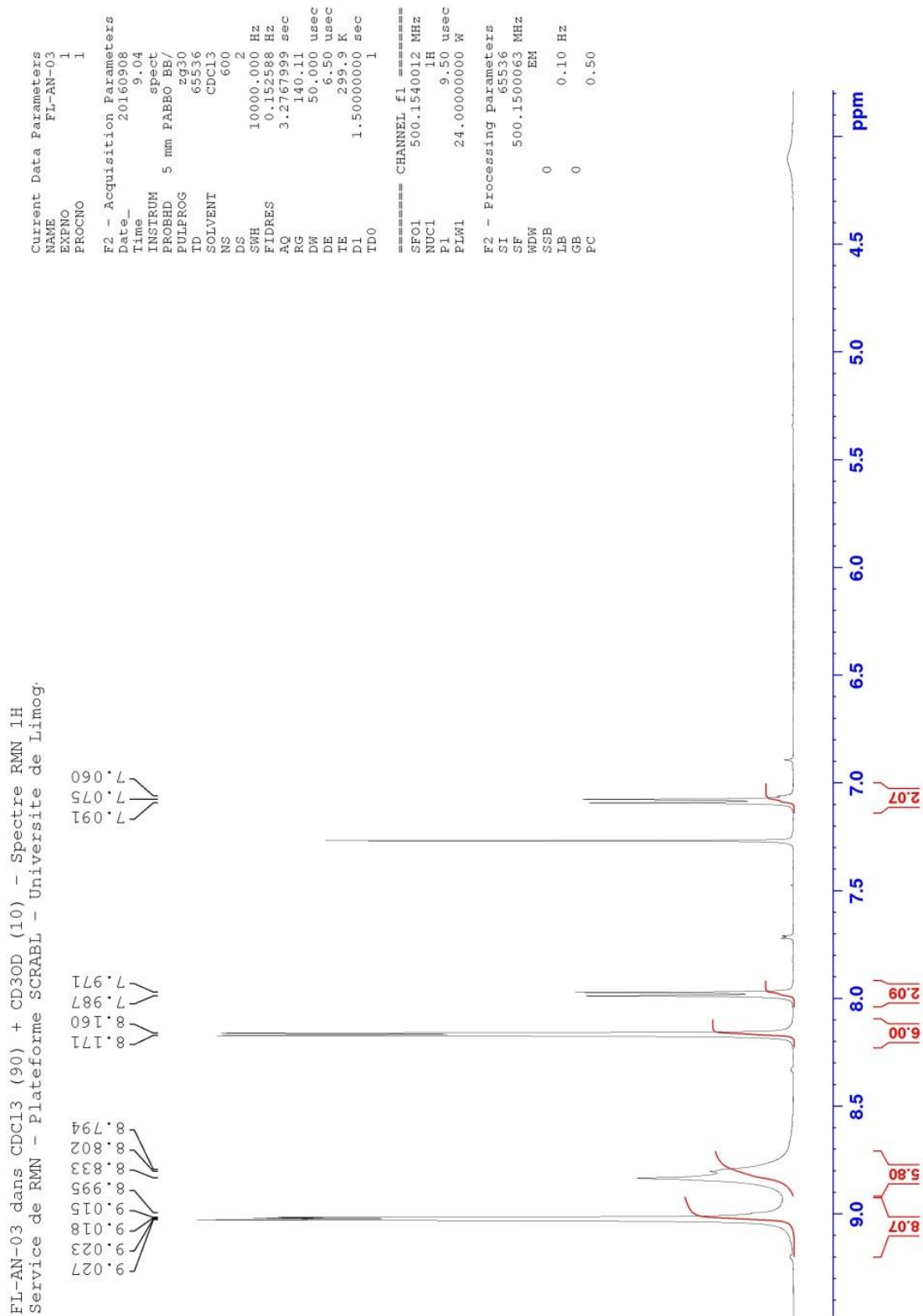


Figure 88 (S3). ^1H NMR analysis of 1d.

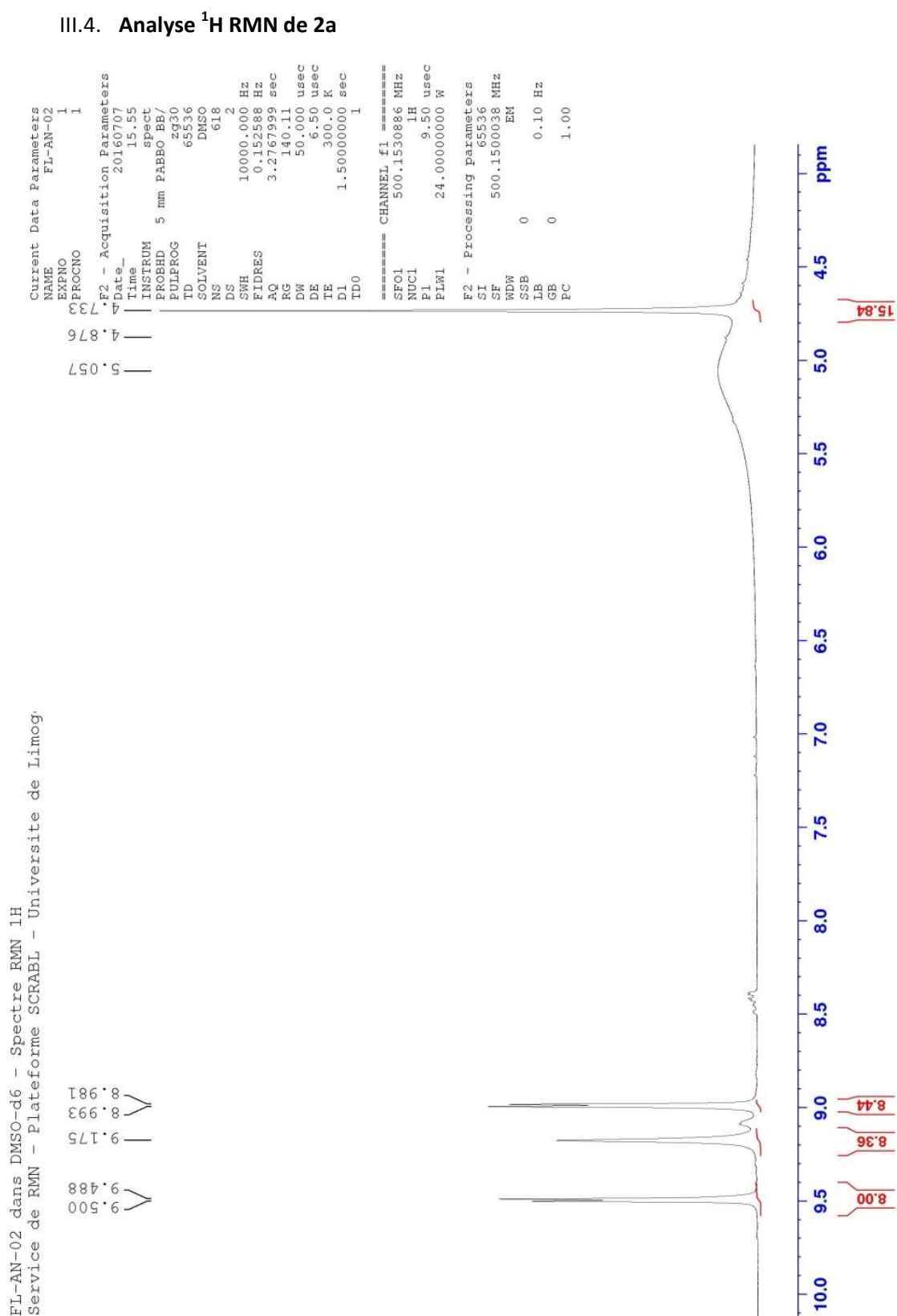


Figure 89 (S4). ^1H NMR analysis of 2a.

III.5. Analyse ^1H RMN de 2b

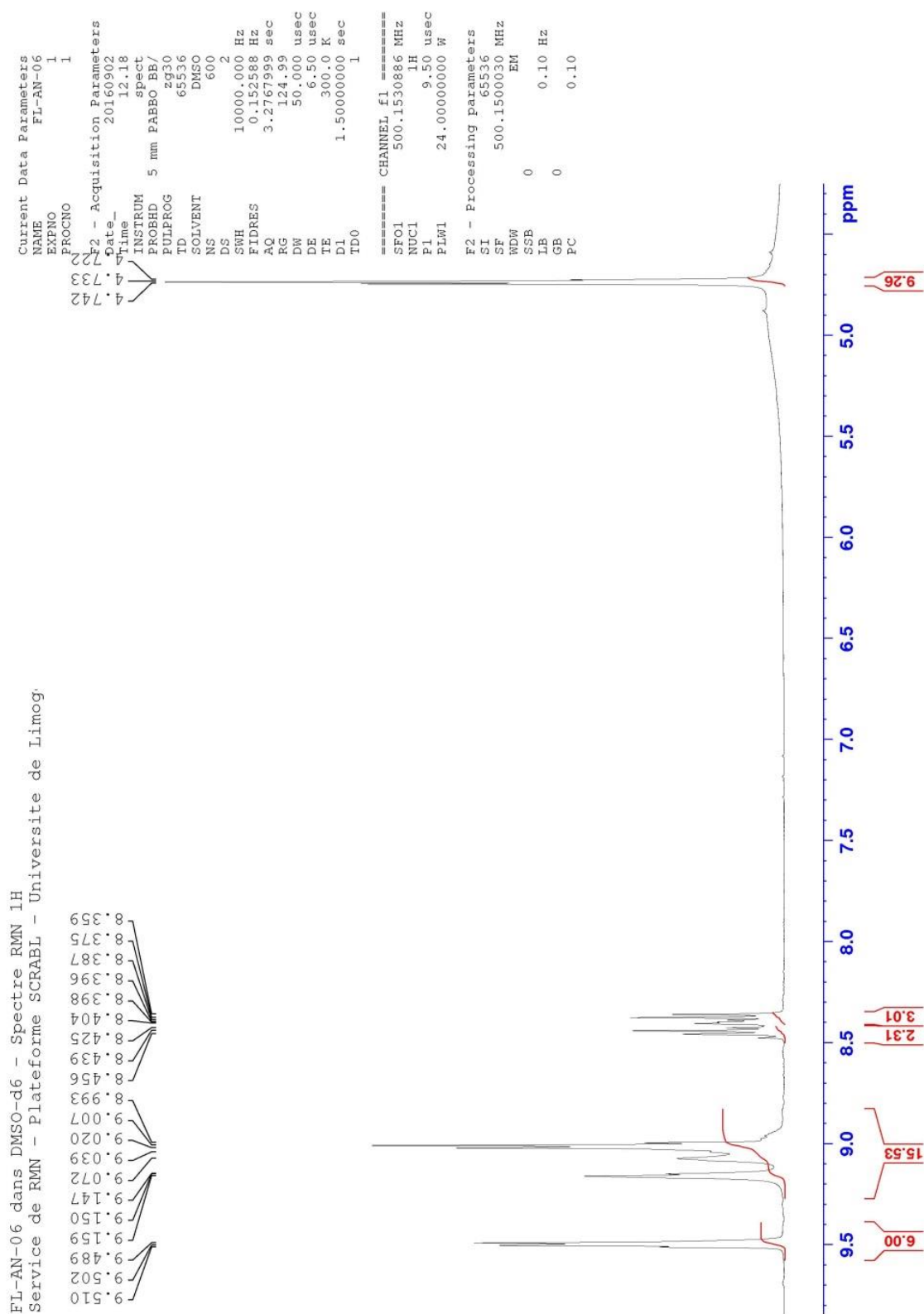


Figure 90 (S5). ^1H NMR analysis of 2b.

FL-AN-04 dans DMSO-d6 - Spectre RMN 1H
Service de RMN - Plateforme SCRABL - Université de Limog.

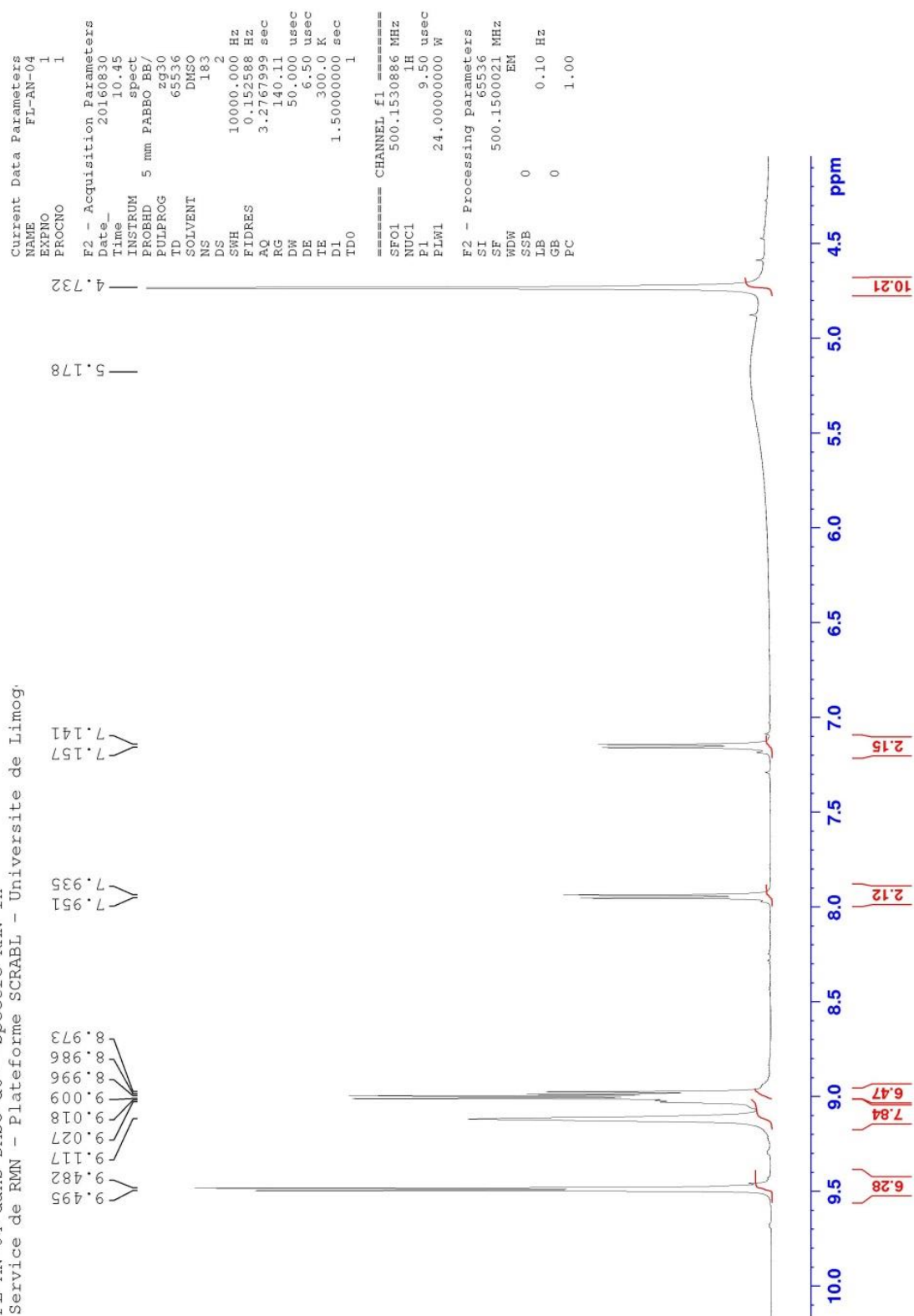


Figure 91 (S6). ^1H NMR analysis of **2d**.

III.7. Analyse ^1H RMN de 3a

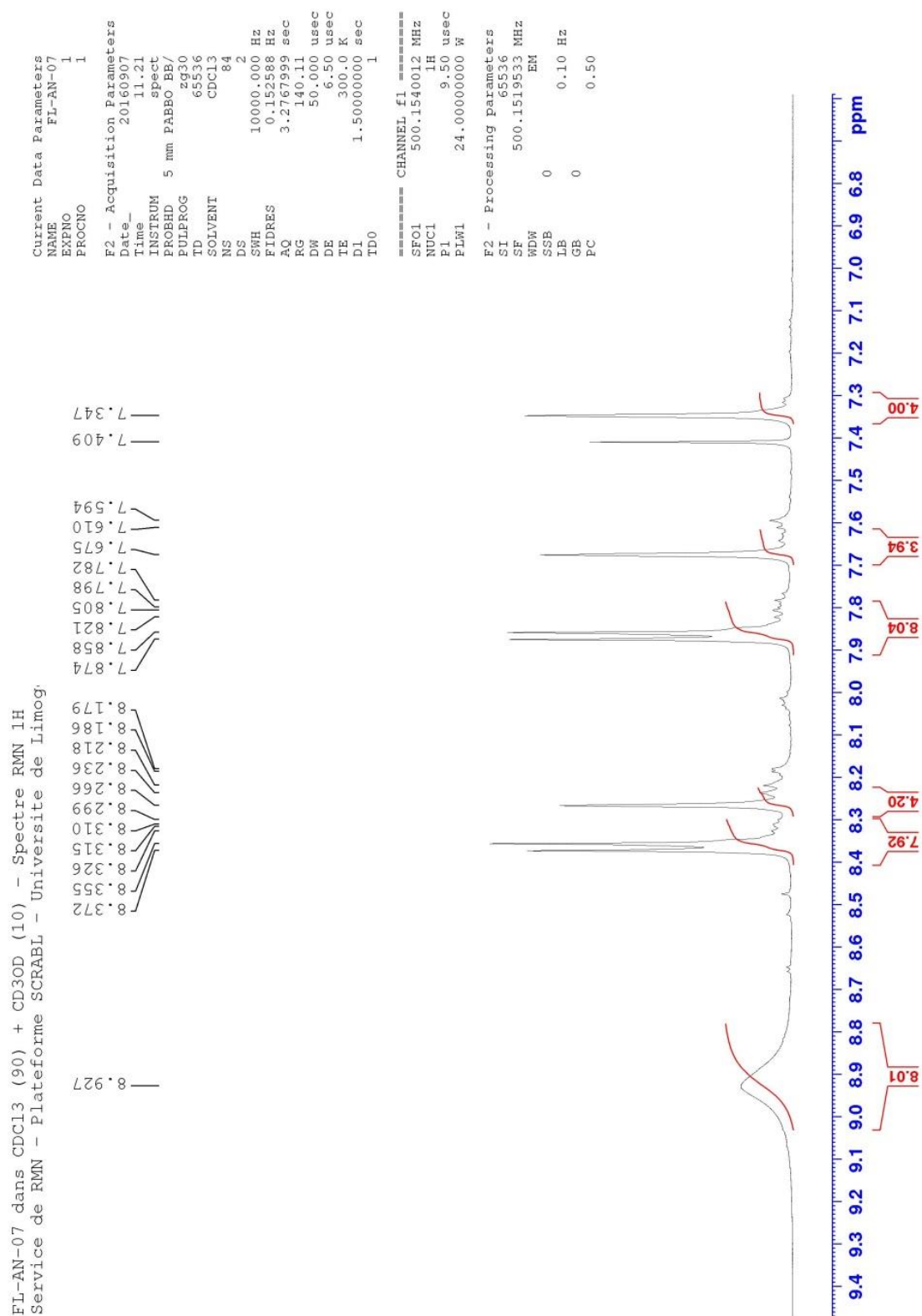


Figure 92 (S7). ^1H NMR analysis of 3a.

III.8. Analyse ^1H RMN de 3b

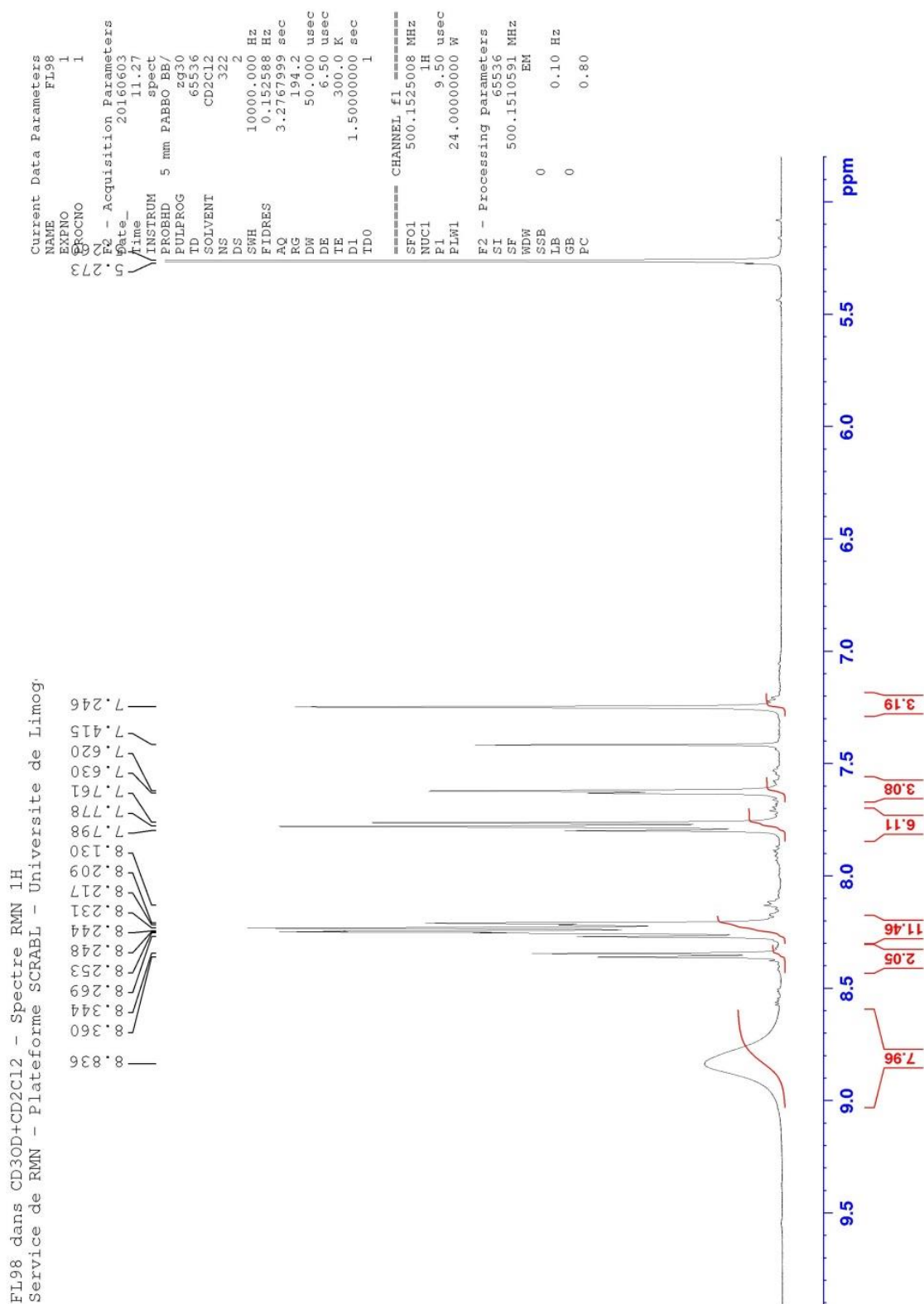


Figure 93 (S8). ^1H NMR analysis of 3b.

III.9. Analyse ^1H RMN de 3c

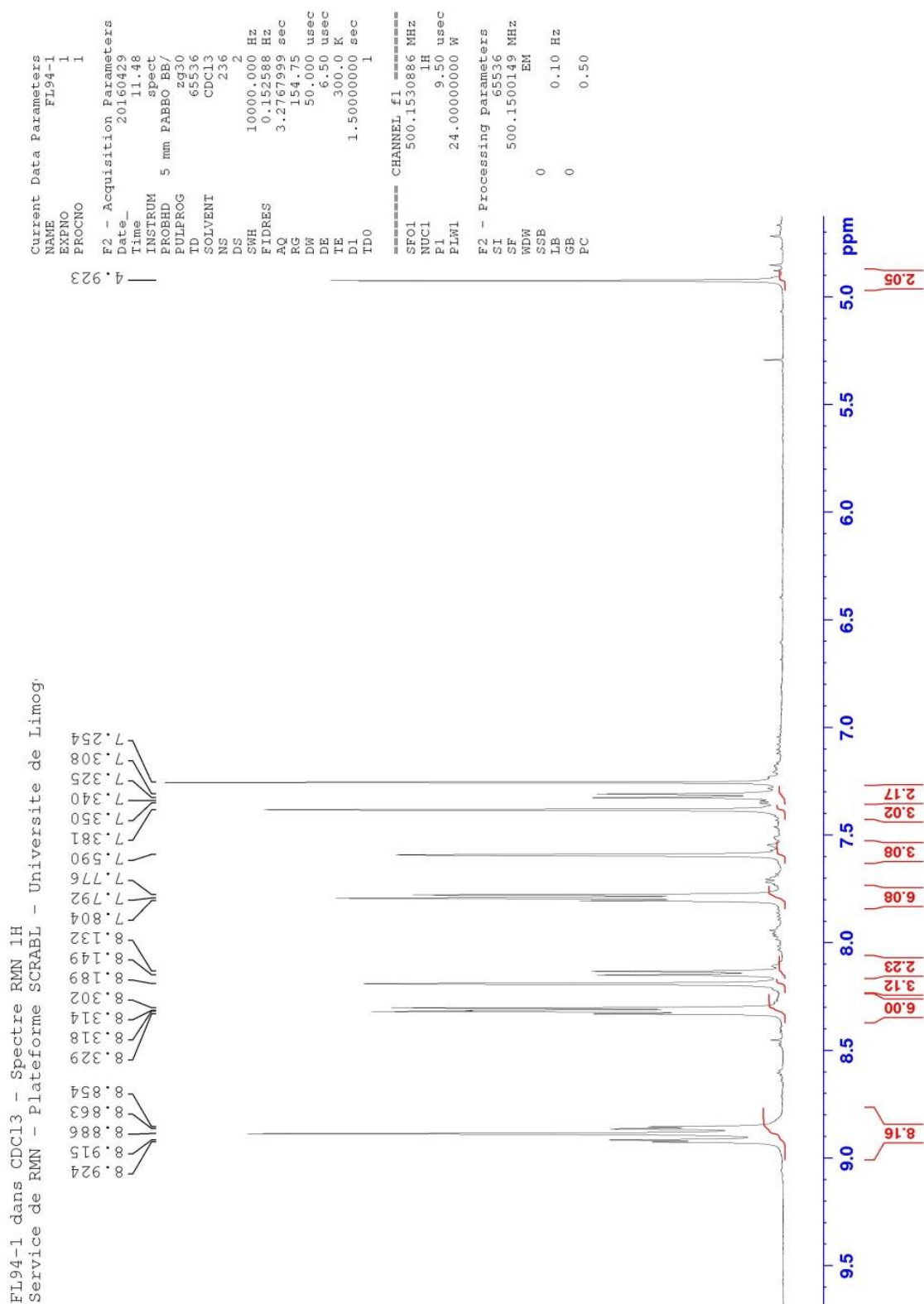


Figure 94 (S9). ^1H NMR analysis of 3c.

III.10. Analyse ^1H RMN de 4a

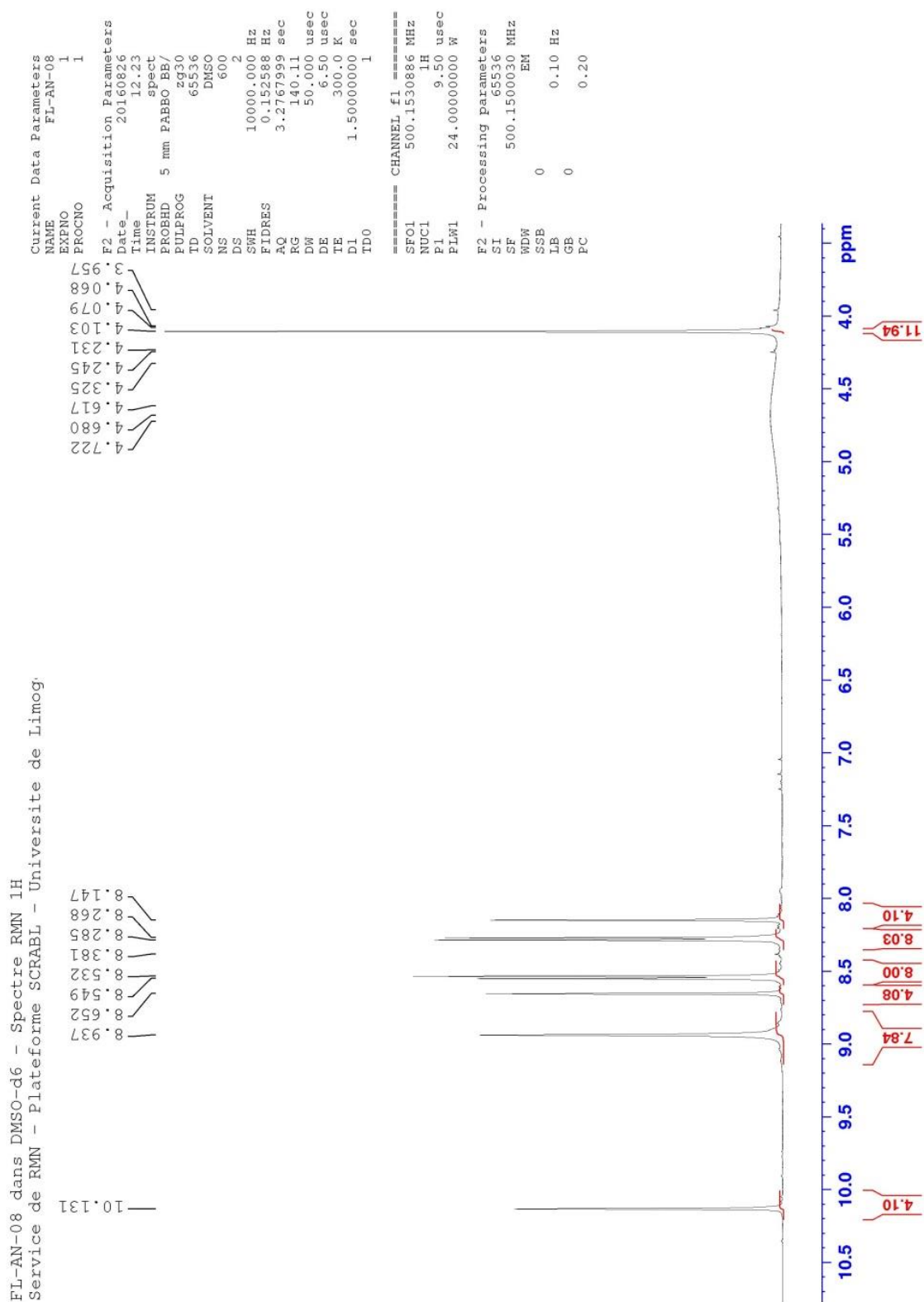


Figure 95 (S10). ^1H NMR analysis of 4a.

III.11. Analyse ^1H RMN de 4b

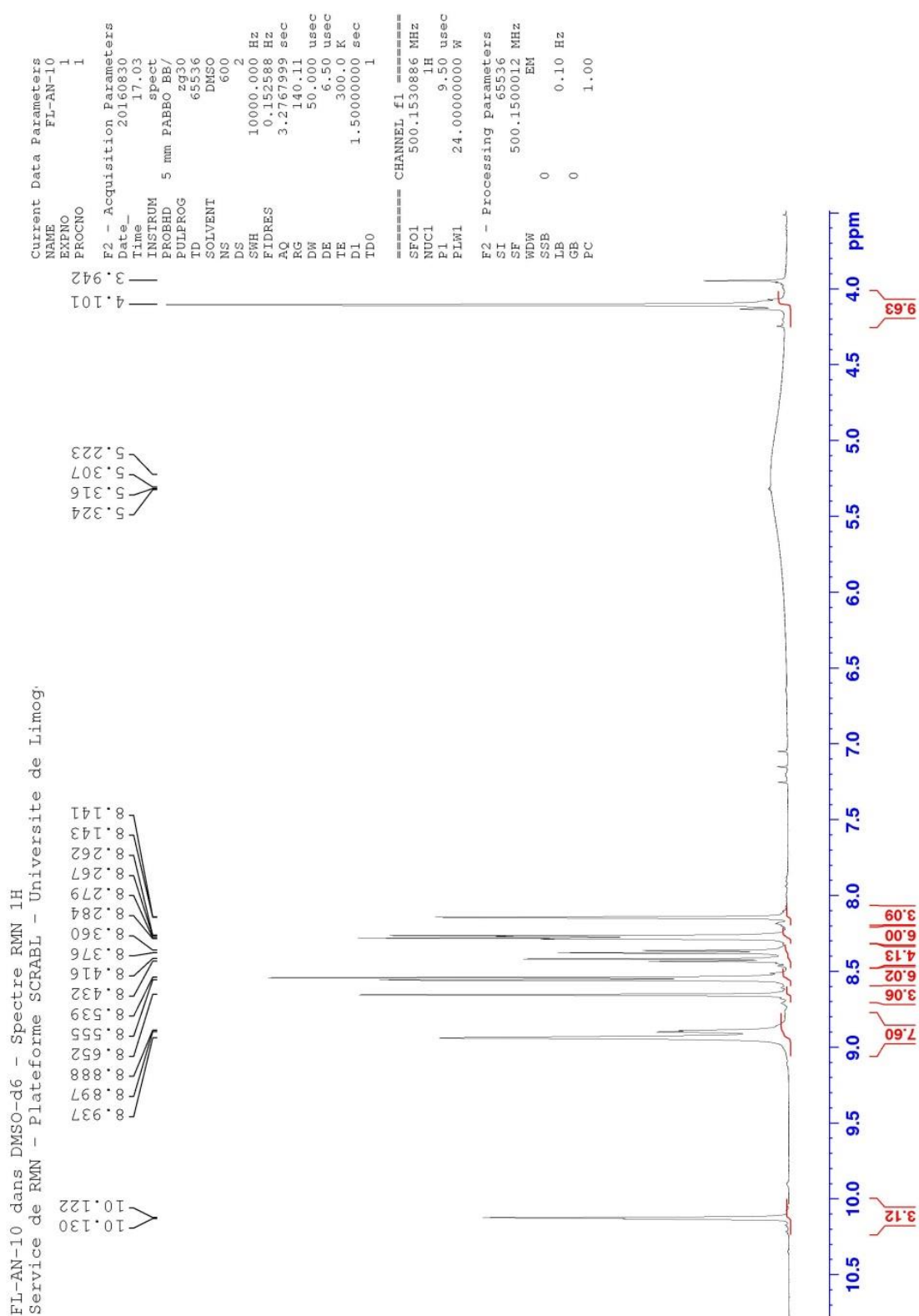


Figure 96 (S11). ^1H NMR analysis of 4b.

III.12. Analyse ^1H RMN de 4c

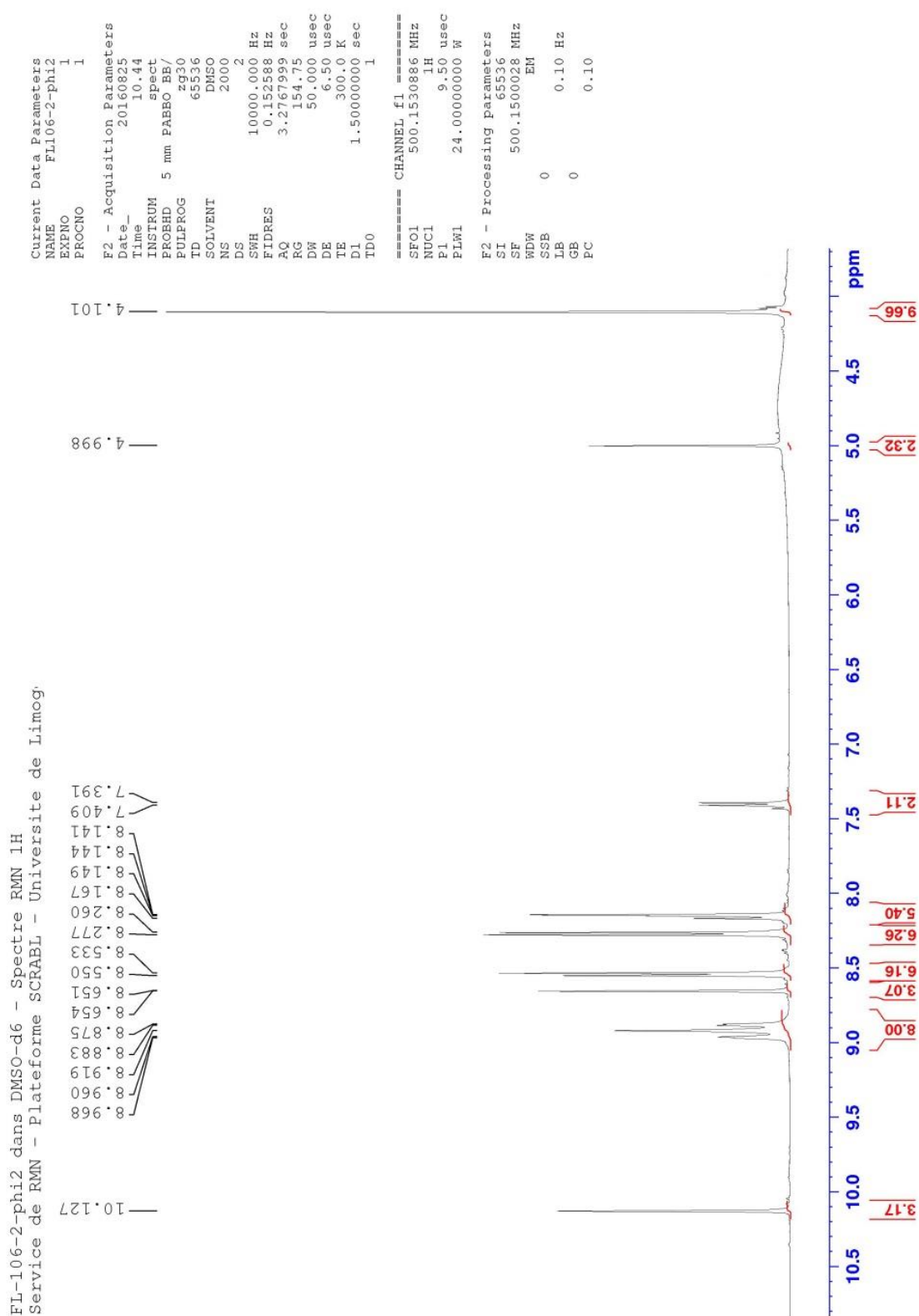


Figure 97 (S12). ^1H NMR analysis of 4c.

III.13. Analyse ^1H RMN de 5a

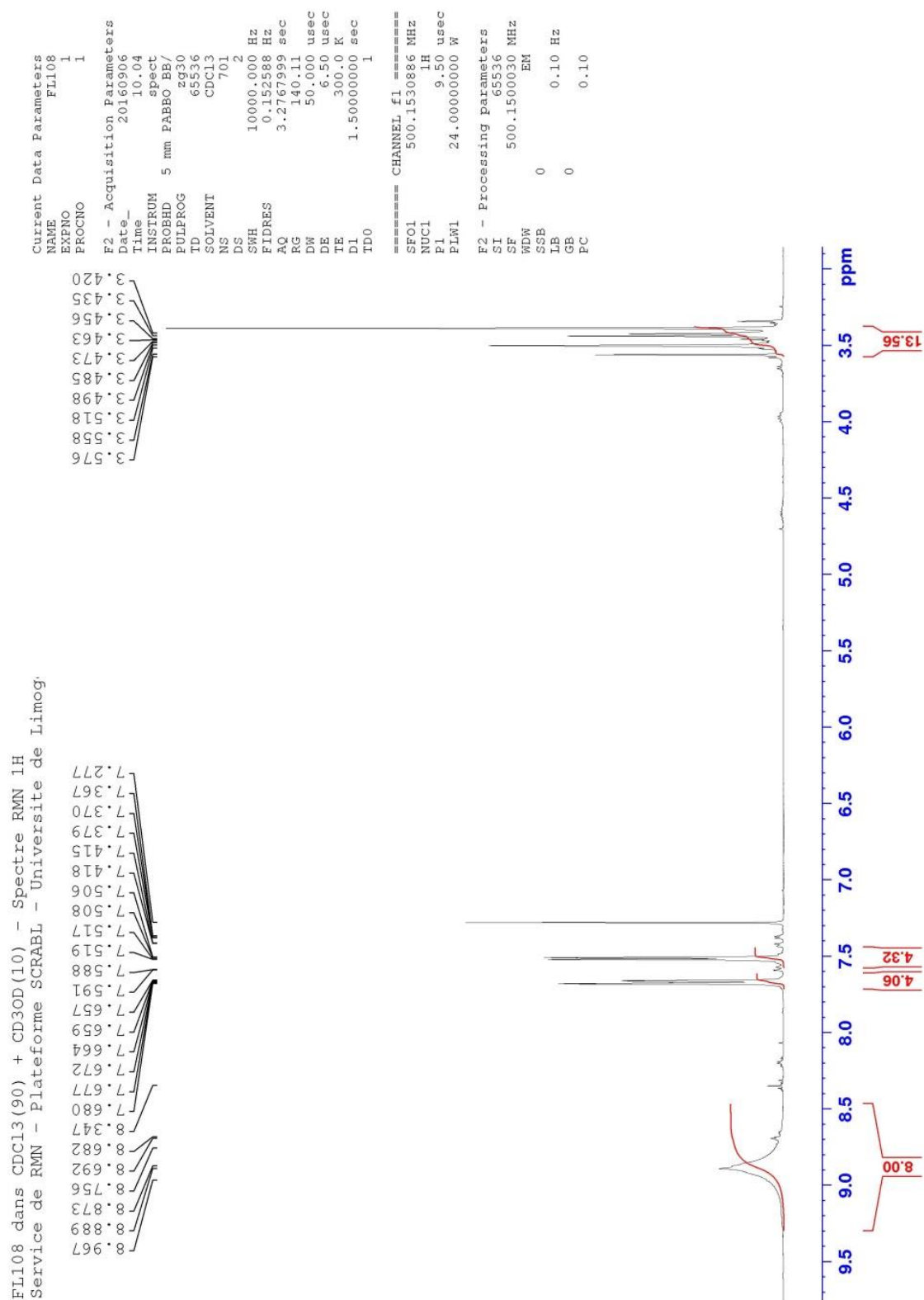


Figure 98 (S13). ^1H NMR analysis of 5a.

III.14. Analyse ^1H RMN de 5b

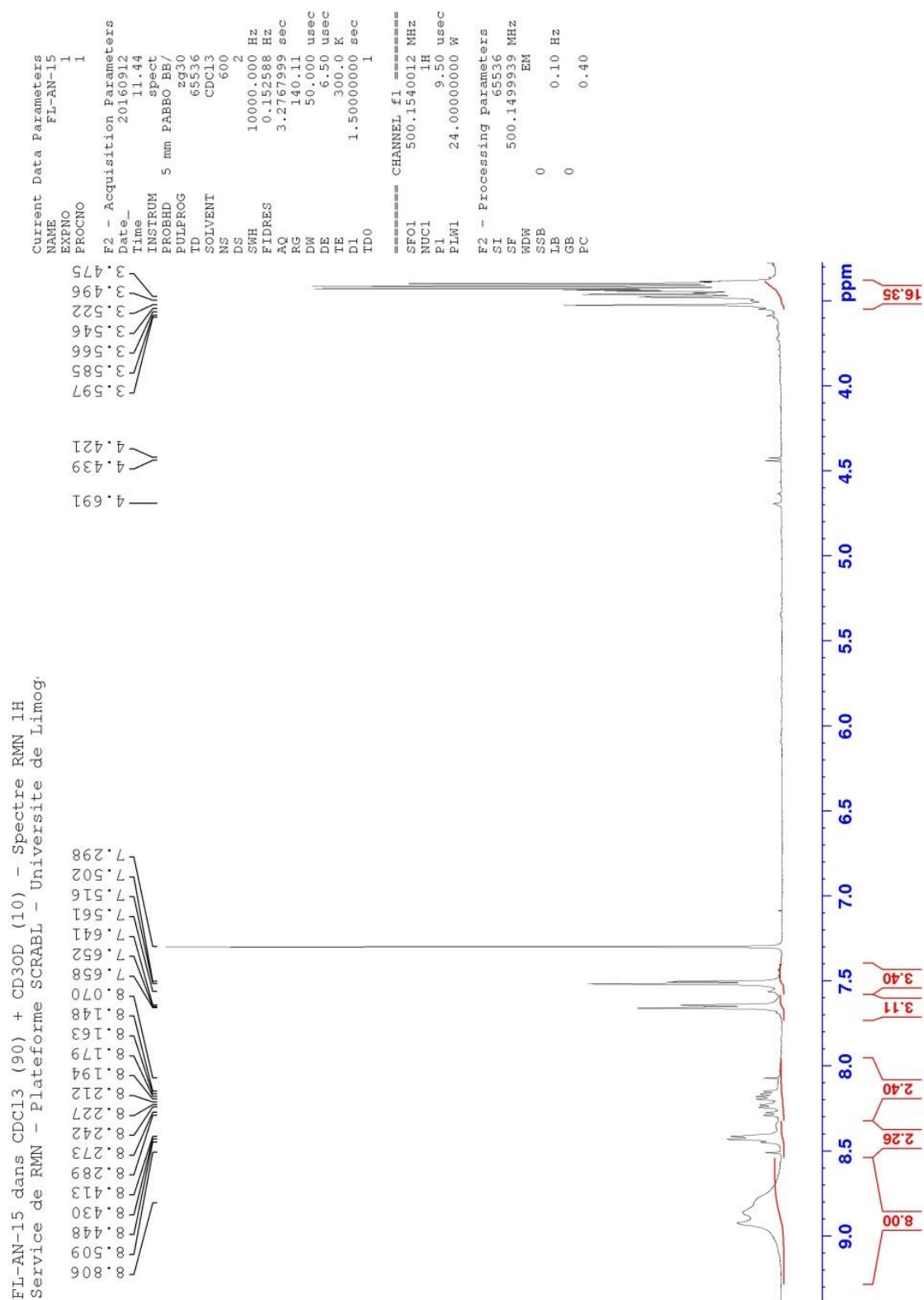


Figure 99 (S14). ^1H NMR analysis of 5b.

III.15. Analyse ^1H RMN de 5e

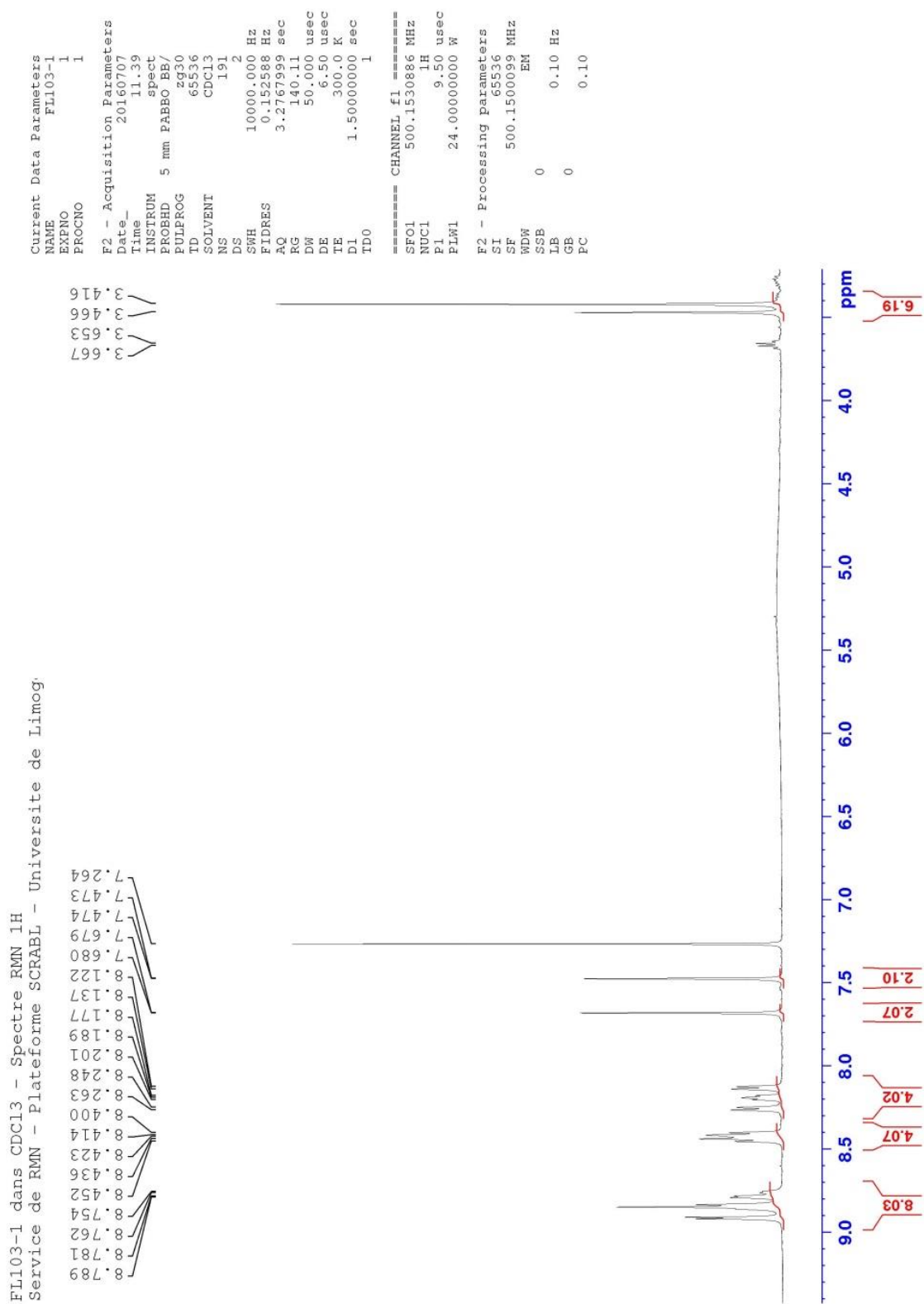


Figure 100 (S15). ^1H NMR analysis of 5e.

III.16. Analyse ^1H RMN de 6a

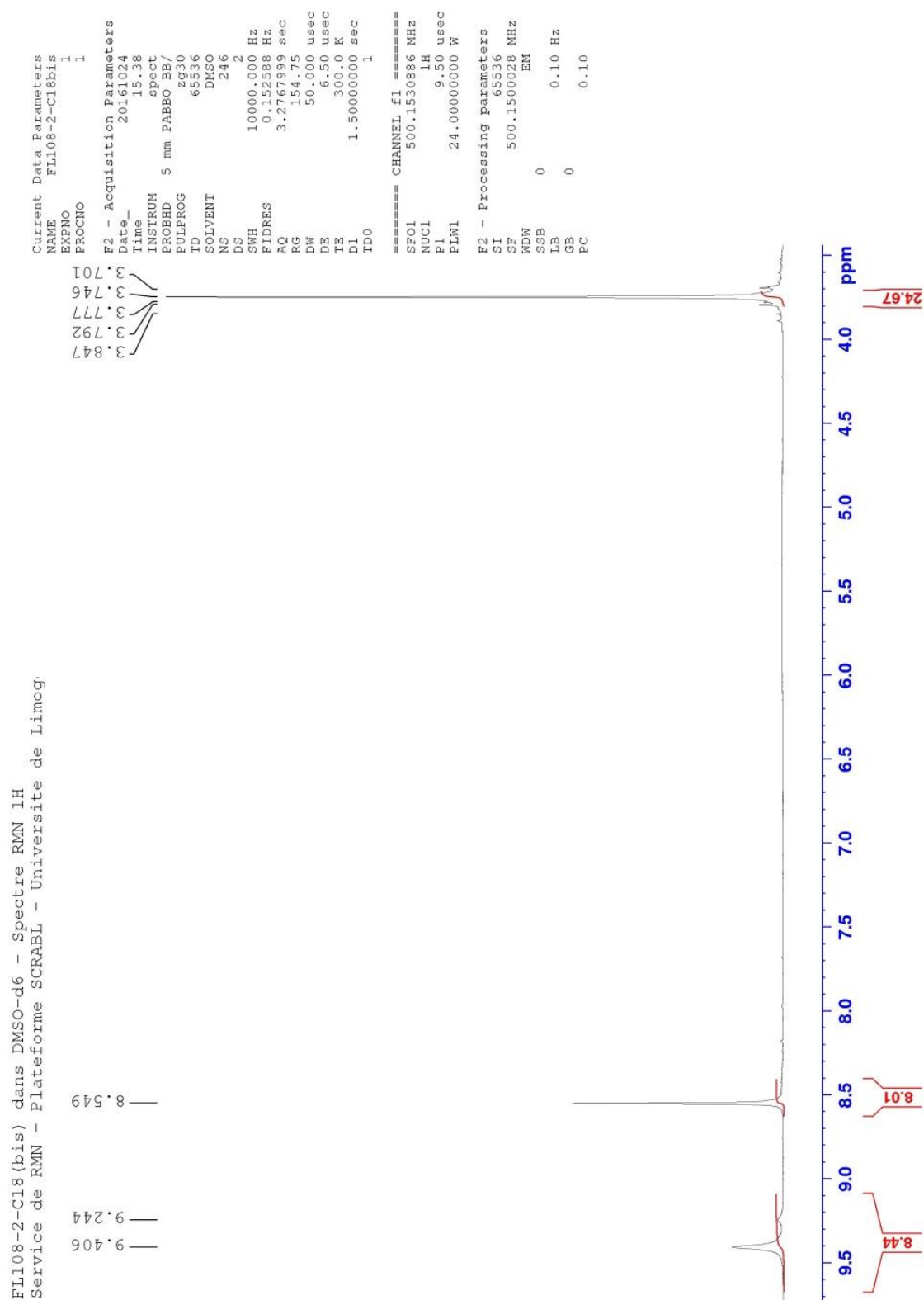


Figure 101 (S16). ^1H NMR analysis of 6a.

III.17. Analyse ^1H RMN de 6b

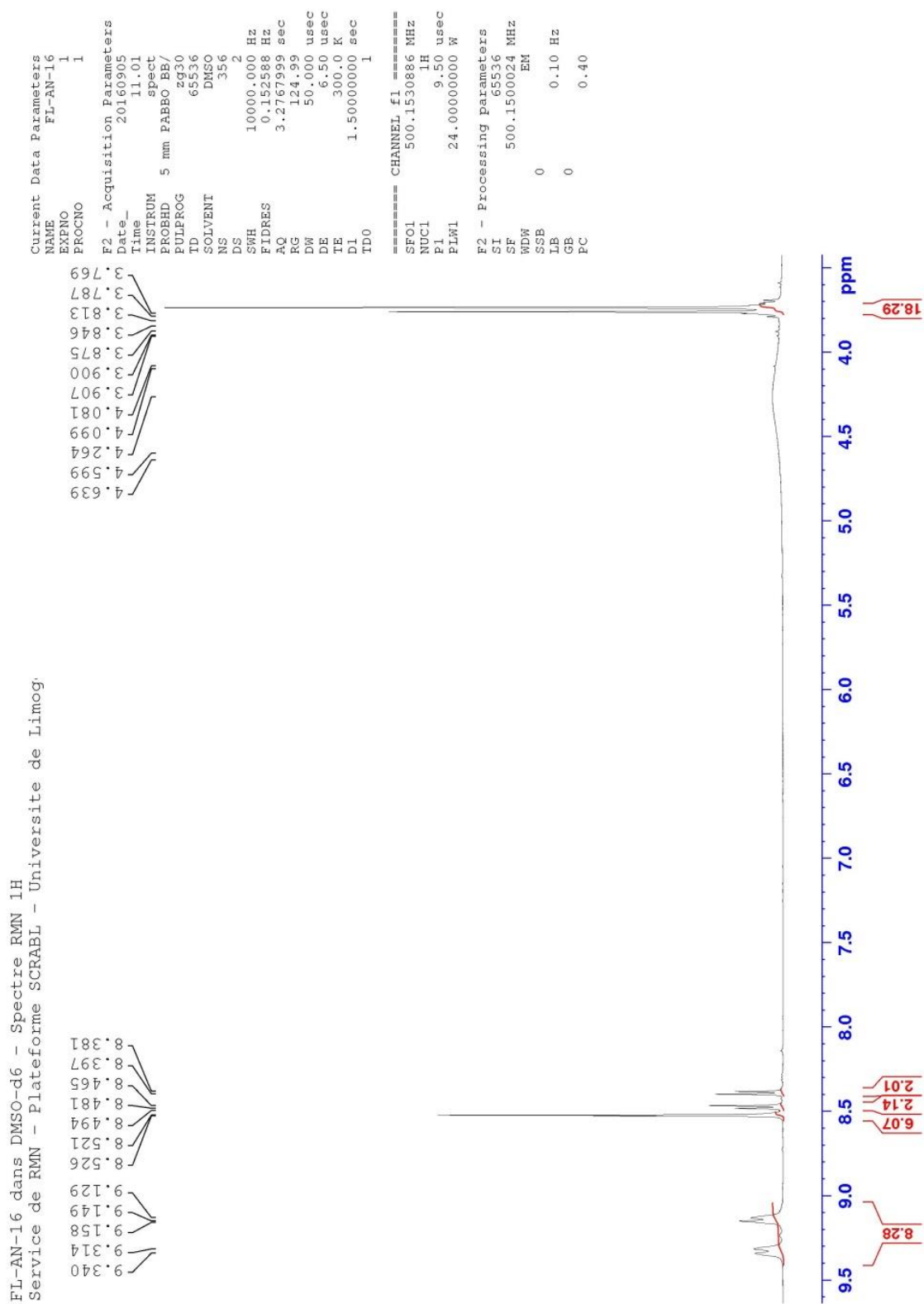


Figure 102 (S17). ^1H NMR analysis of 6b.

III.18. Analyse ^1H RMN de 6e

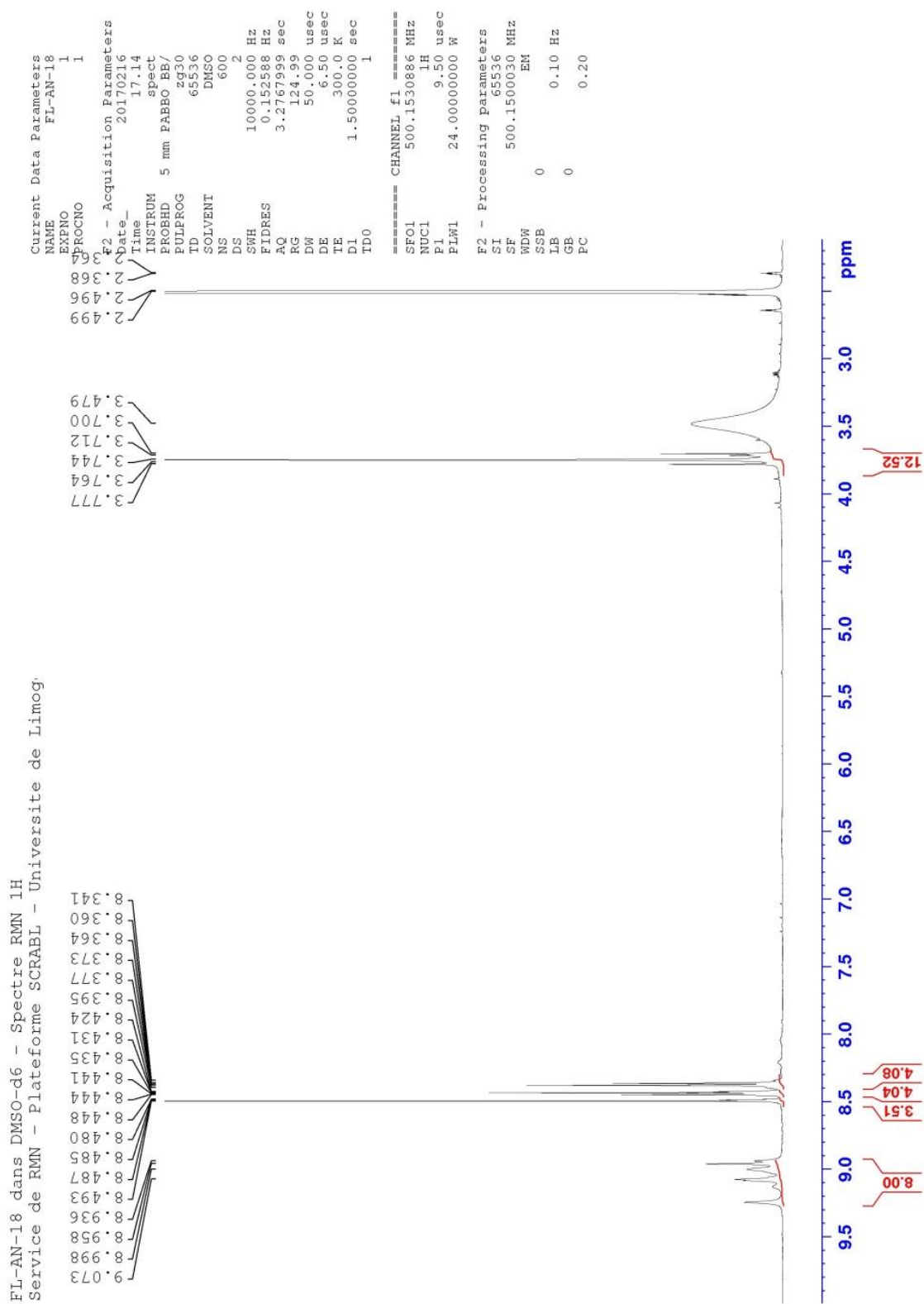


Figure 103 (S18). ^1H NMR analysis of 6e.

IV. Résumé et conclusion

Toutes les porphyrines ont pu être synthétisées selon le protocole de Little et d'Alder-Longo (Chapitre 2.III.2.4, page 52). L'utilisation de benzaldéhydes fonctionnalisés, mais protégés, a permis d'obtenir un protocole unique et efficace pour toutes les porphyrines. De plus, la déprotection des différentes fonctions offre de très bon rendements (>90%). Les rendements varient selon la famille de la porphyrine et le type de fonction sur le benzaldéhyde. Alors que les porphyrines pyridyl et méthylimidazole offrent des rendements identiques et cohérents avec la littérature, les porphyrines phénylimidazole montrent des rendements bien plus élevés (jusqu'à trois fois supérieur). Les benzaldéhydes « carboxylic acid » et « oxyethanoic acid » présentent des rendements similaires alors que l'utilisation du 4-acétamidobenzaldéhyde a un effet négatif sur la synthèse. Après caractérisation, la réactivité des acides carboxyliques a été testée. Il est apparu que la porphyrine **2b** (pyridinium portant un groupe « carboxylic acid ») a une très mauvaise réactivité contrairement aux autres composés.

L'étude photophysique a permis de mettre en avant différents comportements selon la famille de porphyrine. Les porphyrines pyridyl **1** et pyridinium **2** sont sujets à un phénomène de transfert d'électron lorsqu'un groupe « amine » est présent dans la structure, ce qui entraîne une extinction des émissions. De leur côté, les porphyrines phénylimidazole **3** et phénylimidazolium **4** ont des propriétés assez proches des porphyrines à base de phényle, même si l'augmentation de la polarité du solvant entraîne un phénomène de transfert de charge chez la porphyrine portant un groupe « carboxylic acid » **4b**. Enfin, les porphyrines méthylimidazole **5** et méthylimidazolium **6** ont montré que les groupements cationiques situés en position *meso* n'ont pas de forte influence sur les propriétés photophysiques, probablement du fait de l'encombrement stérique. Finalement, toutes les porphyrines cationiques ont des rendements assez élevés en milieux aqueux, et la présence d'un groupe « carboxylic acid » semble augmenter très légèrement ces rendements, notamment chez les porphyrines méthylimidazolium **6**.

Les essais biologiques sur différentes souches bactériennes ont montré des résultats divergents. Alors que la porphyrine pyridinium **2a** reste un bon standard en aPDT, la porphyrine méthylimidazolium **6e** a montré des CMB plus élevées, probablement à cause d'une production de ROS moins élevée. En revanche, la porphyrine phénylimidazolium **4a** montre d'excellents résultats contre *S. aureus* et surtout contre *E. coli* (7 fois plus efficace que **2a**). Cette étude a permis de mettre en avant de nouvelles familles de porphyrines cationiques. En effet, alors que les porphyrines pyridinium **2** sont soumises à des transferts d'électrons ou de mauvaises réactivités, les autres familles sont moins sujettes à ces effets. De plus, la famille phénylimidazolium **4a** offre une efficacité très importante contre *E. coli*.

Chapitre 4 : Optimisation de la thérapie photodynamique antimicrobienne par couplage avec des dérivés de polymyxine B

Dans ce chapitre, nous avons étudié des composés associant une porphyrine cationique et deux différents dérivés de polymyxine B dans le but d'optimiser le ciblage de la thérapie photodynamique antimicrobienne. La synthèse, les propriétés photophysiques et la capacité antibactérienne de chaque association ont été examinées.

I. Activité et sélectivité accrue d'une porphyrine cationique après couplage avec la polymyxine B

I.1. Principe

En s'inspirant des travaux de l'équipe du professeur Reddi²⁴⁸, nous souhaitons relier chimiquement une porphyrine cationique avec un dérivé de polymyxine B. L'objectif était d'associer l'efficacité de la porphyrine cationique et la capacité de la polymyxine B à s'associer spécifiquement avec le lipide A des bactéries Gram négatif et à fragiliser leur membrane externe.

En étudiant les différentes « sondes polymyxine » existantes, nous avons choisi de travailler dans un premier temps avec un dérivé actif du peptide. En effet, même si de nombreux travaux montrent que le couplage de la polymyxine avec un fluorochrome permet d'obtenir une sonde visant spécifiquement les bactéries Gram négatif, la modification structurale du peptide engendre souvent une incertitude sur la cible véridique.^{262,263} Ainsi, dans cette étude, un peptide présentant une bonne activité antimicrobienne a été utilisé, car cette efficacité témoigne de l'interaction entre le peptide et le lipide A.

La 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-*N*-méthylpyridyl)-21H,23H-porphyrine fut choisie en tant que porphyrine cationique déjà référencée de la littérature. Afin d'obtenir une réaction chimiospécifique entre le PS et le peptide, une réaction de Michael entre un soufre et une fonction maleimide (« click » thiol-maleimide) fut choisie, étant donné le nombre important d'amines primaires déjà présentes dans la structure de la polymyxine. Ainsi, conformément à la relation « Structure-activité » de la polymyxine, le premier acide aminé a été remplacé par une cystéine et un bras maléimide a été combiné à la porphyrine. Le mélange des deux parties distinctes dans une solution adéquate a permis d'obtenir le composé finale **5** (« P⁺-PMB »). Ensuite, ce dernier a été analysé et mis au contact de bactéries.

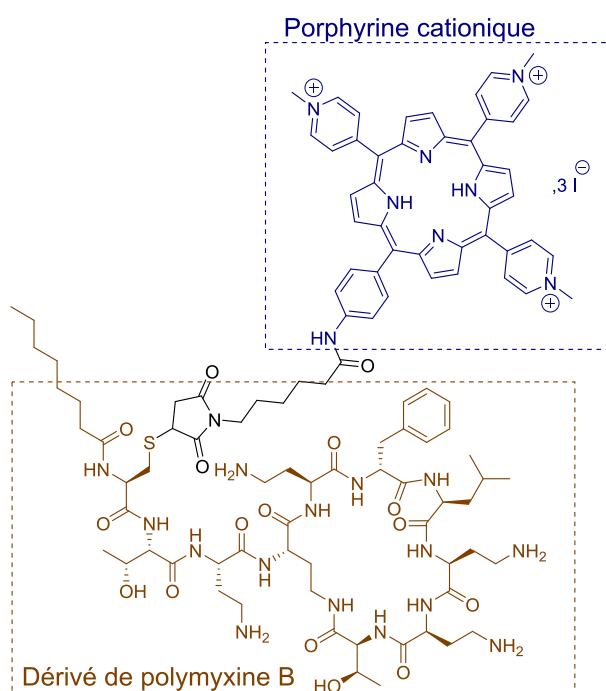


Figure 104. Structure chimique du composé final **5** (« P⁺-PMB »).

Enhanced Photobactericidal and Targeting Properties of a Cationic Porphyrin following the Attachment of Polymyxin B

Florent Le Guern,[†] Vincent Sol,^{*,†,‡} Catherine Ouk,[‡] Philippe Arnoux,[§] Céline Frochot,[§] and Tan-Sothea Ouk^{*,†}

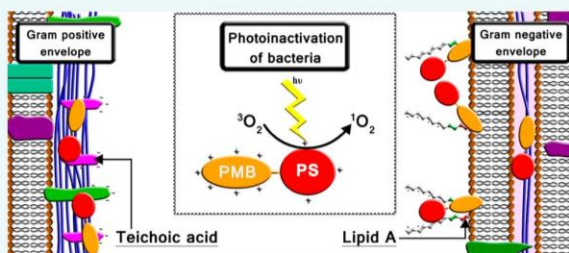
[†]Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, CEDEX, France

[‡]Université de Limoges, BISCEM, 87000 Limoges, France

[§]Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274 CNRS Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France

Supporting Information

ABSTRACT: A novel compound consisting of a cationic porphyrin covalently attached to a derivative of polymyxin B has been synthesized and presents enhanced activity and targeting properties compared to the usual cationic porphyrins recognized as efficient photosensitizers in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). A synthesis pathway was established to preserve the bactericidal activity of the peptide. Accordingly, the N-terminal amino acid (L-2,4-diaminobutyric acid) of polymyxin B (PMB) was switched for a cysteine residue. Then, the resulting derivative of PMB was covalently bound to 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridyl)-21H,23H-porphyrin using a thiol–maleimide “click” coupling. The peptide-coupled photosensitizer has demonstrated an improved PACT efficiency compared to the cationic porphyrin alone. This enhancement has been observed against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* in particular. Flow cytometry analyses and confocal imaging microscopy demonstrated that the porphyrin–peptide conjugate selectively adhered to the cell walls of either Gram-positive or Gram-negative bacteria, thus justifying the damages induced by singlet oxygen production.



■ INTRODUCTION

Chronic wound infection represents a worldwide problem in public health. Besides leading to frequent delay in wound healing, infected wounds are responsible for considerable morbidity and mortality and are associated with increasing healthcare costs.¹ The emergence of multidrug-resistant (MDR) bacteria renders the management of infected chronic wounds ever more challenging. Moreover, evidence suggest that bacterial biofilm plays a significant roles in the inability of chronic wounds to heal.^{2,3} When subcutaneous tissues are exposed to the environment, they become vulnerable and can be contaminated by microorganisms from the surroundings or from the skin microbiome (i.e., *Staphylococcus epidermidis* or *Corynebacterium sp.*).^{4,5} Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Acinetobacter baumannii*) tend to appear in the upper layers of open wounds a few weeks after initiation. Even if they are unable to reach deeper tissues, they increase the wound microbial burden and pathogenicity.^{6–8}

The emerging ineffectiveness of regular treatments has promoted the study of other strategies that would be able to reduce the impact of microbial infections. Around the world, laboratories are turning their attention toward a recent and promising alternative to antibiotics (particularly for the

treatment of superficial infections), namely photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). This technique relies on the photochemical activation of photosensitizers (PS) in the presence of dioxygen (³O₂). Under appropriate light irradiation, PS activation leads to the production of singlet oxygen (¹O₂) by energy transfer or oxygen radicals by electron transfer. These species are called reactive oxygen species (ROS) and are able to rapidly react with a large panel of molecules (proteins, lipids, and nucleic acids); the number and diversity of the cellular damage greatly limit the rise of bacterial strains that are resistant to this treatment.^{9,10} Owing to their very short life span, ROS do not end up in the waste system, unlike common sanitizers, and are thus environmentally friendly.^{9,11} PACT was first carried out against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), with promising results.¹² Unfortunately, Gram-negative bacteria have shown a poor sensitivity to the initially studied PS, mainly due to their outer membrane (OM).^{13,14} Although PACT exhibits many advantages for bacterial photoinactivation, its lack of specificity is a major drawback because it causes damages to the host tissues as well.¹⁵ However, it has been

Received: August 28, 2017

Published: August 30, 2017

shown that cationic PS exhibited a good affinity for bacteria by interacting through electrostatic interactions, with the highly negatively charged cell wall components, such as lipoteichoic acid (LTA) in Gram-positive and lipopolysaccharide (LPS) in Gram-negative bacteria.^{16–18} Unfortunately, the phospholipid species of mammalian cells may also interact with cationic PS. Even if adsorptive endocytosis is a slow process, the interaction between the PS and the bacteria has to be as strong as possible to reduce unwanted effects on mammalian cells.¹⁹ Nevertheless, cationic porphyrins displayed photo-induced activity against a broad spectrum of bacteria,^{18,20} and this trend was also confirmed with several families of cationic PS.^{21–23} Despite their affinity for bacteria, such PS do not present a very strong interaction with Gram-negative bacteria and bacteria-absorbed PS can be easily washed out.²⁴ Moreover, a very high effective dose of PS may be required to photo-inactivate a few resilient species, such as *P. aeruginosa*. These two major issues may lead to damage to human cells, thus hampering treatment of infected wounds by means of PACT.

Polymyxins represent a group of polypeptide antibiotics, produced by several strains of *Paenibacillus polymyxa*.²⁵ Polymyxins consist of 10 amino acid residues with a heptapeptide ring and a linear tripeptide acylated by a fatty acid at its amino terminus (Figure 1). A total of five L-

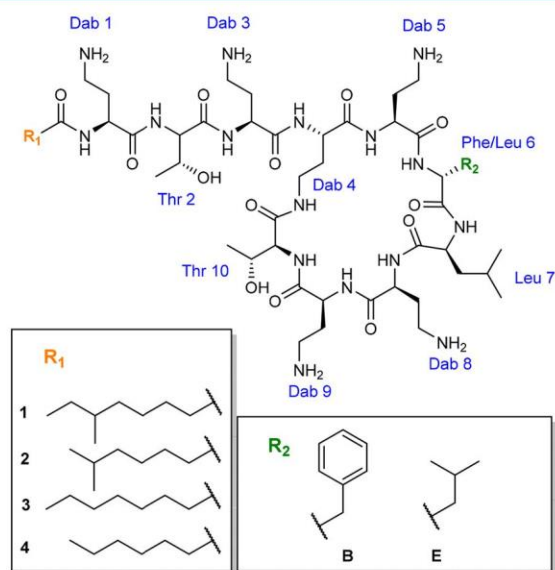


Figure 1. General structure of polymyxins. The 10 amino acid sequence, with a cyclization between residues 4 and 10, composes the hydrophilic “head”, whereas R_1 is related to the lipophilic “tail”. Polymyxins are named E or B depending on the sixth residue (R_2).

diaminobutyric acid (L-Dab) residues, positively charged, are found in positions 1, 3, 5, 8 and 9.²⁶ Initially, polymyxins included five different molecules (named polymyxin A–E), but nowadays, only two of them (B and E, also known as colistin) are used in clinical practice. The difference between these two peptides is based on the sixth amino acid: D-phenylalanine for polymyxin B and D-leucine for colistin. The variation of the lipophilic “tail” leads to subfamilies 1 to 4 according to their length and ramification. Generally, commercial polymyxin B (PMB) is a mixture mainly composed of PMB₁ and PMB₂. Due to the electrostatic interaction between polymyxins and LPS, the polycationic peptide ring binds to the OM. Moreover, these peptides can fold such that polar and hydrophobic parts

can be distinguished. This amphipathic structure strongly hitches the peptide to lipid A because the polar part interacts with the negatively charged phosphate headgroups of lipid A while the hydrophobic domain includes itself into the fatty acyl layer of OM, which causes the expansion of the monolayer. The accumulation of these peptides also leads to the displacement of divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) and then to the instability of the LPS layer. Thus, polymyxins permeabilize the OM, which permits the passage of a variety of molecules and the uptake of these perturbing peptides itself, leading to the cell death (self-promoted uptake mechanism).^{27,28} Known as the “last-line” treatment against Gram-negative resistant strains, polymyxins are becoming increasingly common.²⁹ In 2016, the first colistin-resistant *E. coli* strain showed up in a medical environment.³⁰

Different approaches have been developed to improve PACT:³¹ the addition of targeting agents such as a peptide²⁴ or a cationic polymer^{32,33} and the use of a disrupting membrane agent such as EDTA³⁴ or an antibiotic.³⁵ In a previous study, Dosselli and co-workers designed a new type of conjugate by covalent attachment of the antimicrobial peptide apidaecin 1b to a cationic porphyrin to improve the efficiency and the targeting of the latter.²⁴ Despite an interesting result obtained with another conjugate consisting of a neutral porphyrin, the cationic porphyrin–peptide conjugate, for its part, has shown an attenuation of the photobactericidal activity and a lack of specific interaction. Promising results were then obtained with a neutral porphyrin conjugated to YI13WF or buforin antimicrobial peptides.^{36,37} Nonetheless, no such trend was observed with conjugates based on cationic porphyrins. However, Nitzan and co-workers have demonstrated that PMB has the ability to increase the effect of PACT on Gram-negative bacteria by disorganizing bacterial membranes.³⁵ In addition, polymyxin–dansyl probing has been studied by Deris and co-workers,³⁸ demonstrating that the interaction of polymyxin with LPS is mildly influenced by the coupling with a fluorophore.

In the present work, and in connection with our research program in PACT, we report the synthesis and characterization of a novel cationic porphyrin–polymyxin B conjugate (S, Figure 2) along with a study of its photobactericidal properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria. A “thiol–ene click” reaction allowed us to covalently bind a cationic photosensitizer to a modified peptide, in clean and soft conditions (PBS medium, without catalyst). The conjugate has shown promising results that indicate an enhanced photo-activity and targeting toward Gram-negative bacterial strains and, surprisingly, toward a Gram-positive strain as well.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization of the Conjugate. The purpose of this study is to ensure the targeting of lipid A of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Thus, we decided to favor a synthesis pathway based on an active polymyxin (as opposed to the polymyxin nanopeptide)³⁵ because its antimicrobial power is undoubtedly related to this target (Scheme 1). Moreover, results obtained with a conjugate based on an inactive polymyxin derivative must be interpreted with caution.³⁹ Thus, the synthesis pathway was based on the creation of an efficient derivative of polymyxin carrying a thiol function as this function provides a chemiospecific reaction because polymyxins contain a consequent number of primary amine and hydroxyl groups. In addition, the review by Velkov and co-workers²⁸ established the involvement of each amino

B

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

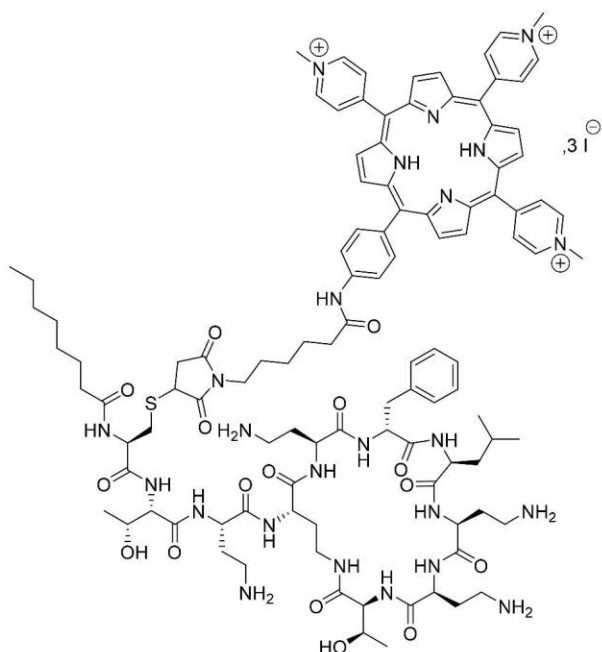
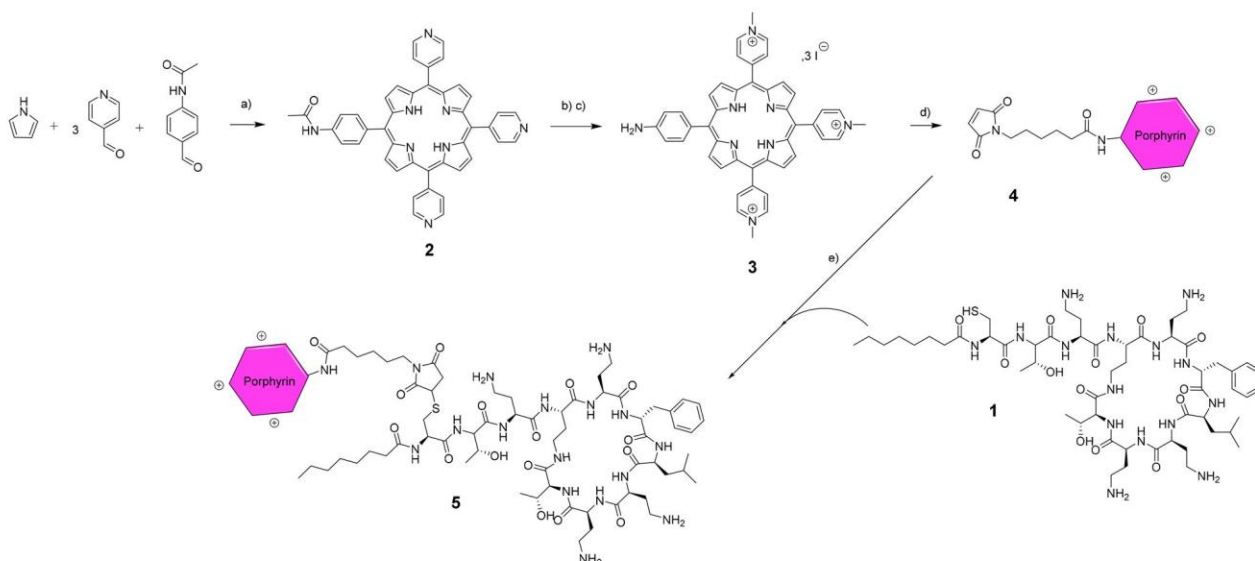


Figure 2. Chemical structure of the cationic porphyrin–polymyxin B conjugate (**5**).

acid in the bactericidal activity of polymyxin in its ability to target lipid A. According to another communication by Kanazawa and co-workers,⁴⁰ the modification of residues 1 or 3 only led to a mild decrease of antimicrobial activity. Accordingly, a specific Michael addition reaction between a thiol and a maleimide function, known as thiol–maleimide “click” coupling, could be considered.^{41,42} Because the synthesis of a porphyrin derivative carrying a maleimide function was totally feasible, the first amino acid of the polymyxin primary structure was switched for a L-cysteine. Moreover, the click “thiol–maleimide” reaction precluded the use of catalysts and

the needs for large amounts of porphyrin. A trityl protecting group was chosen for this amino acid to anticipate an unlikely but potential reaction of primary amines with maleimide because the deprotection of the trityl group can be carried out without modification of the Boc functions protecting the Dab amino acid residues.

According to previous studies,^{43,44} the synthetic protocol of polymyxin derivative **1** was slightly modified (Figure S1). Apart from the modification of the primary structure, the synthesis only differs at the deprotection step of the Dde group (step III). Whereas this reaction is usually managed by action of hydrazine on the protecting group, a mixture of hydroxylamine and imidazole is also efficient according to a study by Diaz-Mochon and co-workers.⁴⁴ Moreover, contrary of hydrazine, these reagents are unable to reduce the allyl group located on the first grafted amino acid residue and allowed to work in safe conditions. Porphyrin **2** was successfully prepared using the Little⁴⁵ condensation and was obtained, after purification by column chromatography, with a 2% yield. In this strategy, we have chosen first to alkylate *meso*-pyridyl substituents with an excess amount of methyl iodide. Then, to obtain compound **3**, which carries a primary amine, the crude product was directly hydrolyzed with an acidic solution made of TFA/H₂O (25:75, v/v). **3** and 6-maleimidohexanoic acid were bound through amide formation using an excess of (2-(6-chloro-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium-hexafluorophosphate (HCTU) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) in anhydrous dimethylformamide (DMF) at room temperature. After purification by reverse-phase chromatography, compound **4** was obtained with only 30% yield. A low yield was obtained for this synthesis despite the usual good reactivity of uronium salt. In fact, the final product was hardly extracted from remaining reactants and other benzotriazole derivatives. Some improvements are currently in progress to increase the yield of this step by using other catalysts and a different purification protocol (e.g., by means of preparative high-performance liquid chromatography [HPLC]). To obtain the final product **5**, a

Scheme 1. Synthetic Route of Cationic Porphyrin–Polymyxin B Conjugate (5)^a

^a(a) Propionic acid, 3 h, 140 °C. (b) Iodomethane, anhydrous dimethylformamide (DMF), 1 h, 140 °C. (c) 25% TFA/H₂O, 5 h, 100 °C. (d) 6-Maleimidoheptanoic acid, HCTU, DIEA, anhydrous DMF, 24 h, RT. (e) PBS pH 6.5, 24 h, RT.

C

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

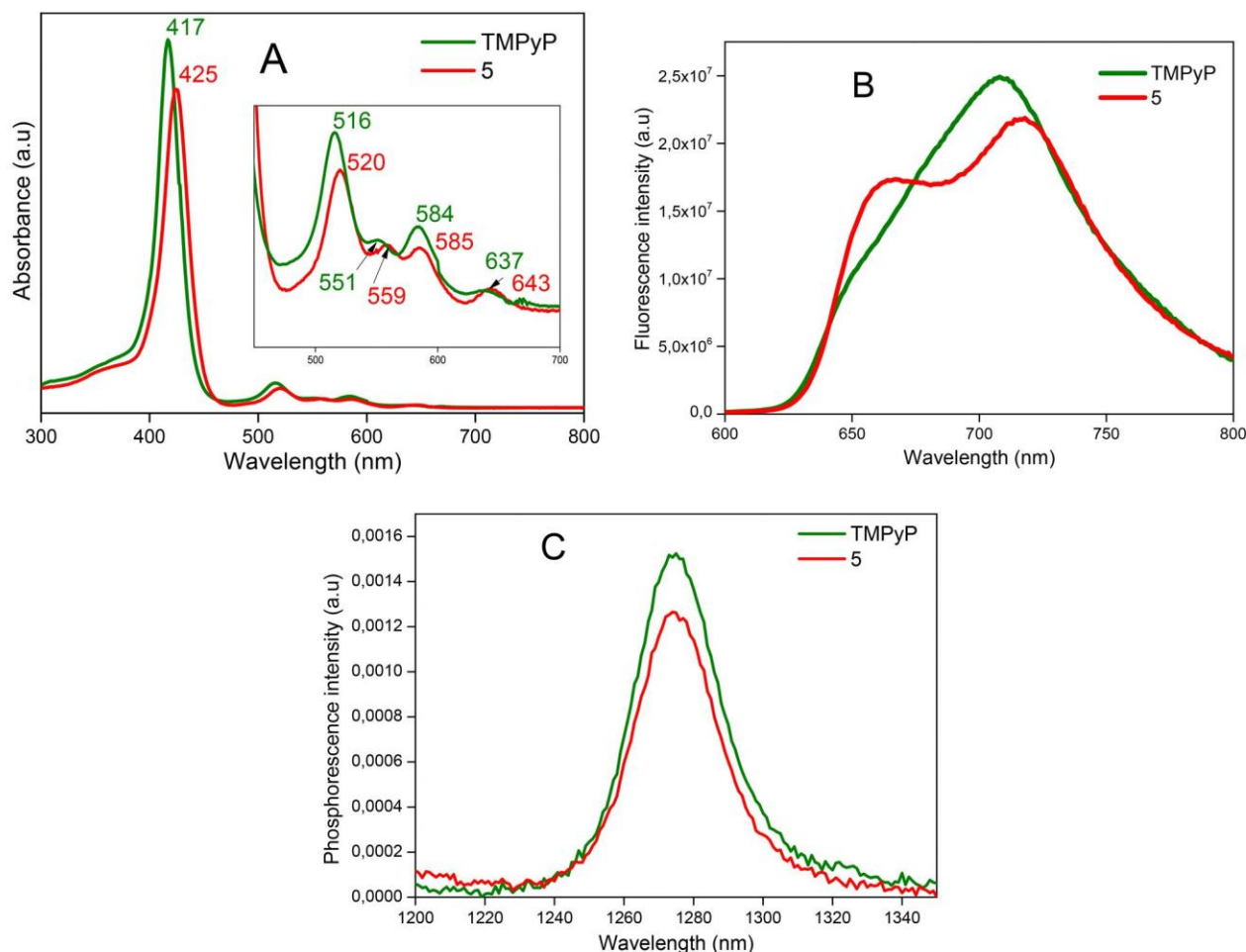


Figure 3. (A) Absorption ($[\text{TMPyP}] = 13.8 \mu\text{M}$, $[5] = 16.0 \mu\text{M}$), (B) fluorescence, and (C) phosphorescence spectra of **TMPyP** and **5** in D_2O ($\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$ and $A_{425} \approx 0.2$).

phosphate buffer solution at pH 6.5 was chosen because the usual optimal pH for such reaction lies between 6.5 and 7.5. Because their pK_a are higher than 7.5,²⁹ primary amines are not expected to react with maleimide. Furthermore, a pH 6.5 solution may also ensure a better stability of the polymyxin derivatives.^{46,47} As previously advised, using quality composites (as HPLC-grade) should also increase the yield of the final reaction, even if the outlined yield can already be considered as sufficient. The molecular weight and the isotopic profile of compound **5** retrieved from HRMS allowed the establishment of the chemical formula, which is consistent with the expected product (Figure S6). All of the products were individually characterized by means of ^1H NMR spectroscopic analyses in dimethyl sulfoxide ($\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz). In addition to satisfying results from MS analyses (ESI+), the ^1H NMR spectra of **2** and **3** are consistent with the literature (Figures S3 and S4, respectively). Using the data obtained with compound **3**, each peak from the ^1H NMR spectrum of **4** (Figure S5) has been assigned to the protons in the molecule (especially for those of the maleimide function at 7.05 ppm). ^1H NMR spectrum of conjugate **5** (Figure S7) is in accordance with the superposition of **1** and **4** spectra except for the peak assigned to the protons of the maleimide function, whose signals have been shifted due to the coupling reaction. Complementary analyses as ^1H correlation spectroscopy (COSY) and total correlation spectroscopy (TOCSY) allowed to check the chemiospecificity

of the coupling reaction (Figures S8 and S9). A first argument is based on the persistence of the peaks of the primary amine protons in spite of the coupling ($\sim 7.7 \text{ ppm}$), which indicates that these functional groups did not react with maleimide. A second confirmation was obtained through ^1H COSY and TOCSY spectra, allowing the retrieval of the peaks, as well as the J -couplings, due to the conjugated maleimide and cysteine residue. Thus, the structure of the final compound **5** was confirmed.

Photophysical Properties of the Conjugate. Compounds **2** to **5** show typical UV–vis absorption spectra that comprise a Soret band around 420 nm and four less-intense Q bands (Figure S10). To correlate the following biological assays, the photophysical properties of conjugate **5** had to be investigated through a comparison to another cationic porphyrin and further studies in aqueous solution. Unfortunately, the photophysical attributes of **3** could not be obtained because of the lone electron pair of nitrogen leading to a quenching of fluorescence and phosphorescence of the porphyrin core in pure solvents.⁴⁸ Thus, 5-10,15,20-tetrakis-(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin (**TMPyP**) was chosen as a standard because of its established properties.⁴⁹ For these analyses, deuterium oxide was used because the biological assays have been performed in aqueous solutions and because this solvent allows the establishment of singlet oxygen quantum yield by direct observation of phosphorescence at 1275 nm.⁵⁰

D

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$) are presented in Figure 3 (panels A, B, and C, respectively).

The absorption spectra of the two PS show a similar profile in spite of a weak redshift of all bands of **5**. Whereas **TMPPyP** presents a broadened fluorescence spectrum (well-known from the literature¹⁷), the coupling with the peptide leads to a partial recovery of the two usual bands observed for porphyrins (664 and 717 nm), probably due to its better solubility in comparison to **TMPPyP**. The fluorescence quantum yield and lifetime of both PS are relatively similar (Table 1). These

Table 1. Fluorescence and Phosphorescence Properties of Conjugate **TMPPyP and **5** in D_2O**

compound	λ_{Fmax} (nm)	φ_{F}^a	φ_{A}	τ_{F} (ns)	τ_{A} (μs) ^c
TMPPyP	708	0.06	0.90 ^b	6.1	69
5	717	0.07	0.79	5.2	65

^aTPP as standard ($\Phi_{\text{F}}(\text{toluene}) = 0.11$).⁴⁹ ^b**TMPPyP** as standard ($\Phi_{\text{A}}(\text{D}_2\text{O}) = 0.90$).⁴⁹ ^cLiterature value of $\sim 67 \mu\text{s}$ in D_2O .^{51,52} ($\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$).

molecules have been tested for their ability to produce singlet oxygen in D_2O . Based on the literature, the singlet oxygen quantum yield of **TMPPyP** ($\Phi_{\text{A}}(\text{D}_2\text{O}) = 0.90$) allowed us to estimate the conjugate's yield ($\Phi_{\text{A}} = 0.79$). Despite this slight discrepancy between the two PSs, the yields and the lifetimes are consistent with the literature.^{51,52} According to this photophysical characterization, a potentially enhanced photobactericidal activity brought by the peptide coupling could not be attributed to a stronger production of ROS.

Bacterial Photoinactivation. The photobactericidal activity of the final compound was established through biological assays against three bacterial strains (*S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*, Table 2). **3** and **TMPPyP** were chosen as PACT

Table 2. MBCs (μM) against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* under Two Different Conditions at 37°C ; 20 h of White-Light Irradiation ($4.83 \text{ mW}/\text{cm}^2$) and in the Dark^a

compounds	MBC (μM)					
	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	light	dark	light	dark	light	dark
PMBc	—	—	1.2	1.2	0.2	0.2
1	>50	>50	10.0	10.0	5.0	5.0
3	5.0	—	—	—	25.0	—
TMPPyP	5.0	—	20.0	—	18.0	—
5	0.8	—	2.5	10.0	0.5	1.2–5.0

^aUnder these conditions, these concentrations inhibited at least 99.99% of bacteria (compared to the untreated control). The highest concentration carried out was $50 \mu\text{M}$. The dashes correspond to a lack of activity below this concentration.

standards instead of **4** to avoid any interfering targeting of the maleimide function toward bacterial structures. In addition of these controls, commercial polymyxin B (**PMBc**) was included for comparison to the modified peptide **1**. For these assays, a light-emitting diode (LED) visible light has been used because it provides a mild irradiation, and no photobleaching was observed after $348 \text{ J}/\text{cm}^2$ (Figure S11).

The photobactericidal activity of the final compound **5** still had to be verified on Gram-positive strains. Even if cationic porphyrins, like **TMPPyP**, are well-known for inactivating such

strains after light irradiation, biological assays have to be performed to inspect the consequences of the peptide coupling. Because of its Gram-negative specificity, commercial polymyxin B (**PMBc**) was ineffective against *S. aureus*. However, the derivative **1** prompted a noticeable decrease of the cell counts about 3 log units at $50 \mu\text{M}$ with or without light irradiation (data not shown), indicating that its MBC is higher than $50 \mu\text{M}$. This bactericidal activity against *S. aureus* could be anticipated because the structure–activity relationship of polymyxin has revealed that reduction of number of cationic charges may provoke a decrease of efficiency against Gram-negative and an emerging activity against Gram-positive strains.²⁸ The conjugate **5** has shown a better efficacy ($0.8 \mu\text{M}$) against *S. aureus* than porphyrins alone ($5.0 \mu\text{M}$) after light irradiation. The enhanced activity of **5** should not be considered due the bactericidal ability of **1** because the conjugate compound was found to be inactive in the dark (even at $100 \mu\text{M}$). Indeed, this enhancement is probably related to the amount of positive charges (leading also to a better solubility) due to the protonated amines of the polymyxin moiety in this range of pH (7.3 ± 0.2). Because cationic PSs are known for having a good interaction with some constituents of the cell wall of Gram-positive bacteria (such as the highly negatively charged teichoic acids),¹⁸ this unexpected enhancement of bactericidal activity might be due to a close proximity between compound **5** and these cells.

The subsequent biological assays were performed against *P. aeruginosa*. Even if the bactericidal activity of **1** and **PMBc** was observed, the modification of the primary structure leads to a decrease of the efficiency. As expected, this slight decline of activity supported our strategy about the peptide modification. Despite the known insensitivity of this strain against PACT,⁵³ the inefficiency of **3** after light irradiation may be explained by the quenching due to the primary amine, which leads to a decrease in singlet oxygen production compared to the production obtained with **TMPPyP**. Because the results obtained with conjugate **5** and peptide **1** are similar in the dark, the antimicrobial activity of the polymyxin moiety is preserved despite the coupling with the porphyrin that, once more, brings support to our synthesis pathway. Finally, this preserved efficacy in the dark and the enhanced activity of **5** after irradiation seems to support our initial purpose, which was to target the membrane of Gram-negative bacteria to provide a stronger PACT effect. Moreover, the results obtained with *P. aeruginosa* were confirmed with *E. coli*, even if the determination of an accurate MBC could not been achieved with *E. coli* in contact with **5** in the dark. This issue may be explained by the result obtained after irradiation. Conjugate **5** has revealed a surprising efficacy after irradiation, which appeared as just as effective as it was against *S. aureus*. Because such efficiency against *E. coli* is not so frequent in PACT, an uncertainty remains about a potential activity induced by light pollution. Because of that, the common preparation of the assay, as well as the dilutions steps, may lead to a decrease in the bacterial concentration, then leading to fluctuations for the values in the dark. The large interval of MBC in the dark is still consistent with the remaining activity of the peptide, which has been already demonstrated with the assays against *P. aeruginosa*.

To observe the actual contribution of PACT, another set of experiments was realized (Figure 4). For these assays, a large amount of bacteria were harvested and directly put in contact of the compounds in PBS. Whereas *S. aureus* and *E. coli* can be directly recovered from the initial inoculum ($\sim 5 \times 10^9 \text{ CFU}$),

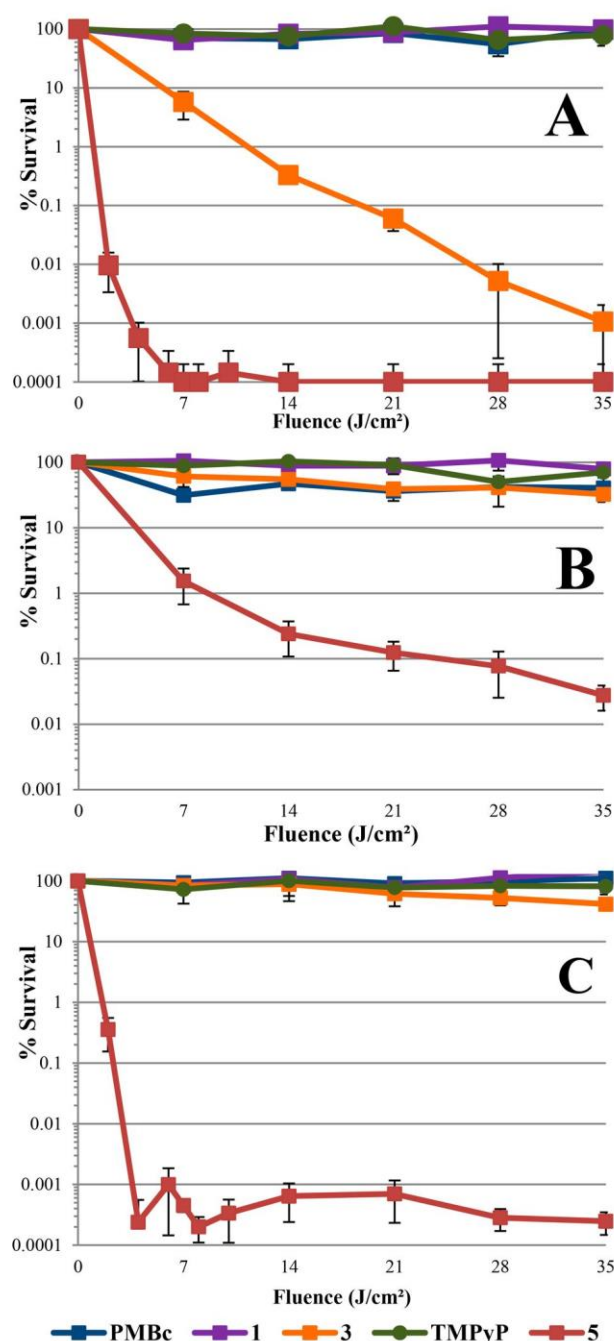


Figure 4. Photodynamic inactivation of (A) *S. aureus*, (B) *P. aeruginosa*, and (C) *E. coli*. After 30 min of incubation (37 °C) in the different solutions (10 μ M for *S. aureus* and *E. coli* and 1 μ M for *P. aeruginosa*). Bacteria were washed three times with PBS. Next, bacteria were irradiated by white LED (4.83 mW/cm²). The bacterial concentrations were determined following the fluence of light; the survival rate was then calculated according to the initial amount of bacteria.

the suspension of *P. aeruginosa* had to be at first diluted (2×10^8 CFU) to avoid an excess of extracellular matrix, which can hinder the experiments. After a short period of incubation in the different solutions, washed bacteria were irradiated by the same device used as before. The bacterial concentration and the survival rate were monitored following the increasing light dose.

For *S. aureus*, 3 seems to have a better activity than TMPyP. This result is probably due to a better affinity of 3 for this strain as a result of its primary amine function because this efficiency proves that the quenching of the porphyrin is no longer active and then that the amine is probably protonated when in contact with bacteria. As previously noted, the conjugate 5 showed the best activity against this strain because only 2 J/cm² was enough to induce a reduction of 3 log of the survival rate. These assays were particularly interesting against the Gram-negative strains. Indeed, in these conditions, 1 and PMBc did not induce any bactericidal effect; nor did 3 and TMPyP. Our conjugate 5 was still effective after a short dose of light. Whereas 21 J/cm² was necessary to perform a reduction of 3 log of the survival rate against *P. aeruginosa*, approximately 3 J/cm² was enough against *E. coli*. Even if a higher dose is required to photoinactivate *P. aeruginosa* as usual, these results are showing a strong PACT effect in spite of three washing steps, particularly against *E. coli*. Because this is quickly effective, the results from these assays would suggest that the different MBCs of 5 are probably not obtained following the same mechanism. While the MBCs in the dark are due to the activity of the peptide, the MBCs under a permanent light irradiation should be mainly due to PACT effect. Then, even if the MBCs slightly differ from the light and the dark condition, such low PACT-induced MBCs are very promising because this process has never shown any case of bacterial resistance. Moreover, even if the MBCs of this conjugate 5 are slightly higher than those of the commercial polymyxins, the PACT effect offers a wide spectrum activity and should limit the rise of resistant strains.

Bioanalytical Experiments. Flow cytometry experiments were performed to compare the interaction of the final conjugate 5 and the cationic porphyrins alone with bacteria. In spite of the fluorescence quenching of 3 in usual solvents, this molecule was chosen for the comparison to compound 5. The previously seen photobactericidal activity of 3 suggests that the quenching effect may disappear in contact with bacteria, especially with *S. aureus*. These analyses were also carried out using TMPyP (data not shown), and similar results were obtained, which is consistent with the literature.³⁶ Propidium iodide (PI) was added to keep track of the bacterial membrane permeability. To monitor the interaction strength between bacteria and PS, several washings were carried out after incubation with bacteria. Indeed, a persistent fluorescence after washings would highlight a strong interaction between bacteria and PS. Cytograms were divided in four different populations according to the fluorescence emitted by PI and PSs. The population Q1 refers to dead bacteria with permeable membrane (PI-positive). The population Q2 refers to double positive bacteria (PI-positive and PS-positive). The population Q3 (PI- and PS-negative) refers to live bacteria, and the last population Q4 (PI- negative and PS-positive) refers to live bacteria labeled with PS. Based on three independent experiments, the average population distribution was calculated for each experimental condition.

The experiments showed that *S. aureus* is weakly labeled by 3 ($Q2 + Q4 = 7.3\%$) (Figure 5), and this labeling decreased after washings. On the contrary, the incubation with conjugate 5 have led to a significant amount of labeled bacteria ($Q2 + Q4 = 37.6\%$). Even if this fluorescence seemed to decrease after washing steps, numerous bacteria were still carrying the PS after three washings ($Q2 + Q4 = 25.5\%$). Besides this remaining fluorescence, conjugate 5 did not seem to have any impact on

F

 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
 Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

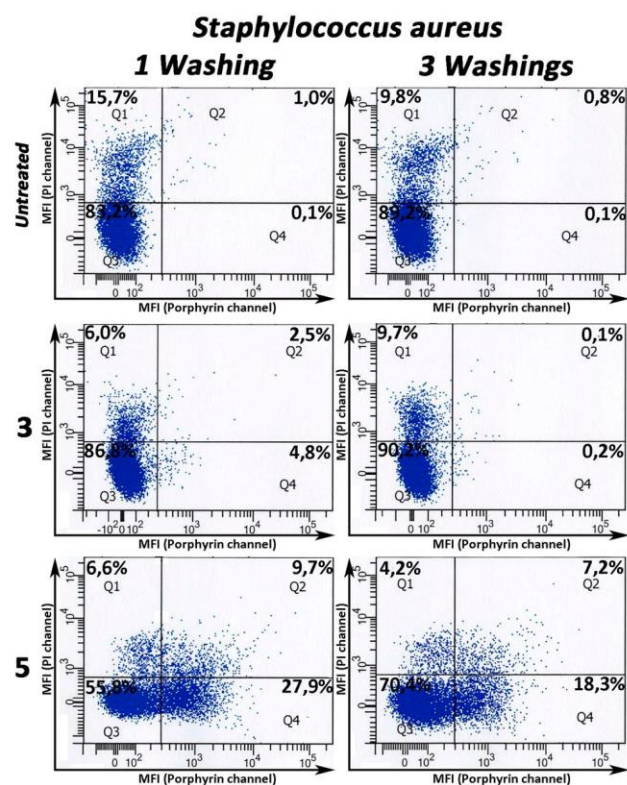


Figure 5. Flow cytometry analyses of *S. aureus* under different conditions: untreated, after incubation with 3, and after contact with 5. Bacteria were suspended in a solution containing compounds 3 or 5 (1 μ M) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C and then washed with saline. PI was added (10 μ L, 0.5 mg/mL) to detect and count the dead bacterial cells.

the integrity of the bacterial membrane because the repartition of the dying population is consistent with the control ($Q1 + Q2 = 16.3\%$). Thus, the results were in agreement with the photobactericidal assays because it appeared that 5 presented a stronger interaction with bacteria, and one can assume that ROS are produced very close to the bacterial cell. Retention of the bacterial viability and the decrease in fluorescence following the washing steps may support our previous hypothesis that the enhanced activity is due to the strong cationic character of compound 5.

Experiments on Gram-negative strains deserved a careful consideration due to the use of the polymyxin derivative (Figure 6). Whereas 3 does not associate properly with *E. coli* because only remnant fluorescence persists after the washing steps, 5 led to a major fluorescent population ($Q2 + Q4 = 54.8\%$), which remained virtually identical, even after three washing steps ($Q2 + Q4 = 53.6\%$). This strong interaction between the PS and *E. coli* is consistent with the amount of bacteria that possess a disturbed membrane. Indeed, whereas PI does not go through the membrane of untreated bacteria ($Q1 = 0.6\%$), the result obtained after an incubation with conjugate 5 led to a large amount of fluorescent and dying bacteria ($Q2 = 35.9\%$ and 39.7% , respectively). This difference between populations also confirmed the strong interaction between the conjugate and *E. coli* because the membrane weakening may be considered a proxy for the efficiency of the polymyxin moiety. Similar results were obtained with *P. aeruginosa*. In spite of a stronger penetration of PI ($Q1$ around 18% for untreated bacteria), the same interaction of 5 with the bacterial cells was

observed. Even if the MBC of conjugate 5 is higher for *P. aeruginosa* than for *E. coli*, the persistent bacterial membrane weakening and the strong interaction are more relevant against *P. aeruginosa* ($Q2 = 71.1\%$ and 64.3% after one and three washings, respectively). Thus, according to the chosen synthesis pathway, the constancy of the polymyxin activity led to a significant bacterial PI fluorescence and the weakening of the membrane through the interaction of the peptide moiety with lipid A.

Analyses by confocal microscopy were performed to visualize interactions between bacteria and the PSs (Figure 7). Whereas a remnant fluorescence was noticed after incubation with 3 (or TMPyP), the images obtained with 5 revealed a significant fluorescence of both strains, consistent with the flow cytometry results. In addition to its potential use in PACT, confocal imaging revealed that compound 5 could also be used as a Gram-negative bacteria probe.

Uptake Studies with Fibroblasts. Because fibroblasts play a key role during the wound-healing process, cytotoxicity assays were performed on normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells. The resulting IC_{50} (Table 3) have shown an improved cytotoxicity of the conjugate 5 against NHDF cells (0.156 μ M). This result was expected because peptidic compounds are more prone to undergo the endocytosis. Indeed, even if polymyxin has never been described as a cell-penetrating peptide, cationic and amphipathic peptides (such as TAT)⁵⁴ have better cellular penetration than the usual cationic porphyrins. However, the resulting IC_{50} is still sufficient for assays with NHDF, which are more sensitive than immortal cell lines.³⁶ Moreover, others assays with different conjugates, including a modification into the peptidic structure, did not seem to influence the actual IC_{50} of the molecule (data not shown). Such an observation indicates that there would not be a specific interaction between the polymyxin moiety and the fibroblasts.

Confocal imaging was performed to visualize the affinity of PSs for the NHDF cells. First, photosensitizer solutions were incubated with NHDF alone. In comparison with untreated cells, which have been used as standard for natural fluorescence, only residual fluorescence was observed (Figure S12). Thus, PSs 3, TMPyP, and 5 appear to not interact with these cells. *S. aureus* or *P. aeruginosa* were then mixed with NHDF and the studies repeated (Figure 8). The use of conjugate 5 has led to the noticeable labeling of the different bacteria, whereas NHDF remained nonfluorescent and treatment with 3 revealed a complete lack of fluorescence. This promising result was obtained with the two bacterial strains in spite of the invasive capacity of *S. aureus* when in close proximity to the NHDF plasma membrane. Hence, conjugate 5 has also revealed encouraging results. This study allowed us to reach a different standpoint. Whereas the cytotoxicity study on NHDF has shown an expected but disappointing result, the confocal imaging seems to indicate that the conjugate 5 labels strongly and selectively both bacterial strains. Because a close proximity with these compounds is necessary to induce the PACT effect, such an interaction would involve the photoinactivation of the bacteria right before any unwanted effect toward mammalian cells. Moreover, the previous assays have shown that the bacterial photoinactivation of a concentrated inoculum occurs quickly under a common white-light irradiation. Because the conjugate 5 selects bacteria over NHDF, a small amount of incoming light should provide an efficient photobactericidal effect, with minimized side effects in comparison to the use of other PS, which do not have advanced selectivity. Thus, further

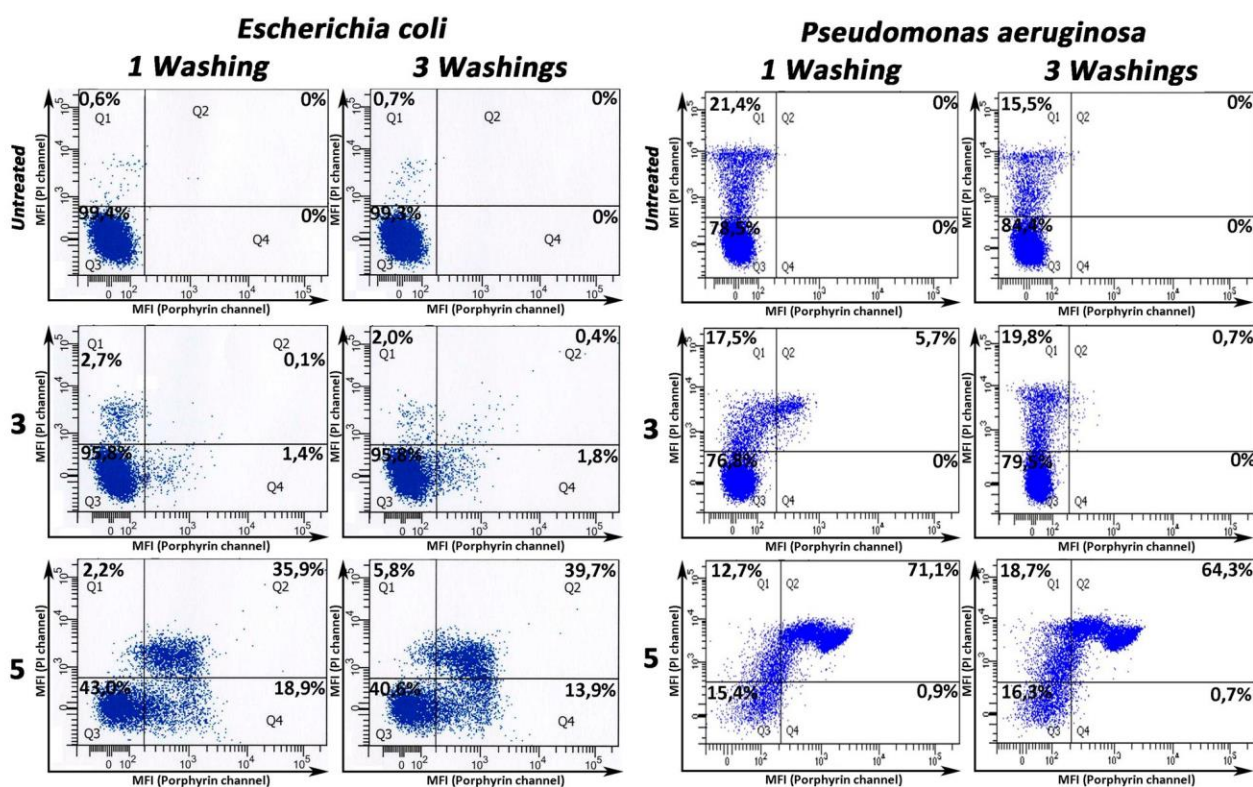


Figure 6. Flow cytometry analyses of *E. coli* and *P. aeruginosa* under different conditions: untreated, after incubation with 3 or 5. Bacteria were suspended in a solution of 3 or 5 ($1 \mu\text{M}$) for 30 min at 37°C and then washed with saline. PI was added ($10 \mu\text{L}$, 0.5 mg/mL) to detect and count the dead bacterial cells.

biological studies using epidermal in vitro models (such as Episkin) should and will be applied to estimate the real cytotoxicity on mammalian cells.

CONCLUSIONS

To improve PACT, previous studies have highlighted a promising strategy based on the addition of antimicrobial peptides to different PSs. In this work, the conjugation of a cationic porphyrin to a polymyxin derivative was carried out using a maleimide-click thiol coupling, leading to a novel conjugate, which has been characterized. Moreover, the addition of a polymyxin derivative to the cationic porphyrin leads to a significant photobactericidal efficiency. This conjugate has shown a very good efficiency because a small amount of light was enough to photoinactivate concentrated and wide-spectrum bacterial inoculums, even after three washing steps. Because the synthesis pathway was based on the structure–activity relationship of the peptide, the weakening of the outer-membrane of Gram-negative strains was conserved. Because of the remaining activity of the polymyxin moiety, this conjugate has shown a strong interaction with bacteria including, surprisingly, a Gram-positive strain. Compound 5 has shown a promising selective affinity for bacteria, contrary to fibroblasts. Even if the activity of the polymyxin moiety may give rise to superbugs (in particular, in the absence of light), photosensitizing conjugates offer less risks than the peptide by itself as the PACT effect has the ability to photoinactivate such strains. Thus, the use of such conjugate compounds, instead of the peptide alone, may present many advantages such as limiting the rise of resistant strains.

EXPERIMENTAL SECTION

General Methods. All organic materials and microbial nutrients were purchased from commercial suppliers (Acros Organics, Alfa Aesar, Grosseron, Sigma-Aldrich, TCI). All amino acids and the 2-chlorotriethyl resin were obtained from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). Commercial Polymyxin B sulfate (PMBc) was provided by TCI. Solvents used for the UV–vis and fluorescence measurements were of spectroscopic grade and were stored in a dark place. Column chromatography was carried out with silica gel (60 ACC, 15–40 μm , Merck). 5-10,15,20-Tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin (TMPyP) was provided by PorphyrChem (Dijon, France). Reverse-phase chromatography was performed on RediSepRf C18 column (43g), mounted on an Interchim puriFlash 430 apparatus, with acetonitrile (HPLC grade +0.1% TFA) and distilled water (+0.1% TFA) as eluents. Continuous monitoring of effluent absorbance allowed the detection of the peptide ($\lambda = 214 \text{ nm}$) or the porphyrin–polymyxin conjugate ($\lambda = 418 \text{ nm}$). ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (^1H NMR and ^{13}C NMR) spectra were recorded in deuterated solvents with Bruker DPX 400 and 500 spectrometers. Chemical shifts are reported as δ (parts per million), downfield from internal TMS. Multiplicities are reported as follows: s, singlet; d, doublet; m, multiplet. Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a Sciex 4000 Q-TRAP, monitored by Sciex Analyst 1.6.2. For all peptidic compounds, high-resolution electrospray ionization mass spectra (HR ESI-MS) were performed on a Bruker maXis mass spectrometer by the ICOA/CBM (FR2708) platform (Orléans, France).

H

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

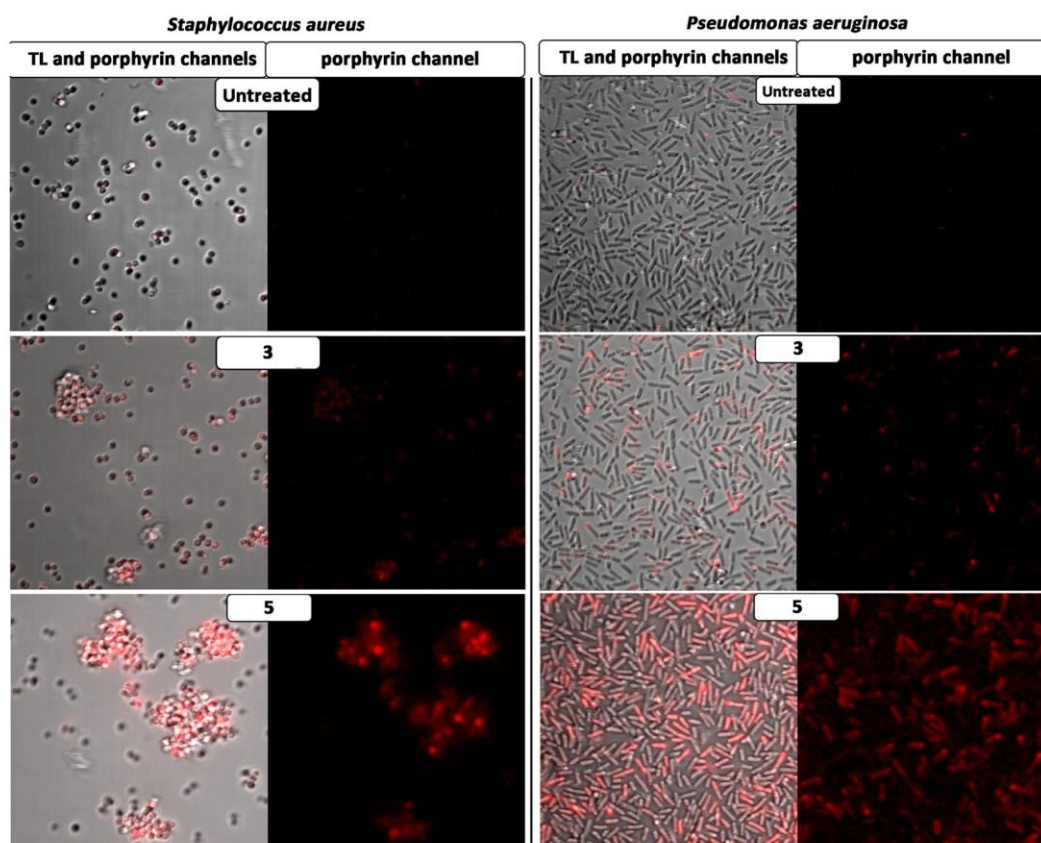


Figure 7. Confocal laser scanning microscopy imaging of (left) *S. aureus* and (right) *P. aeruginosa* in different conditions: untreated and after incubation with **3** or **5**. Bacteria were suspended in a solution of **3** or **5** (1 μM) for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ and then washed three times with saline.

Table 3. IC_{50} (μM) of the Different Molecules after Light Irradiation (White LED, 35 J/cm^2) and in the Dark^a

IC_{50} (μM)	NHDF	
	light	dark
PMBc	—	—
1	—	—
3	1.875	—
TMPyP	>5.0	—
5	0.156	—

^a3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay protocol was performed to determinate these concentrations.

Chemical Synthesis. Synthesis of the PMB Derivative (**1**).

The synthesis of polymyxins has already been described by Xu and co-workers.⁴³ The protocol was modified by replacing the last Fmoc-Dab(Boc)-OH by Fmoc-Cys(Mmt)-OH during the sequential coupling. An improvement has been brought to the Dde group removal. Hydroxylamine hydrochloride (1.25 g, 18.0 mmol) and imidazole (0.918 g, 13.5 mmol) were dissolved into *N*-methyl-2-pyrrolidone (5 mL). The addition of DCM (1 mL) to this solution resulted in Dde removal from the suspended peptide after 3 h at room temperature. After the final cleavage with TFA/ H_2O /TIPS (95:2.5:2.5, v/v/v), the crude mixture was directly freeze-dried and then purified by reverse-phase chromatography. Compound **1** was obtained as a white powder, following the freeze-drying of the peptide-containing fractions. MS (ESI-positive mode): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{93}\text{N}_{15}\text{O}_{13}\text{S}$, 596.84; found, 596.66.

Synthesis of 5-(4-Acetamidophenyl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrin (2**).** Freshly distilled pyrrole (6.66 mL, 96.0 mmol, 4 equiv) was added drop-wise to a refluxed solution (140 $^{\circ}\text{C}$) of 4-pyridylcarboxaldehyde (6.79 mL, 72.0 mmol, 3 equiv) and 4-acetamidobenzaldehyde (3.923g, 24.0 mmol, 1 equiv) dissolved in propionic acid (100 mL). The mixture was stirred under reflux for 3 h. After the removal of propionic acid in vacuo, the crude solid was dissolved in CHCl_3 filtered through a small pad of silica gel and washed with $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (90:10, v/v). After the removal of the solvent under vacuum, porphyrins were purified by silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 98:2, v/v), and compound **2** was obtained as a light purple powder with 2% yield. TLC ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 90:10, v/v): $R_f = 0.54$. UV-visible (MeOH), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ ($\epsilon \log \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 415 (5.33), 512 (3.95), 547 (3.52), 588 (3.44), 644 (3.13). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 9.04 (m, 6H, Ho-py), 8.80 (m, 8H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrrolic}}$), 8.17 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ho-phe_{acetamido}), 8.15 (m, 6H, Hm-py), 7.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Hm-phe_{acetamido}), 2.38 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), -2.90 (s, 2H, NH_{int}) ppm. MS (ESI+): $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{26}\text{N}_8$, 225.75; found, 225.83.

Synthesis of 5-(4-Aminophenyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridinium)porphyrin triiodide (3**).** An excess of iodomethane (0.83 mL, 13.3 mmol, 45 equiv) was added to a solution of **2** (200 mg, 0.30 mmol, 1 equiv) in anhydrous DMF (50 mL) under argon atmosphere. The mixture was stirred for 3 h at 140 $^{\circ}\text{C}$. DMF and excess iodomethane were removed with a rotary vane pump under heating (70 $^{\circ}\text{C}$) to obtain the *N*-methylporphyrin derivative in quantitative yield as a light purple-brown powder without further purification. Next,

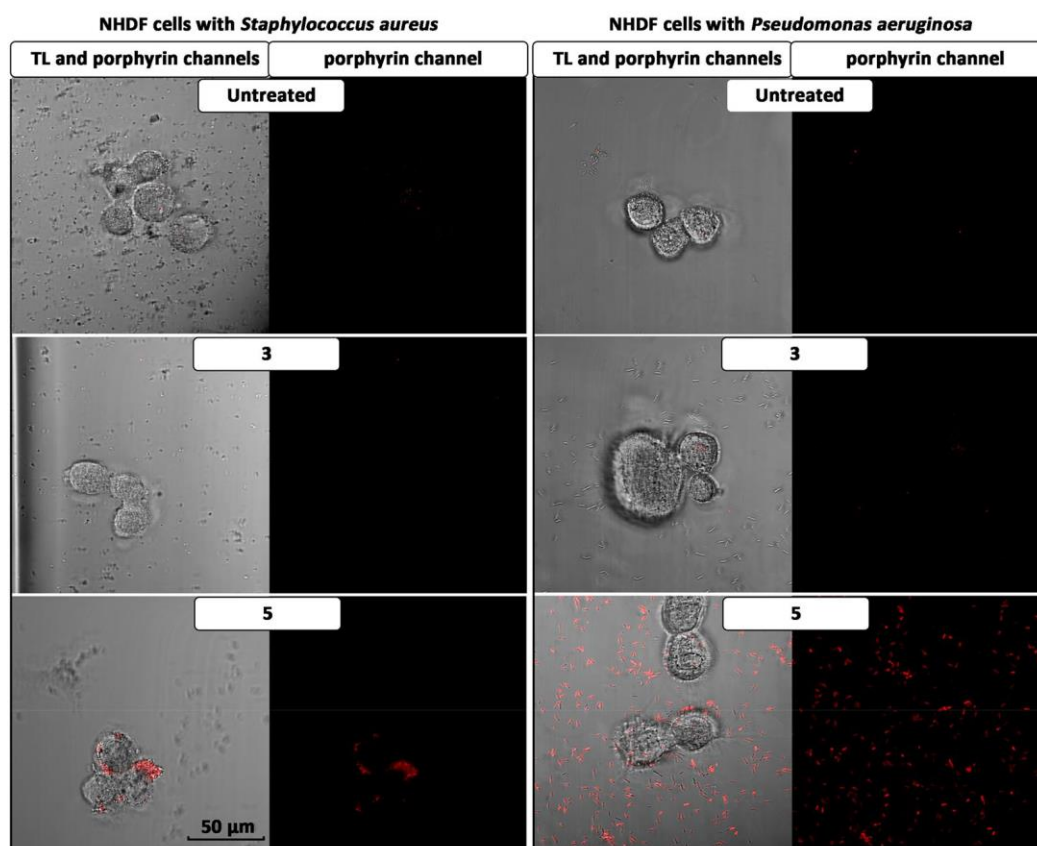


Figure 8. Confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF and bacteria in different conditions: untreated and after incubation with 3 or 5. Cells were suspended in a solution of 3 or 5 (1 μ M) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C and then washed 3 times with PBS.

the powder was dissolved in a solution of $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (75:25, v/v) and stirred under reflux for 5 h. The aqueous solution was removed, and compound 3 was freeze-dried to obtain a purple-brown powder with a quantitative yield. UV–visible (MeOH), λ_{max} (nm) (ϵ log L·mol $^{-1}$ ·cm $^{-1}$): 428 (5.05), 521 (4.05), 564 (3.88), 593 (3.84), 656 (3.47). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6 , δ , ppm): 9.49 (d, J = 6.5 Hz, 6H, Ho-py), 9.11–8.80 (m, 8H, Hpyr), 9.00 (d, J = 6.5 Hz, 6H, Hm-py), 7.94 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ho-phe), 7.15 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Hm-phe), 4.73 (s, 9H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$), –2.96 (s, 2H, NH_{int}) ppm. MS (ESI+): $[\text{M}]^{3+}$ calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{37}\text{I}_3\text{N}_8$, 225.77; found, 225.74.

Synthesis of 5-(4-(Maleimido-hexanoamidophenyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridinium)porphyrin triiodide (4). A solution of 3 (373.3 mg, 0.353 mmol, 1 equiv), 6-maleimido-hexanoic acid (223.7 mg, 1.059 mmol, 3 equiv), HCTU (404.3 mg, 0.977 mmol, 2.8 equiv) and DIEA (0.150 mL, 0.880 mmol, 2.5 equiv) dissolved in DMF (45 mL) was gently stirred overnight at room temperature. After the evaporation of the solvent, the crude was directly purified by reverse-phase chromatography. Compound 4 was recovered as a brown powder after freeze-drying, with a yield around 30% (132.5 mg, 0.106 mmol). UV–visible (MeOH), λ_{max} (nm) (ϵ log L·mol $^{-1}$ ·cm $^{-1}$): 428 (5.26), 519 (4.06), 556 (3.78), 593 (3.65), 650 (3.28). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6 , δ): 10.42 (s, 1H, NH_{amide}), 9.49 (d, J = 6.5 Hz, Ho-py), 9.10 (m, 8H, Hpyr), 9.00 (d, J = 6.5 Hz, 6H, Hm-py), 8.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ho-phe), 8.11 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Hm-phe), 7.05 (s, 2H, $\text{CH}_{\text{maleimide}}$), 4.72 (s, 9H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$), 3.48 (t, J = 7.0 Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}$), 2.50–1.40 (m, 8H, $-\text{CH}_2\text{-}$), –2.97 (s, 2H, NH)

ppm. MS (ESI+): $[\text{M} + \text{H}]^{3+}$ calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{48}\text{I}_3\text{N}_9\text{O}_3$, 290.46; found, 290.53.

Synthesis of the Final Conjugate Porphyrin–PMB (5). Compounds 4 (41.6 mg, 33.2 μ mol, 1 equiv) and 1 (39.6 mg, 33.2 μ mol, 1 equiv) were dissolved in a phosphate buffer solution (0.5 M) at pH 6.5. The mixture was gently stirred overnight at room temperature. The crude was directly purified by reverse-phase chromatography. The final product 5 was obtained as a freeze-dried brown powder with 72% yield (58.3 mg, 23.8 μ mol). UV–visible (MeOH), λ_{max} (nm) (ϵ log L·mol $^{-1}$ ·cm $^{-1}$): 427 (5.33), 519 (4.24), 556 (3.95), 594 (3.83), 650 (3.45). HRMS (ESI+): $[\text{M}]^{3+}$ calcd for $\text{C}_{108}\text{H}_{141}\text{I}_3\text{N}_{24}\text{O}_{16}\text{S}$, 687.3554; found, 687.3569.

Spectroscopic Measurements. Absorption spectra were recorded on a UV-3600 UV–visible double beam spectrophotometer (Shimadzu, Marne La Vallée, France). Fluorescence spectra were recorded on a Fluorolog FL3–222 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a 450 W xenon lamp, a thermostated cell compartment (25 $^{\circ}$ C), a UV–visible R928 photomultiplier (Hamamatsu Japon), and an InGaAs infrared detector (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc., Phoenixville, PA). The excitation beam was diffracted by a double-ruled grating SPEX monochromator (1200 grooves/mm blazed at 330 nm). The emission beam was diffracted by a double ruled grating SPEX monochromator (1200 grooves per millimeter blazed at 500 nm). Singlet oxygen emission was detected through a double ruled grating SPEX monochromator (600 grooves per millimeter blazed at 1 μ m) and a long-wave pass (780 nm). All spectra were recorded from solutions introduced in four-

face quartz cuvettes. All of the emission spectra (fluorescence and singlet oxygen luminescence) have been displayed with the same absorbance (less than 0.2) with lamp and photomultiplier correction. Fluorescence quantum yields (Φ_F) were determined using a tetraphenyl porphyrin (TPP) solution in toluene as the fluorescence standard ($\Phi_F = 0.11$). Quantum yield of $^1\text{O}_2$ production was determined by direct analysis of the $^1\text{O}_2$ near-infrared luminescence at 1270 nm. **TMPyP** was chosen as the reference solution due to its high $^1\text{O}_2$ quantum yield in D_2O ($\Phi_\Delta = 0.90$). Time-resolved experiments were performed using for excitation a pulsed laser diode emitting at 407 nm (LDH-P-C-400M, fwhm <70 ps, 1 MHz) coupled with a PDL 800-D driver (both from PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) and, for detection, an avalanche photodiode SPCM-AQR-15 (EG & G, Vaudreuil, Canada) coupled with a 550 nm long-wave pass filter as detection system. Acquisition was performed by a PicoHarp 300 module with a PHR-800 4 channel router (both PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Fluorescence decays were recorded using the single photon counting method. Data were collected up to 1000 counts accumulated in the maximum channel and analyzed using Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) software (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) based on iterative reconvolution using a Levensberg-Marquand algorithm, enabling the obtention of multi-exponential profiles (mainly one or two exponentials in our cases). Singlet oxygen lifetime measurements have been performed on a TEMPRO-01 spectrophotometer (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) composed of a SpectraLED-415 pulsed diode excitation source emitting at 415 nm, a cell compartment, a Seya-Namioka type emission monochromator (600–2000 nm), and a H10330-45 near-infrared photomultiplier tube with thermoelectric cooler (Hamamatsu, Japan) as a detection system. The system was monitored by a FluoroHub-B single photon counting controller and the DataStation and DAS6 softwares (Horiba Jobin Yvon). Emission spectra were performed on a Fluorolog FL3–22 spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a 450 W xenon lamp, a xenon flash lamp, a thermostated cell compartment (25 °C), and a R928 UV-visible photomultiplier (Hamamatsu Japan). The system was monitored by a FluoroHub-B single photon counting controller. The FluorEssence software (Horiba Jobin Yvon) was used for recording the emission spectra; the DataStation and DAS6 softwares (Horiba Jobin Yvon) were used for phosphorescence lifetime measurements.

Bacterial Cultures. Gram-positive (*S. aureus* CIP76.25) and Gram-negative (*P. aeruginosa* CIP76110 and *E. coli* CIP54.8T) bacterial strains were obtained from Institut Pasteur (Paris, France). These strains were cultured in liquid tryptic soy (pancreatic casein extract, 17 g/L; soy flour papaic digest, 3 g/L; dextrose, 2.5 g/L; NaCl, 5 g/L; and K_2HPO_4 , 2.5 g/L) and incubated overnight at 37 °C under aerobic conditions. Square plates were kept warm inside a SR1000 Thermosi incubator. Antimicrobial experiments used a Heidolph Unkubator 1000 equipped with an Unimax 1010 orbital platform shaker. An Isotech Lightmeter 1335 light meter was used to measure the effective irradiation power.

Bacteria Photoinactivation. Fresh solutions of porphyrin 3 and **TMPyP** in DMSO were mixed with tryptic soy culture medium. DMSO concentration never exceeded 1% (v/v). Furthermore, **1**, **5**, and **PMBC** were directly dissolved into the culture media. From these mixtures, 1 mL of serial dilutions (50 μM down to 78 nM) were transferred into two 24-well plates

(BD Falcon). A total of 1 mL of a culture at a concentration of 2×10^5 UFC/mL was deposited in each well. The 24-well plates were irradiated with LED visible light. The fluence rate (4.83 mW/cm²) was measured with a light meter. Plates were incubated under gentle shaking (200 rpm) at 37 °C for 20 h (totaling 348 J/cm² fluence). Controls consisting of 24-well plates were prepared in the same conditions but kept in the dark. A total of six independent experiments were performed with each strain. Bacterial count was performed after a 10-fold serial dilution of each well. Each dilution was spread on tryptic soy agar plates using an automatic plater (easySPIRAL, Interscience). After incubation at 37 °C for 24 h, colonies were counted to determine total colony-forming units (CFU) per milliliter (CFU/mL). The minimum bactericidal concentration (MBC) corresponds to the concentration of the active compound for which 99.99% of the bacteria have been killed (i.e., 4 log reduction compared to the untreated control).

Another protocol was also used to observe the actual contribution of PACT without any antibacterial activity from the peptides. For *S. aureus* and *E. coli*, 5×10^9 CFU were harvested by centrifugation (10 000 rpm for 3 min) and washed once with PBS (1×, without Ca^{2+} and Mg^{2+}). For *P. aeruginosa*, only 2×10^8 CFU were treated to avoid an excessive presence of extracellular matrix. The bacterial concentration was estimated by reading the turbidity at 600 nm in a JENWAY 6320D spectrophotometer. Bacteria were put in contact with 1 mL of each compound (10 μM in PBS for *S. aureus* and *E. coli* and 1 μM for *P. aeruginosa*) for 30 min at 37 °C in the dark. Then, bacteria were retrieved by centrifugation and washed three times with PBS. Bacterial suspensions were transferred into a 96-well plate. The plate was irradiated at 37 °C with the same visible light as before (4.83 mW/cm²). The bacterial concentration was frequently determined using the protocol described above. Finally, the survival rate was calculated by comparing the bacterial concentration after irradiation with the initial concentration. A total of four independent experiments were performed with each strain.

Flow Cytometry. For each bacterial strain, 10^8 CFU were put in contact with 1 mL of each PS (1 μM in PBS) for 30 min at 37 °C in the dark. Then, bacteria were retrieved by centrifugation, and washed with sterile saline. Bacteria were resuspended in 500 μL of 1× PBS after one or three successive washing steps. Before analysis by flow cytometry, 10 μL of propidium iodide (PI, 0.5 mg/mL) were added to the bacterial suspension. Fluorescence emissions were analyzed with a BD FACSAria III cell sorter (BD Biosciences, France). Bacterial cells were excited by two lasers. PS were excited with a 407 nm violet laser and the fluorescence emitted was detected with a BV711 (710/50 nm) filter. PI was excited with a 561 nm yellow-green laser and the fluorescence emitted was detected with a BV605 (610/20 nm) filter. For *S. aureus* and *E. coli*, 10 000 events were counted, whereas 50 000 events were counted for *P. aeruginosa*.

Confocal Microscopy. For confocal microscopy analysis, the different bacterial suspensions were transferred into NUNC Lab-Tek II chamber coverglass (Corning). A UV diode (405 nm) was used to excite the PS. Emitted fluorescence was monitored between 595 and 750 nm. Fluorescence was analyzed with a LSM880 laser scanning confocal microscope (Zeiss, Germany). Image acquisition and analysis were realized with a Zeiss ZEN Lite software. Images were obtained with a 100× objective lens.

K

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Fibroblasts. The human normal fibroblast cell line NHDF derived from human normal derma (Lonza) was cultured in fibroblast basal medium (FBM) supplemented with a fibroblast growth medium-2 (FGM-2) Bullet kit (Lonza) containing 2% fetal bovine serum, 0.1% insulin, 0.1% gentamicin, amphotericin GA 1000, and 0.1% fibroblast growth factor. NHDF cells were cultured at 37 °C in 95% humidified air in the presence of 5% CO₂.

Photosensitization of Fibroblasts. Cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method. A total of 48 h prior to experiments, 100 microliters per well of cell suspension at 0.5×10^5 cells per milliliter were cultured in 96-well microplates in complete FGM culture medium (Lonza). Culture medium was removed, and cells were incubated in the dark with different concentrations of PS, ranging from 5 to 5000 nM (in PBS 1×). After 2 h of incubation at 37 °C in the dark, cells were washed three times with PBS, and then 100 μL of fresh FGM culture medium was added in each well. One plate was exposed to a white light irradiation (4.83 mW/cm²) for 2 h (35 J/cm²) at 37 °C and then was placed at 37 °C in the dark. Another plate was kept in the dark at 37 °C without irradiation (dark condition). After 24 h at 37 °C, the MTT was added at a final concentration of 0.5 mg/mL in each well, and cells were incubated at 37 °C for 2 h. Then, the culture medium was harvested and replaced by 100 μL of DMSO in each well to dissolve formazan crystals. The absorbance was measured at 595 nm using a Bio-Rad iMark microplate reader.

Bacterial Imaging over NHDF Cells. NHDF cells (5000 cells) were seeded in a 8-well Lab-Tek II chamber coverglass (NUNC) in complete FBM culture medium for 48 h at 37 °C. 10^7 CFU were prepared and washed three times with PBS. A total of 5×10^6 CFU were directly added to each well. After 30 min of incubation at 37 °C, the supernatant was removed, and the wells were washed once with PBS. Then, 500 μL of PS solutions (1 μM in PBS) were deposited after 30 min at 37 °C in the dark, three washing steps were done, and then confocal microscopy imaging was carried out as described before with a 40× objective lens.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516.

Figures showing the synthetic route to **1**, NMR and MS analyses of all compounds, absorbance spectra in MeOH for all compounds, the results of a photobleaching study, and additional confocal microscopy imaging (NHDF alone or with bacteria). (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: tan-sothea.ouk@unilim.fr. Phone: +33(0)-5-5545-4402.

*E-mail: vincent.sol@unilim.fr. Phone: +33(0)-5-5545-7490. Fax: +33(0)-5-5545-7202.

ORCID

Vincent Sol: 0000-0003-0175-0156

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the “Conseil Régional du Limousin” for financial support. The authors are indebted to Dr. Michel Guilloton for help in manuscript editing and Claire Carrion, Emilie Pinault, Dr. Yves Champavier (BISCEm, University of Limoges), and Dr. Cyril Colas (ICOA, University of Orleans) for confocal microscopy imaging, ESI, NMR, and HRMS analysis, respectively.

■ ABBREVIATIONS

LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; MDR, multi-drug-resistant; MBC, minimal bactericidal concentration; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NHDF, normal human dermal fibroblast; ROS, reactive oxygen species; PACT, photodynamic antimicrobial chemotherapy; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; PMB, polymyxin B; PS, photosensitizer; TPP, *meso*-tetrakis(phenyl)porphyrin

■ REFERENCES

- (1) Bolognia, J. L., Jorizzo, J. L., and Schaffer, J. V. (2012) *Dermatology*, 3rd ed., Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.
- (2) James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. D., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., and Stewart, P. S. (2008) Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 16, 37–44.
- (3) Bjarnsholt, T. (2013) The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* 121, 1–58.
- (4) Bowler, P. G., Duerden, B. I., and Armstrong, D. G. (2001) Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 244–269.
- (5) Edwards-Jones, V., and Greenwood, J. E. (2003) What's new in burn microbiology? *Burns* 29, 15–24.
- (6) Davies, C. E., Hill, K. E., Wilson, M. J., Stephens, P., Hill, C. M., Harding, K. G., and Thomas, D. W. (2004) Use of 16S Ribosomal DNA PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis for Analysis of the Microfloras of Healing and Nonhealing Chronic Venous Leg Ulcers. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3549–3557.
- (7) Mihiu, M. R., and Martinez, L. R. (2011) Novel therapies for treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* skin infections. *Virulence* 2, 97–102.
- (8) Mottola, C., Mendes, J. J., Cristino, J. M., Cavaco-Silva, P., Tavares, L., and Oliveira, M. (2016) Polymicrobial biofilms by diabetic foot clinical isolates. *Folia Microbiol. (Dordrecht, Neth.)* 61, 35–43.
- (9) Vatansever, F., de Melo, W. C. M. A., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N. A., et al. (2013) Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 955–989.
- (10) Tavares, A., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, J. P. C., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â., Gomes, N. C. M., Alves, E., et al. (2010) Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar. Drugs* 8, 91–105.
- (11) Dysart, J. S., and Patterson, M. S. (2005) Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys. Med. Biol.* 50, 2597–2616.
- (12) Fu, X., Fang, Y., and Yao, M. (2013) Antimicrobial Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *BioMed Res. Int.* 2013, 1.
- (13) Henderson, B. W., and Dougherty, T. J. (1992) How Does Photodynamic Therapy Work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145–157.
- (14) Detty, M. R., Gibson, S. L., and Wagner, S. J. (2004) Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* 47, 3897–3915.

L

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

- (15) Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., and Peng, Q. (1998) Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889–905.
- (16) Minnock, A., Vernon, D. I., Schofield, J., Griffiths, J., Parish, J. H., and Brown, S. B. (2000) Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 522–527.
- (17) Reddi, E., Ceccon, M., Valduga, G., Jori, G., Bommer, J. C., Elisei, F., Latterini, L., and Mazzucato, U. (2002) Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 75, 462–470.
- (18) Alves, E., Costa, L., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., and Almeida, A. (2009) Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* 9, 70.
- (19) Hamblin, M. R., and Dai, T. (2010) Can surgical site infections be treated by photodynamic therapy? *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 7, 134.
- (20) Saino, E., Sbarra, M. S., Arciola, C. R., Scavone, M., Bloise, N., Nikolov, P., Ricchelli, F., and Visai, L. (2010) Photodynamic action of Tri-meso (N-methyl-pyridyl), meso (N-tetradecyl-pyridyl) porphine on *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown on Ti6Al4V alloy. *Int. J. Artif. Organs* 33, 636–645.
- (21) Schastak, S., Ziganshyna, S., Gitter, B., Wiedemann, P., and Claudepierre, T. (2010) Efficient Photodynamic Therapy against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using THPTS, a Cationic Photosensitizer Excited by Infrared Wavelength. *PLoS One* 5, e11674.
- (22) Simonetti, O., Cirioni, O., Orlando, F., Alongi, C., Lucarini, G., Silvestri, C., Zizzi, A., Fantetti, L., Roncucci, G., Giacometti, A., et al. (2011) Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with a single treatment of RLP068/Cl in an experimental model of *Staphylococcus aureus* wound infection. *Br. J. Dermatol.* 164, 987–995.
- (23) Caruso, E., Banfi, S., Barbieri, P., Leva, B., and Orlandi, V. T. (2012) Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol., B* 114, 44–51.
- (24) Dosselli, R., Tampieri, C., Ruiz-González, R., De Munari, S., Ragàs, X., Sánchez-García, D., Agut, M., Nonell, S., Reddi, E., and Gobbo, M. (2013) Synthesis, Characterization, and Photoinduced Antibacterial Activity of Porphyrin-Type Photosensitizers Conjugated to the Antimicrobial Peptide Apidaecin 1b. *J. Med. Chem.* 56, 1052–1063.
- (25) Choi, S.-K., Park, S.-Y., Kim, R., Kim, S.-B., Lee, C.-H., Kim, J. F., and Park, S.-H. (2009) Identification of a Polymyxin Synthetase Gene Cluster of *Paenibacillus polymyxa* and Heterologous Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191, 3350–3358.
- (26) Kadar, B., Kocsis, B., Nagy, K., and Szabo, D. (2013) The Renaissance of Polymyxins. *Curr. Med. Chem.* 20, 3759–3773.
- (27) Zavascki, A. P., Goldani, L. Z., Li, J., and Nation, R. L. (2007) Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1206–1215.
- (28) Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L., and Li, J. (2010) Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* 53, 1898–1916.
- (29) Velkov, T., Roberts, K. D., Thompson, P. E., and Li, J. (2016) Polymyxins: a new hope in combating Gram-negative superbugs? *Future Med. Chem.* 8, 1017–1025.
- (30) Dall, C. US first: *E. coli* resistant to both colistin, carbapenems. CIDRAP, August 30, 2016.
- (31) Yin, R., and Hamblin, M. (2015) Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr. Med. Chem.* 22, 2159–2185.
- (32) Hamblin, M. R., O'Donnell, D. A., Murthy, N., Rajagopalan, K., Michaud, N., Sherwood, M. E., and Hasan, T. (2002) Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 941–951.
- (33) Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Soncin, M., Magaraglia, M., Ferro, S., and Jori, G. (2004) Synthesis and Antibacterial Activity of New Poly-S-lysine–Porphyrin Conjugates. *J. Med. Chem.* 47, 6649–6652.
- (34) Sharma, M., Visai, L., Bragheri, F., Cristiani, I., Gupta, P. K., and Speziale, P. (2008) Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Effects on *Staphylococcal* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 299–305.
- (35) Nitzan, Y., Gutterman, M., Malik, Z., and Ehrenberg, B. (1992) Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 55, 89–96.
- (36) Dosselli, R., Ruiz-González, R., Moret, F., Agnoloni, V., Compagnin, C., Mognato, M., Sella, V., Agut, M., Nonell, S., Gobbo, M., et al. (2014) Synthesis, Spectroscopic, and Photophysical Characterization and Photosensitizing Activity toward Prokaryotic and Eukaryotic Cells of Porphyrin–Magainin and –Boforin Conjugates. *J. Med. Chem.* 57, 1403–1415.
- (37) Liu, F., Soh Yan Ni, A., Lim, Y., Mohanram, H., Bhattacharjya, S., and Xing, B. (2012) Lipopolysaccharide Neutralizing Peptide–Porphyrin Conjugates for Effective Photoinactivation and Intracellular Imaging of Gram-Negative Bacteria Strains. *Bioconjugate Chem.* 23, 1639–1647.
- (38) Deris, Z. Z., Swarbrick, J. D., Roberts, K. D., Azad, M. A. K., Akter, J., Horne, A. S., Nation, R. L., Rogers, K. L., Thompson, P. E., Velkov, T., et al. (2014) Probing the Penetration of Antimicrobial Polymyxin Lipopeptides into Gram-Negative Bacteria. *Bioconjugate Chem.* 25, 750–760.
- (39) Azad, M. A. K., Yun, B., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., Velkov, T., and Li, J. (2014) Measuring Polymyxin Uptake by Renal Tubular Cells: Is BODIPY–Polymyxin B an Appropriate Probe? *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6337–6338.
- (40) Kanazawa, K., Sato, Y., Ohki, K., Okimura, K., Uchida, Y., Shindo, M., and Sakura, N. (2009) Contribution of Each Amino Acid Residue in Polymyxin B3 to Antimicrobial and Lipopolysaccharide Binding Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 240–244.
- (41) Hermanson, G. T. (2013) The Reactions of Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed., pp 229–258, Academic Press, Boston, MA.
- (42) Hermanson, G. T. (2013) Functional Targets for Bioconjugation. In *Bioconjugate Techniques*, 3rd ed., pp 127–228, Academic Press, Boston, MA.
- (43) Xu, W.-L., Cui, A.-L., Hu, X.-X., You, X.-F., Li, Z.-R., and Zheng, J.-S. (2015) A new strategy for total solid-phase synthesis of polymyxins. *Tetrahedron Lett.* 56, 4796–4799.
- (44) Díaz-Mochón, J. J., Bialy, L., and Bradley, M. (2004) Full Orthogonality between Dde and Fmoc: The Direct Synthesis of PNA–Peptide Conjugates. *Org. Lett.* 6, 1127–1129.
- (45) Little, R. G., Anton, J. A., Loach, P. A., and Ibers, J. A. (1975) The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* 12, 343–349.
- (46) Saohin, W. (1997) Studies on the stability and activity of polymyxin B solutions. PhD thesis, Robert Gordon University, United Kingdom.
- (47) Taylor, R. B., Richards, R. M. E., Low, A. S., and Hardie, L. (1994) Chemical stability of polymyxin B in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 102, 201–206.
- (48) Lakowicz, J. R. (2007) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science & Business Media, Berlin, Germany.
- (49) Redmond, R. W., and Gamlin, J. N. (1999) A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem. Photobiol.* 70, 391–475.
- (50) Schweitzer, C., and Schmidt, R. (2003) Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* 103, 1685–1758.
- (51) Wilkinson, F., Helman, W. P., and Ross, A. B. (1995) Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 24, 663–1021.
- (52) Ogilby, P. R., and Foote, C. S. (1983) Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and

temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen (1.DELTA.g). *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3423–3430.

(53) Carpenter, B. L., Feese, E., Sadeghifar, H., Argyropoulos, D. S., and Ghiladi, R. A. (2012) Porphyrin-Cellulose Nanocrystals: A Photobactericidal Material that Exhibits Broad Spectrum Antimicrobial Activity. *Photochem. Photobiol.* 88, 527–536.

(54) Eriksson, O. S., Georg, M., Sjolinder, H., Sillard, R., Lindberg, S., Langel, U., and Jonsson, A.-B. (2013) Identification of Cell-Penetrating Peptides That Are Bactericidal to *Neisseria meningitidis* and Prevent Inflammatory Responses upon Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3704–3712.

I.3. Informations supplémentaires

I.3.1. Synthèse du peptide 1

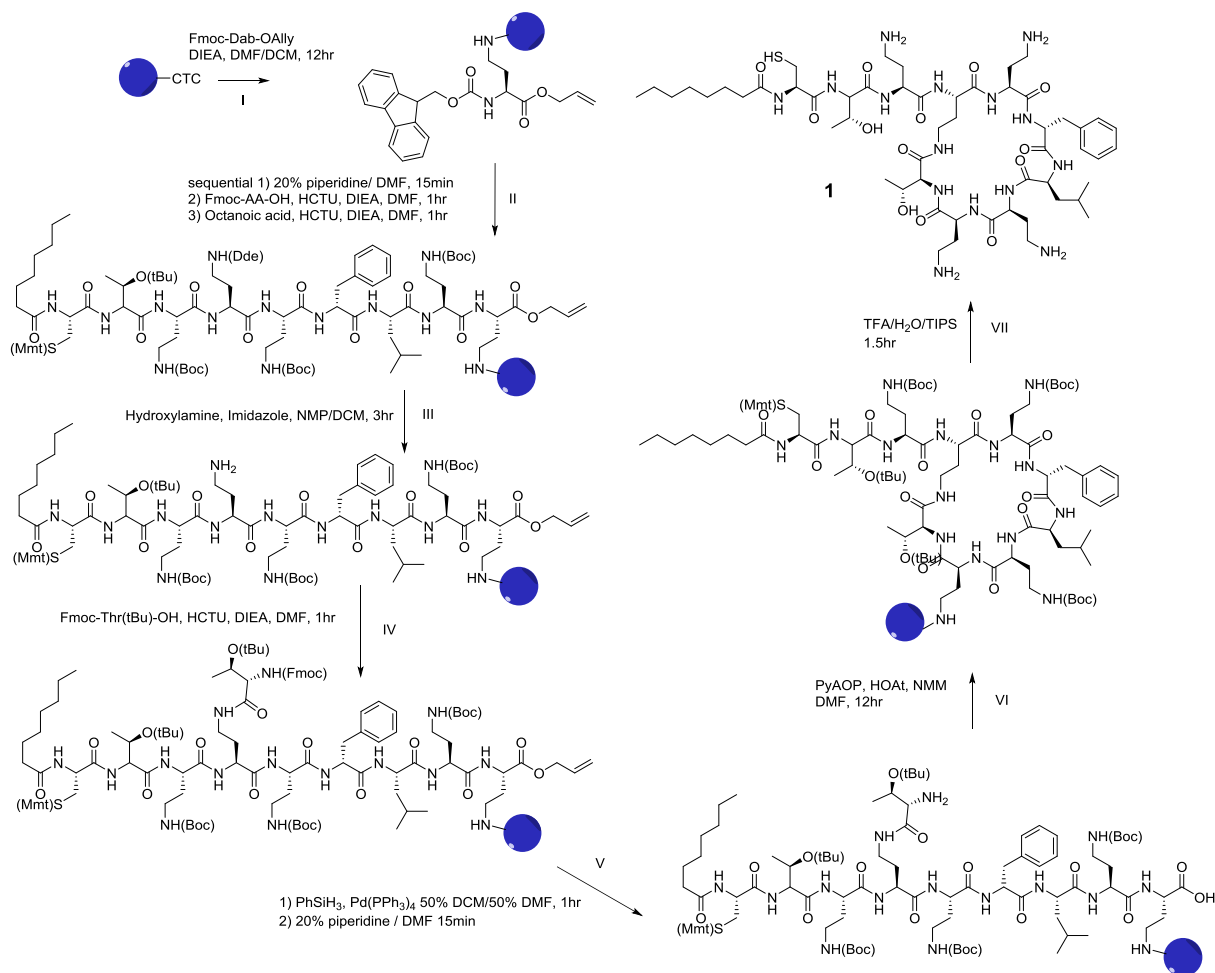
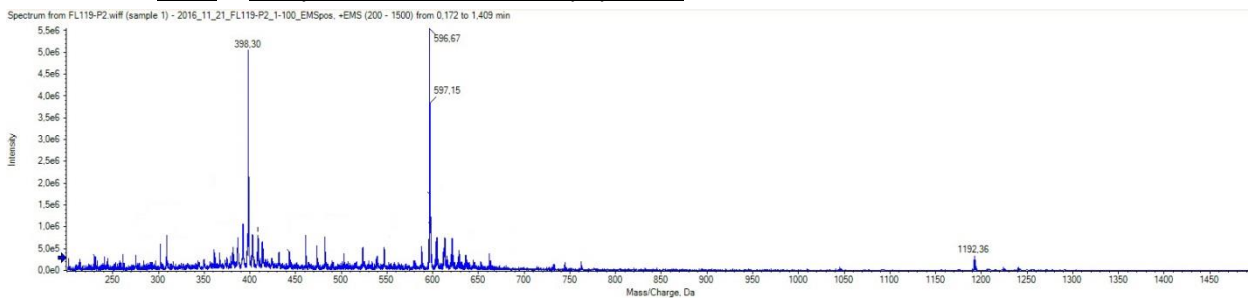


Figure 105 (S1). Synthetic route of 1.

1.3.2. Analyses ^1H RMN et MS du peptide **1**



FL119-P2 dans DMSO-d6 - Spectre RMN 1H - TE=320K
Service de RMN - Plateforme SCRABL - Université de Limoges

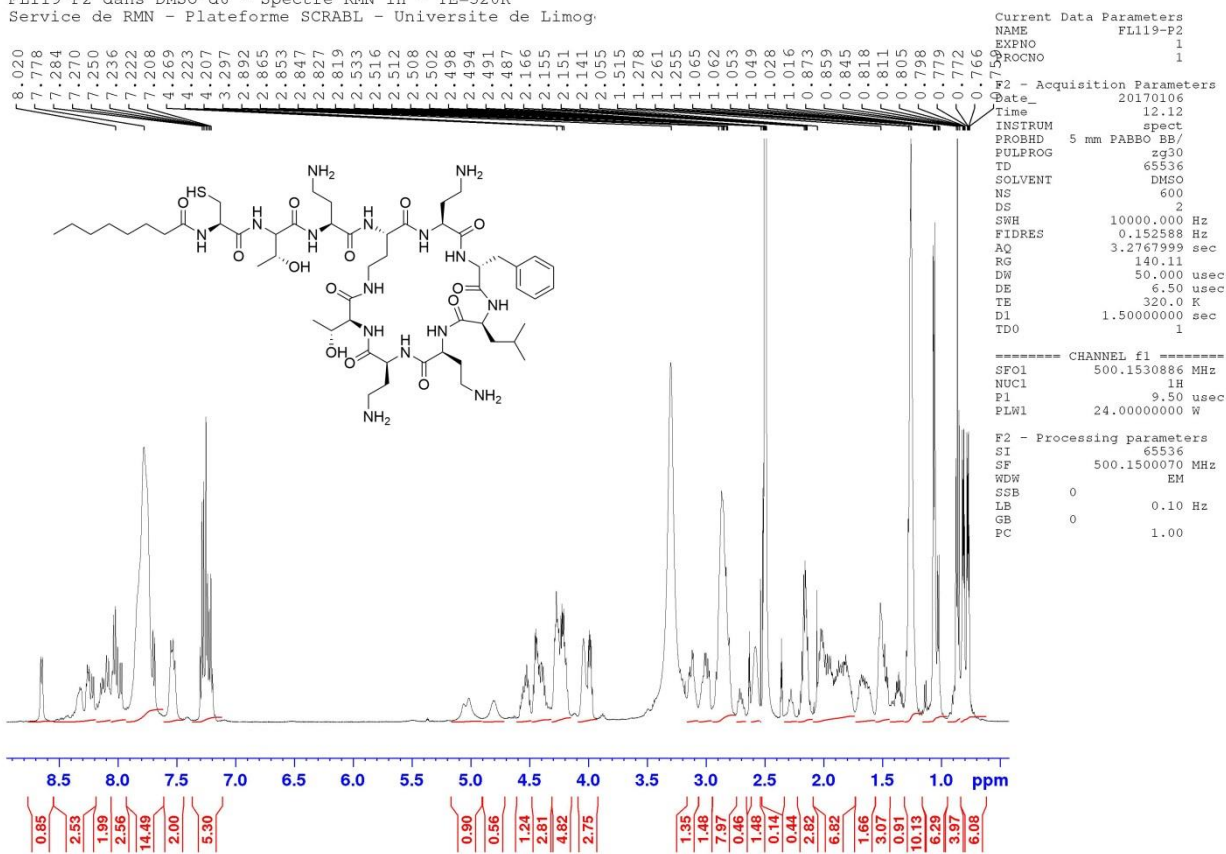


Figure 106 (S2). MS and ^1H NMR analysis of **1**.

1.3.3. Analyses ^1H RMN et MS de la porphyrine 2

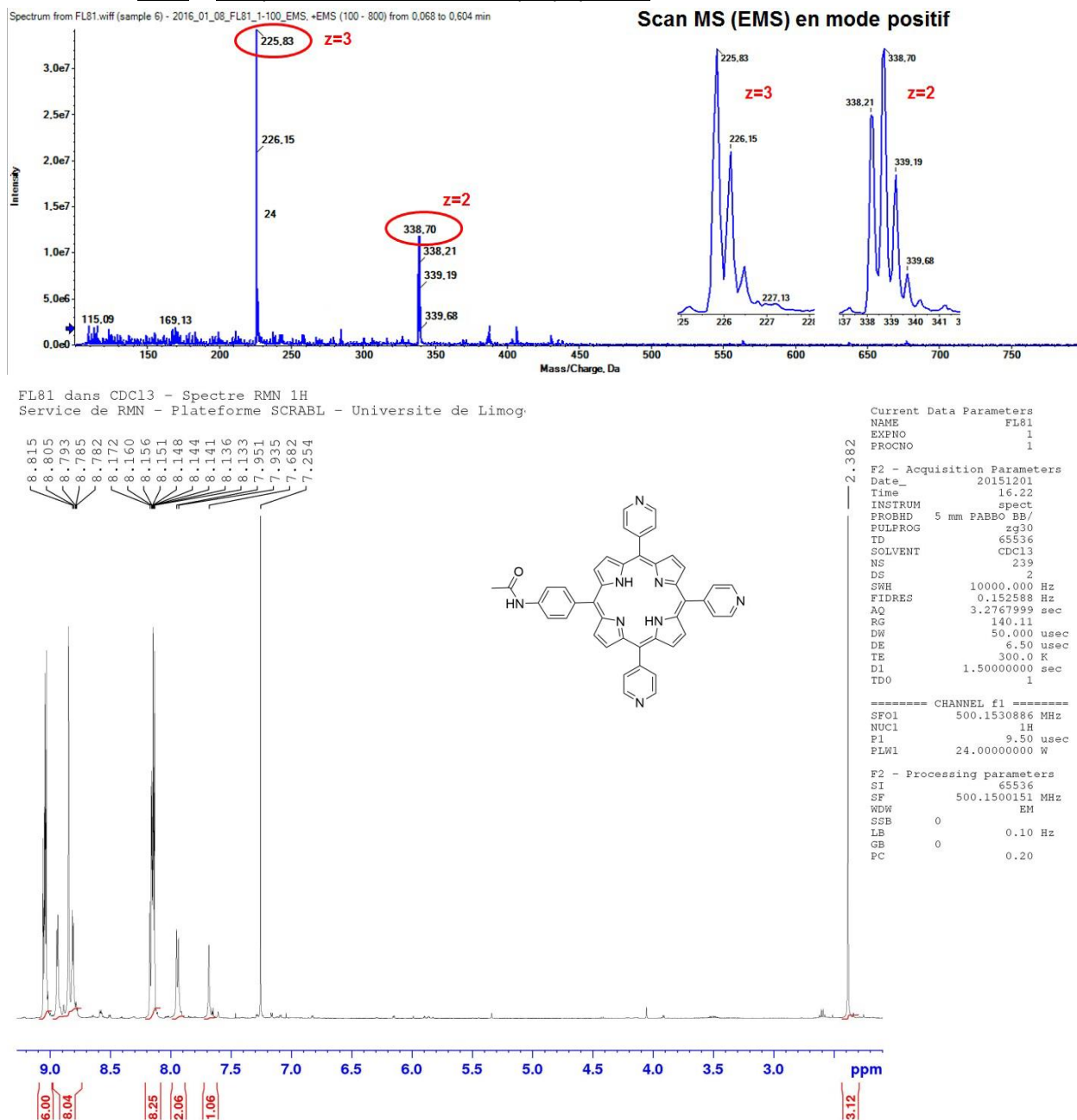


Figure 107 (S3). MS and ^1H NMR analysis of 2.

1.3.4. Analyses ^1H RMN et MS de la porphyrine **3**

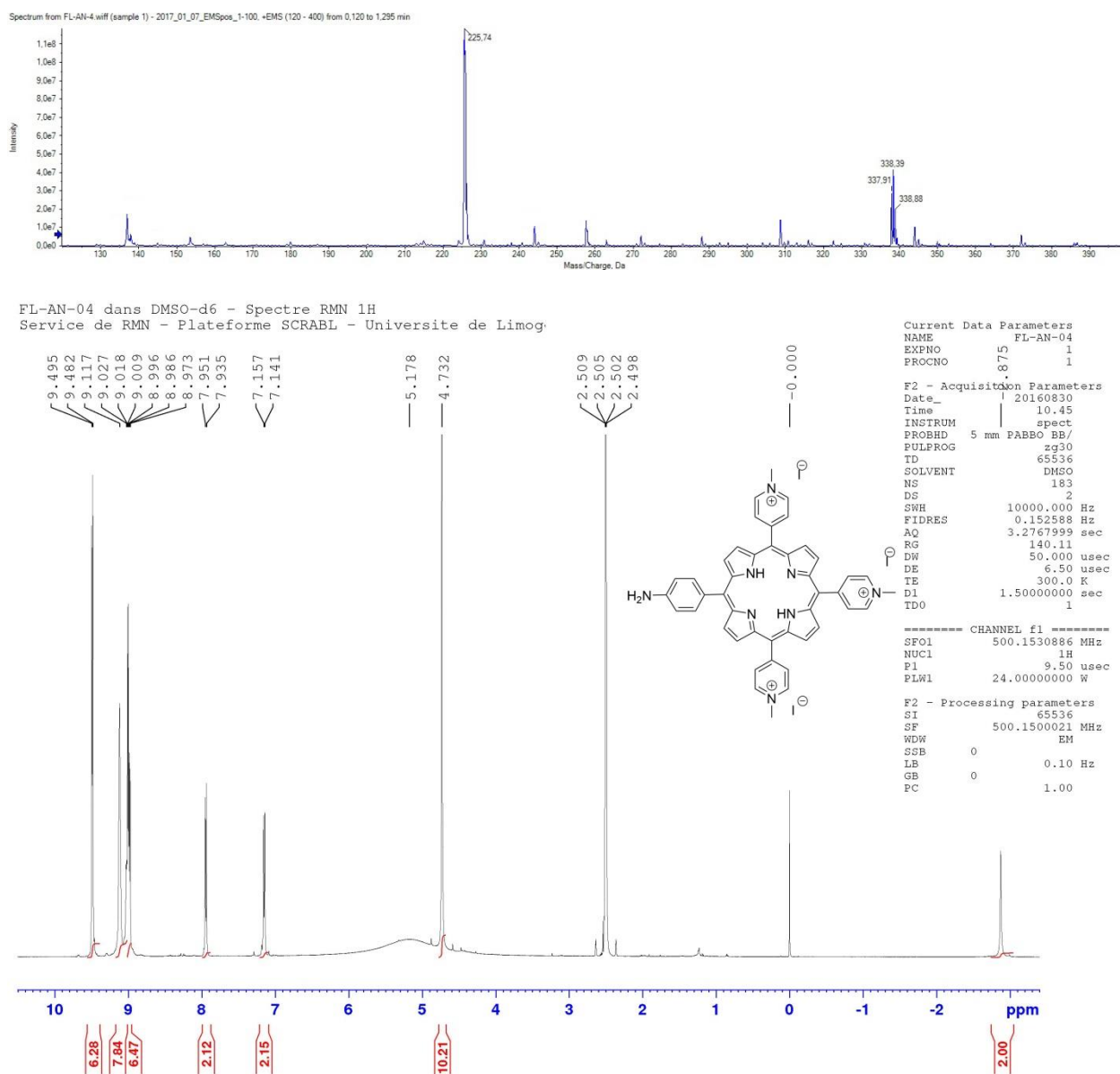


Figure 108 (S4). MS and ^1H NMR analysis of **3**.

1.3.5. Analyses ^1H RMN et MS du composé **4**

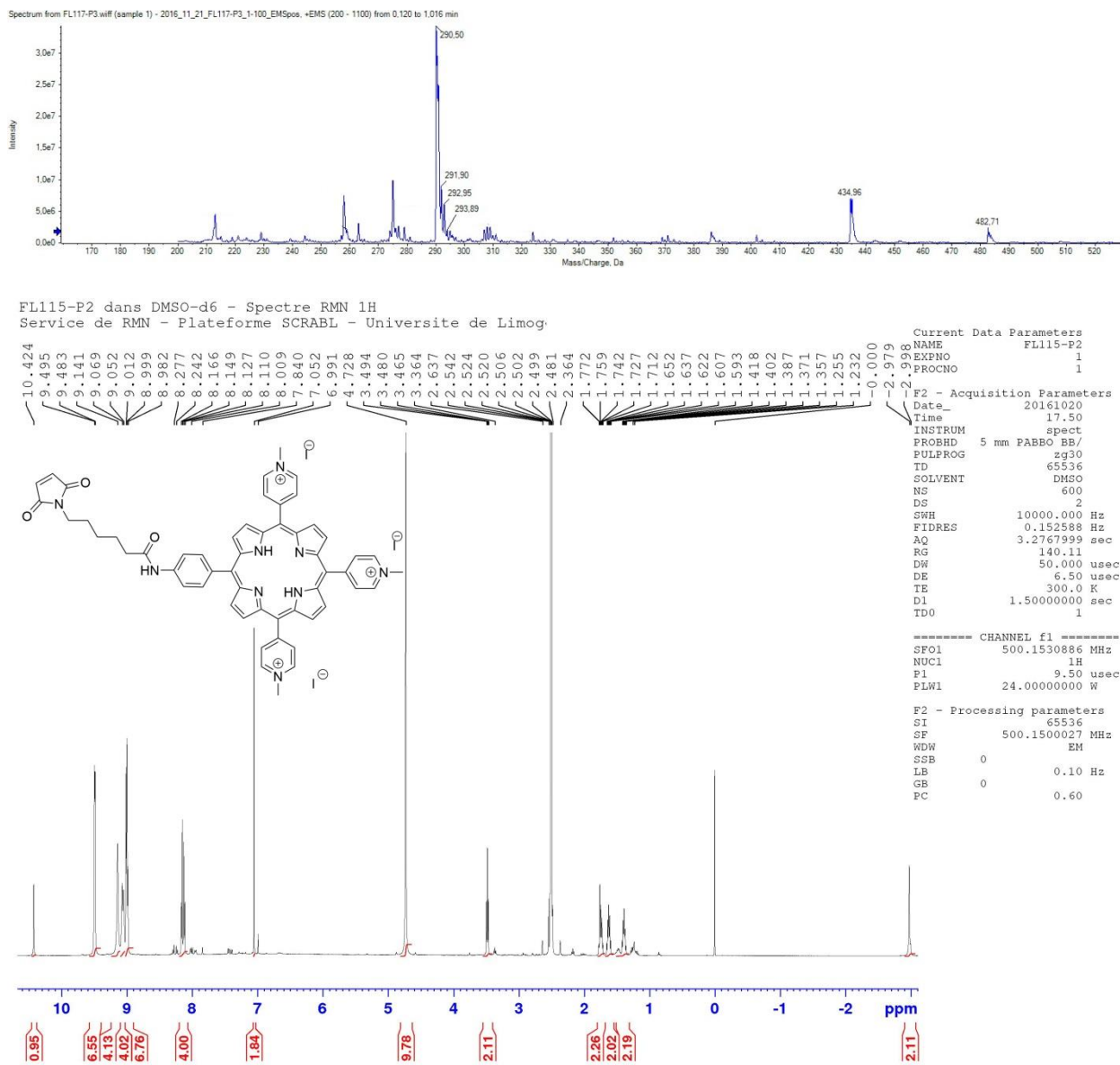


Figure 109 (S5). MS and ^1H NMR analysis of **4**.

1.3.6. Analyse HRMS de composé conjugué 5

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.6 Bar
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan End	2500 m/z	Set Collision Cell RF	1800.0 Vpp	Set Dry Gas	7.0 l/min

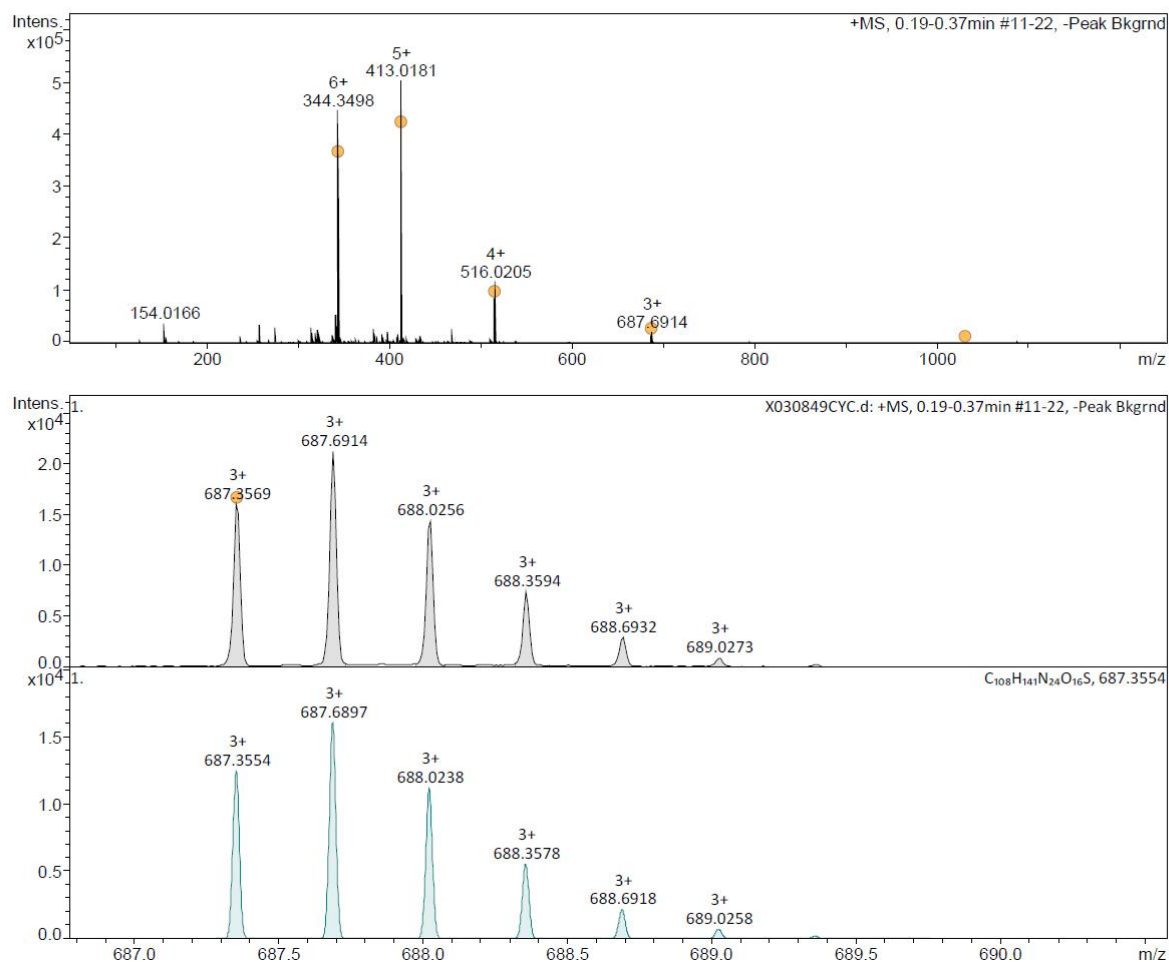


Figure 110 (S6). HRMS analysis of 5.

1.3.7. Analyse ^1H RMN de composé conjugué 5

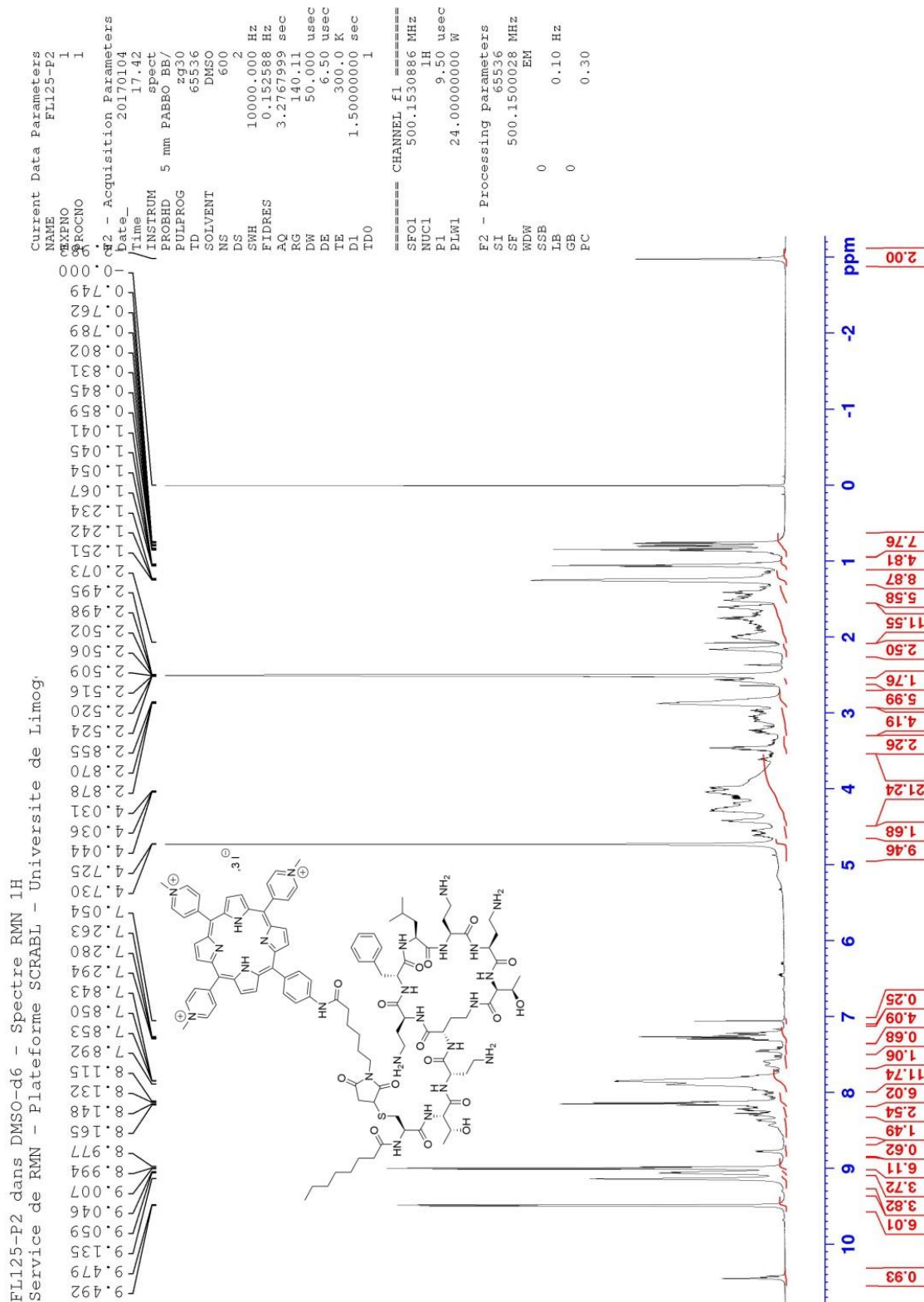


Figure 111 (S7). ^1H NMR analysis of 5.

1.3.8. Analyse ^1H COSY RMN de composé conjugué 5

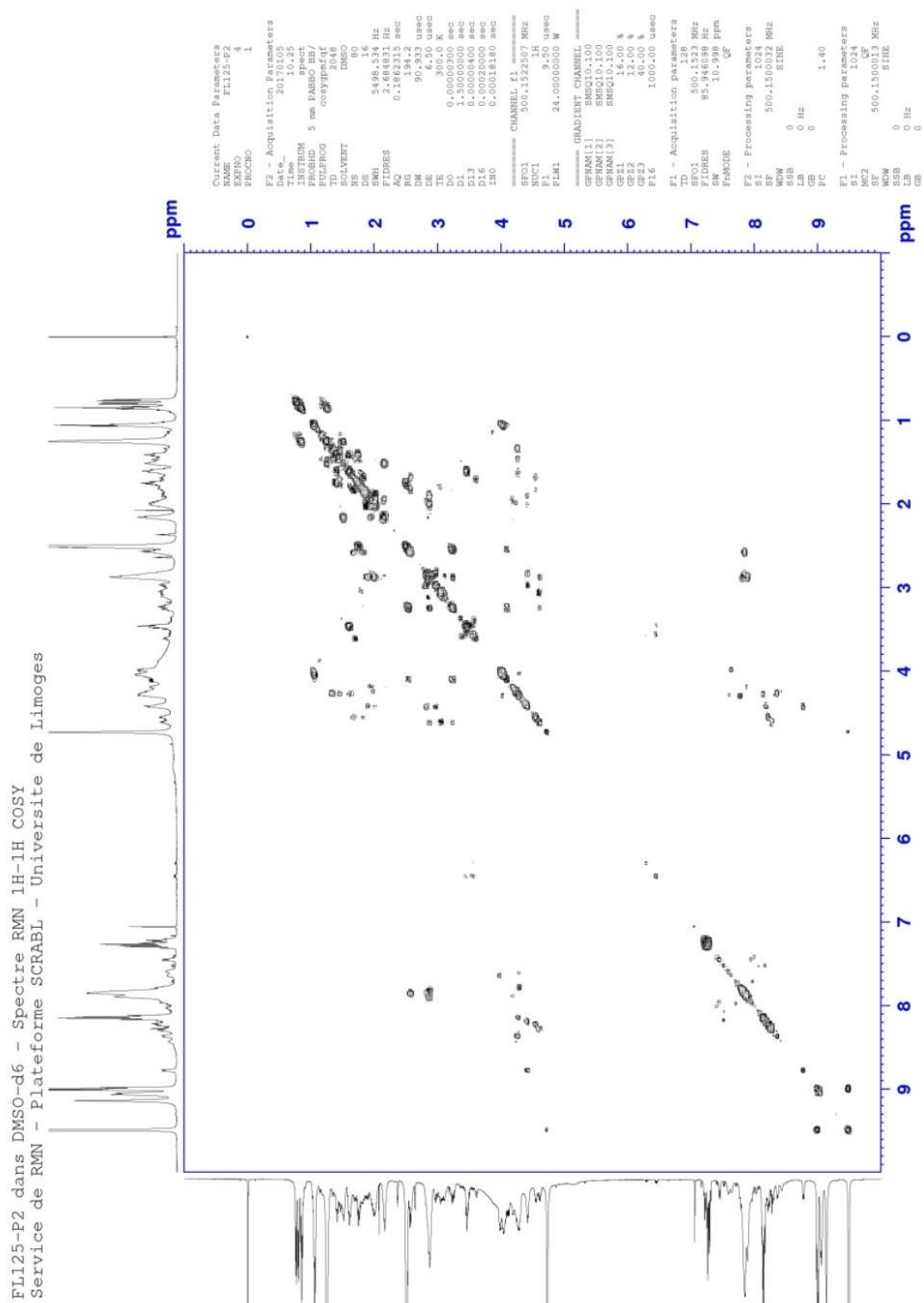


Figure 112 (S8). ^1H COSY NMR analysis of 5.

1.3.9. Analyse ^1H TOCSY RMN de composé conjugué 5



Figure 113 (S9). ^1H TOCSY NMR analysis of **5**.

1.3.10. Spectres d'absorbance des composés 2 à 5 dans le méthanol

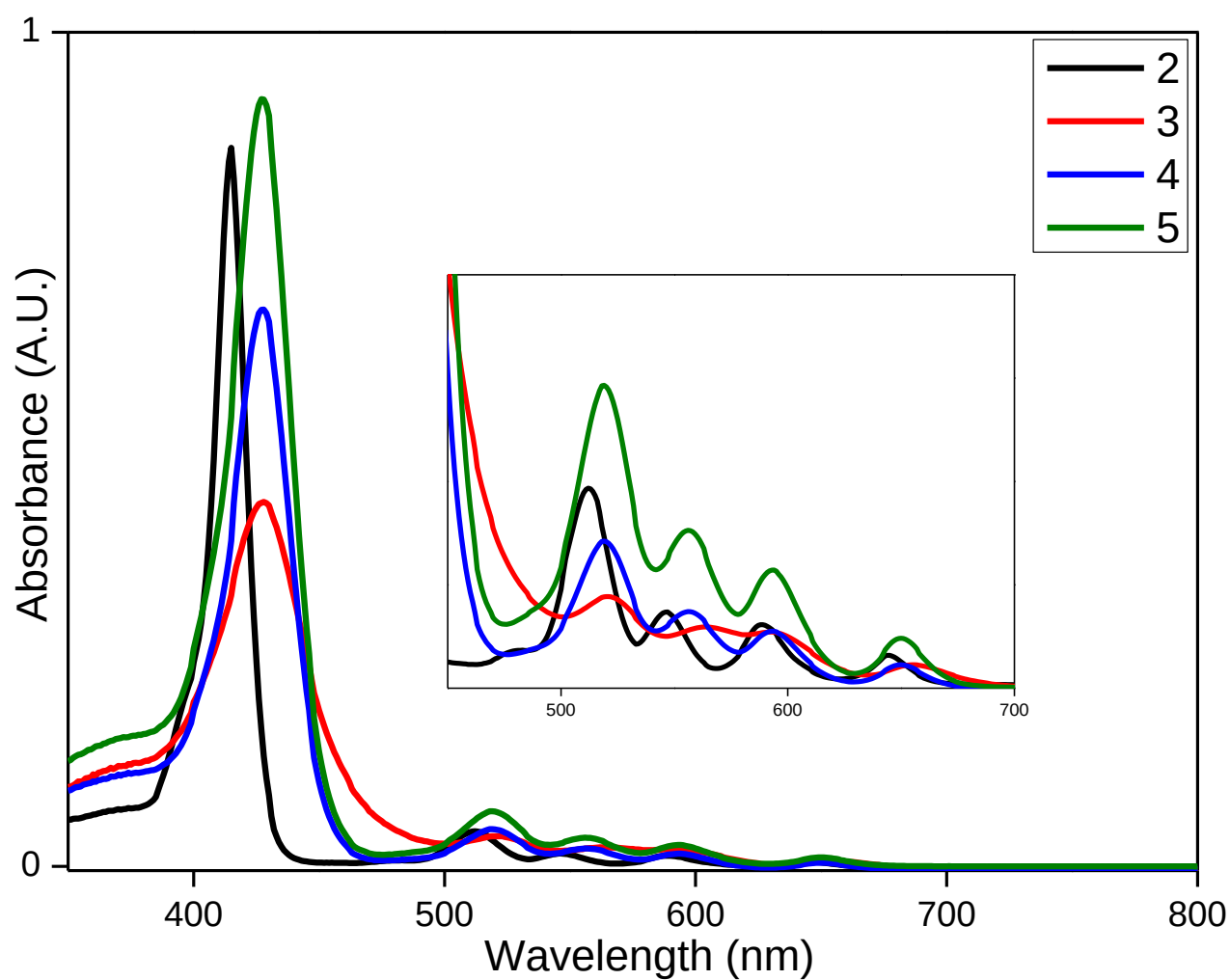


Figure 114 (S10). Absorbance spectra of **2-5** in MeOH (**[2]** = 4.03 μM , **[3]** = 3.89 μM , **[4]** = 3.67 μM , **[5]** = 4.30 μM).

l.3.11. Etude du photoblanchiment

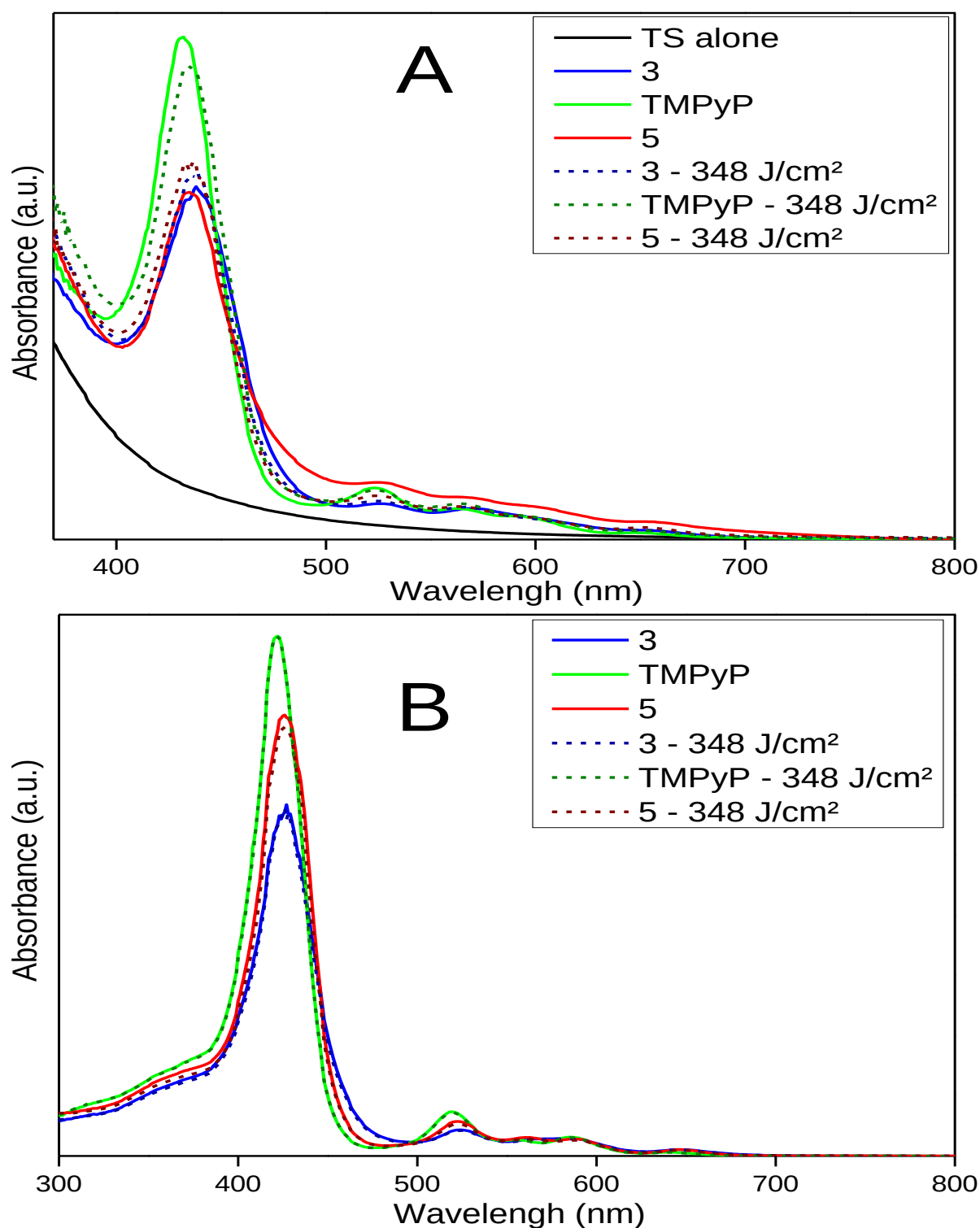


Figure 115 (S11). Absorbance spectra of **3**, **TMPyP** and **5** (25 μ M) in tryptic soy broth (A) and in PBS 1X (B), before and after irradiation (348 J/cm², white LED).

I.3.12. Microscopie confocal de NDHF seuls incubés dans différentes conditions.

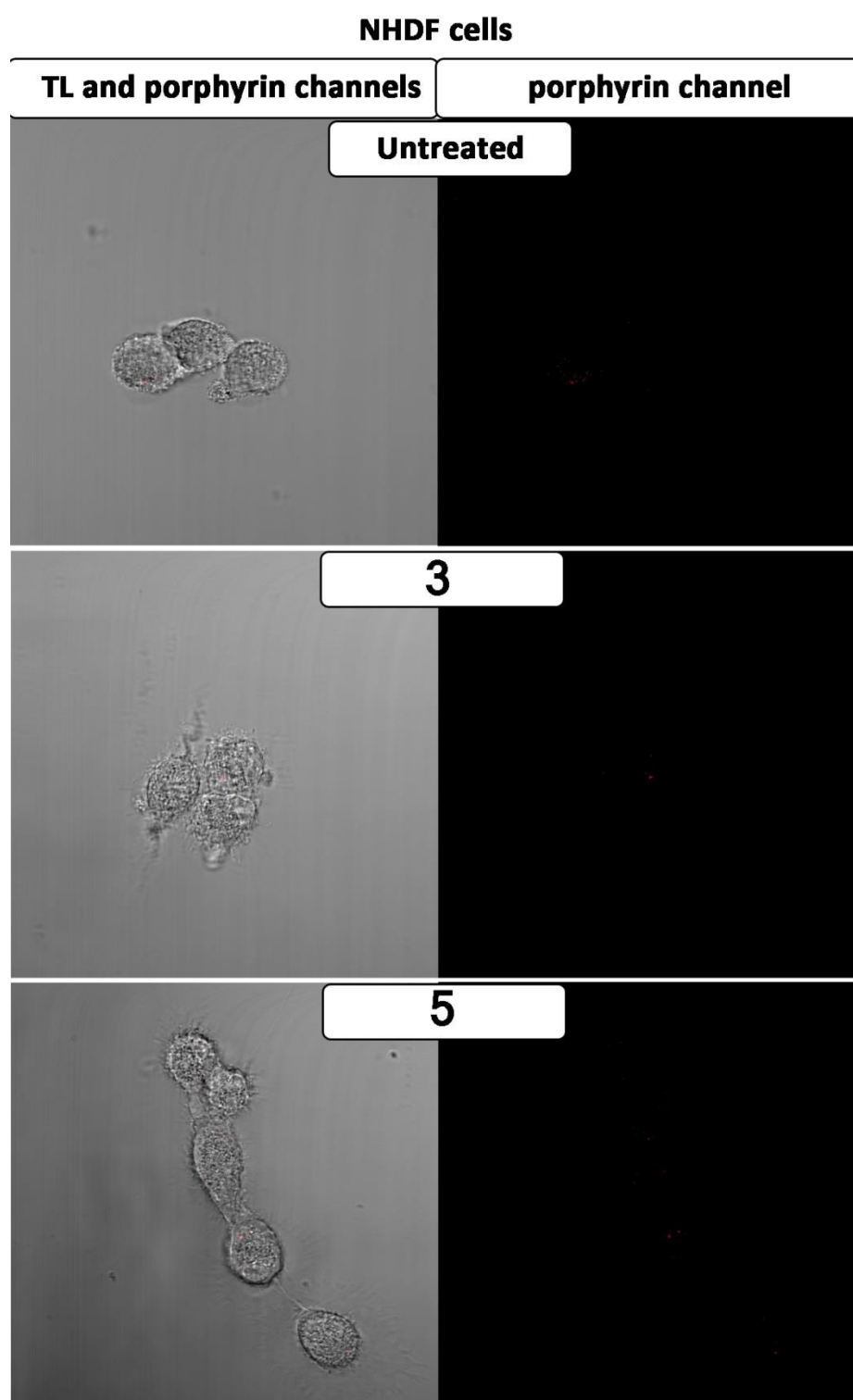


Figure 116 (S12). Confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF in different conditions: untreated, after incubation with **3** or **5**. Cells were suspended in a solution of **3** or **5** (1 μ M) for 30 min at 37 °C, then washed 3 times with PBS.

I.3.13. Microscopie confocale supplémentaire de NDHF et de bactéries incubées au contact de 5

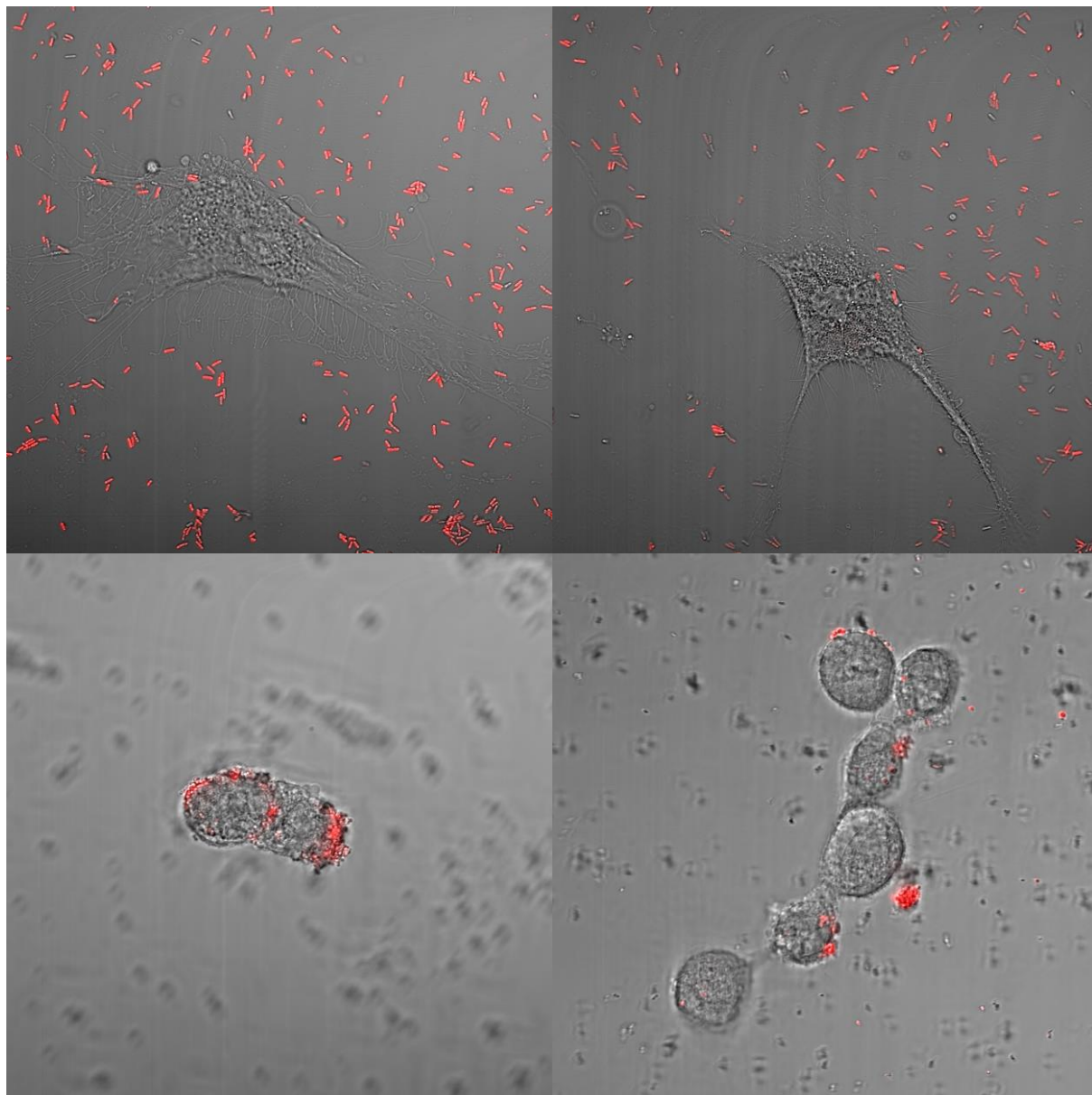


Figure 117 (S13). Additional confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF and bacteria (*P. aeruginosa* and *S. aureus*) after incubation with **5**. Cells were suspended in a solution of **5** ($1\ \mu\text{M}$) for 30 min at $37\ ^\circ\text{C}$, then washed 3 times with PBS.

I.4. Résumé et conclusion

Le couplage covalent entre une porphyrine cationique et un dérivé de polymyxine B a bien été réalisée, grâce à un récent protocole de synthèse des polymyxines.²⁶⁴ Après confirmation de la structure par HRMS et RMN, l'étude photophysique a montré que la partie photosensible a conservé sa capacité à produire de l'oxygène singulet avec un très bon rendement quantique (79%). Les essais biologiques ont montré que le couplage final **5** est plus efficace que les porphyrines cationiques habituelles sur *S. aureus*, probablement à cause de la charge cationique élevée de ce conjugué. D'un autre côté, la partie peptidique a bien conservé un effet bactéricide sur les souches Gram négatif, comme attendu. Néanmoins, la modification structurale du peptide a largement réduit son activité, car les concentrations minimales bactéricides (CMB) sont supérieures à celles du peptide d'origine. Le couplage avec la partie photosensible ne semble pas induire d'effet négatif sur l'activité du peptide. Les résultats des essais sous irradiation lumineuse ont montré des résultats très intéressants, car les CMB du composé diminuent considérablement sous l'effet de la lumière. Ces résultats montrent bien qu'il existe un effet synergique entre les deux parties du composé permettant d'atteindre une efficacité antibactérienne remarquable.

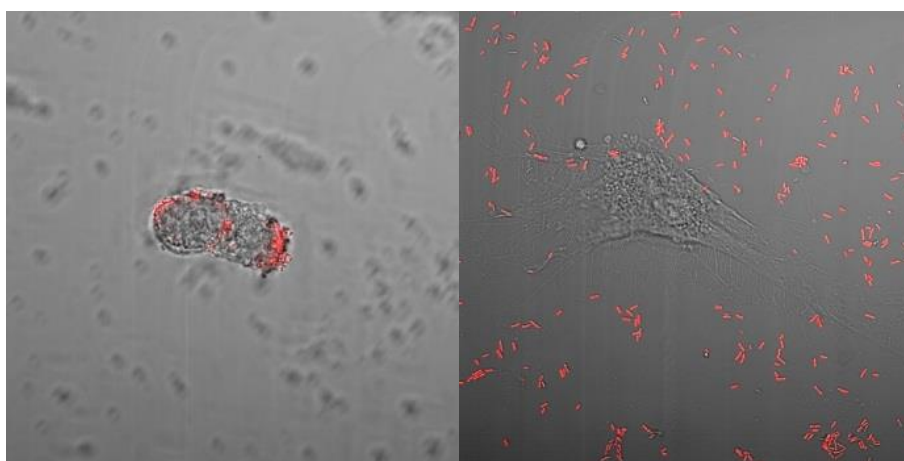


Figure 118. Images en microscopie confocale de mélanges de bactéries (*S. aureus* à gauche et *P. aeruginosa*) et de fibroblastes, après le contact avec le composé **5** (40X).

Des analyses en cytométrie en flux et en microscopie confocale ont permis de visualiser l'interaction entre le composé **5** et les différentes souches bactériennes. Alors que l'interaction entre les PS cationiques et les bactéries semblent faible, le produit **5** a montré une forte affinité pour toutes les souches utilisées. De plus, la diminution des CMB sous irradiation lumineuse pourrait aussi résulter d'une fragilisation de la membrane externe permettant donc une meilleure efficacité des ROS. Étonnement, le composé a aussi montré une forte affinité pour les bactéries Gram positif. Néanmoins, la diminution de la fluorescence suivant le nombre de lavages semble indiquer qu'il s'agit d'une interaction plus faible. Cette affinité permet de faciliter une proximité plus importante avec la paroi bactérienne, et donc une CMB plus faible que les porphyrines cationiques habituellement utilisées dans la littérature. De plus, le peptide permet d'apporter efficacement le PS à proximité des bactéries et de manière sélective. En effet, les analyses en microscopie confocale de bactéries incubées en présence de fibroblastes montrent un marquage intense des bactéries, alors que les fibroblastes ne présentent aucune fluorescence. Etant donné l'importance de la proximité du PS avec sa cible en PDT, de tels résultats indiquent que l'utilisation d'un tel composé pourrait

permettre la photoinactivation de toutes les bactéries et de faibles effets secondaires sur les cellules humaines.

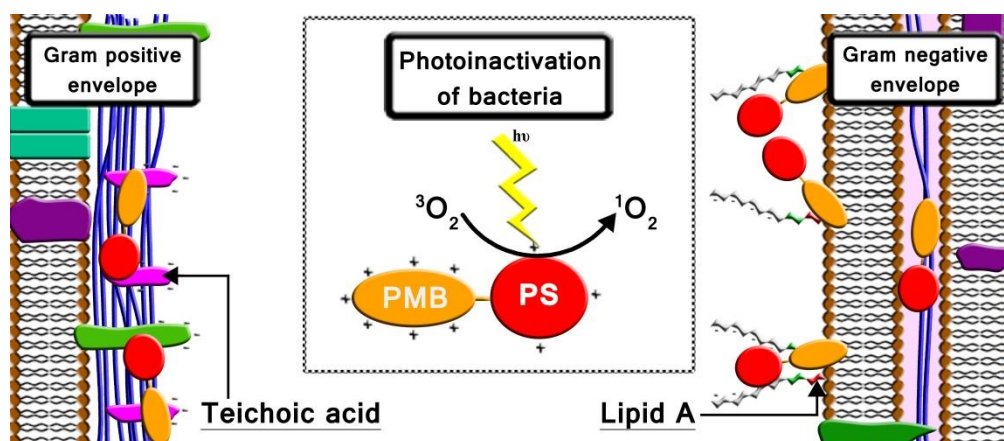


Figure 119. Schématisation des interactions entre le composé final **5** et les deux catégories de membrane bactérienne.

II. Le dérivé de polymyxine à base de lysine : un vecteur prometteur pour l'aPDT

II.1. Principe

En plus d'une sélectivité prometteuse, le composé **5** a présenté une efficacité antibactérienne plus importante, au-delà des porphyrines cationiques, déjà réputées pour leur effet photobactéricide. L'optimisation de l'aPDT sur les souches Gram négatif était assurée par l'utilisation d'un dérivé de polymyxine active, afin de conserver l'affinité initiale de ce peptide pour le lipide A. Même si de tel composé, associant l'effet aPDT et antibiotique, pourrait faciliter l'intégration de nouveaux traitements dans l'esprit commun, l'activité du peptide pourrait toujours entraîner le développement d'une résistance. Même si de telle souche résistante pourrait être photoinhibée par la partie photosensible, nous souhaitons étudier un nouveau composé, qui pourrait présenter des avantages similaires mais sans activité biologique induite par le peptide antimicrobien.

Afin de réduire l'activité des polymyxines, plusieurs stratégies peuvent être envisagées, comme la suppression de la chaîne alcane ou la modification de la structure primaire. Dans cette étude, nous avons choisi de remplacer les acides aminés externes *L*-Dab par des *L*-lysines. L'impact des lysines a uniquement été étudié avec des nanopeptides.²⁶⁵ Liao et al. ont montré qu'un dérivé de polymyxine à base de lysine pourrait avoir une structure 3D assez proche du peptide originel.²⁶⁶ Ainsi, en reprenant les protocoles et les différentes étapes de l'étude précédente, un nouveau composé conjugué **5Lys** (« P⁺-PMBLys ») a été évalué dans cette partie.

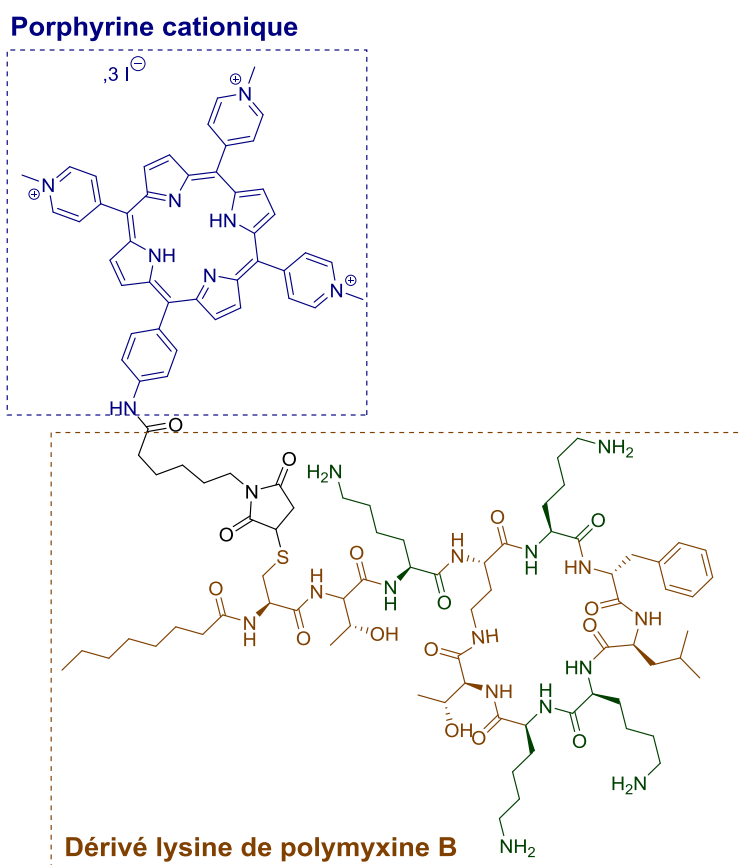


Figure 120. Structure chimique du nouveau composé **5Lys** (« P⁺-PMBLys »)

Lysine analogue of Polymyxin B as a significant opportunity for photodynamic antimicrobial chemotherapy

Florent Le Guern[†], Tan-Sothea Ouk^{†*}, Catherine Ouk[§], Regis Vanderesse⁺, Yves Champavier[§], Emilie Pinault[§], Vincent Sol^{†*}

[†]Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN), EA 1069, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France. [§]Université de Limoges, BISCEM, 87000 Limoges, France. ⁺Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7375 CNRS, ENSIC, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France

KEYWORDS: PACT, cationic porphyrin, polymyxin B, targeting, lysine, antimicrobial peptide.

ABSTRACT: In order to highlight the potential of PACT in case of infections by antibiotic resistant-strains, a new antimicrobial peptide conjugate has been synthesized, consisting of a derivative of polymyxin B and a cationic porphyrin covalently attached together to a spacer. A polymyxin-derived moiety was subjected to a primary structural modification consisting in the replacement of 4 diaminobutyrate residues with lysine ones. This modification was done in order to strongly reduce bactericidal activity, with the aim to eliminate the potential rise of polymyxin-resistant strains. Despite this modification, this new conjugate displayed a strong photobactericidal activity against Gram-positive as well as Gram-negative bacteria. It was further shown that this conjugate was able to strongly stick to the cell walls of either kind of strains, thus helping to inactivate bacteria through the production of ROS under light irradiation.

Since the introduction of penicillin in the 1940's, the era of conventional antimicrobial drugs (commonly known as antibiotics) was considered as miraculous, given that these treatments had significantly decreased the death rates from bacterial infections¹. Despite the well-known rise of resistant bacteria, these drugs have been wrongly used all around the world, due in particular to faulty communications and common beliefs². In addition to bacterial resistance, leading to the emergence of superbugs or multidrug resistant (MDR) strains, the pace of new antibiotic discoveries has gradually slowed down in the recent years^{3,4}. The issues due to microbial resistance are currently recognized worldwide by health organizations⁵. Consequently, alternative strategies to reduce the impact of microbial infections have been investigated. Among them, photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) appeared as a promising alternative since, contrary to antibiotherapy, it did not induce bacterial resistance⁶. This technique relies on the light activation of photosensitizers (PS) which, in presence of dioxygen (³O₂) and under appropriate irradiation, leads to a local production of cytotoxic reactive oxygen species (ROS) like singlet oxygen (¹O₂), hydrogen peroxide or oxygen-centered radicals. However, besides its advantages the major drawback of PACT lies in its lack of specificity, since photo-induced ROS may be deleterious to bacteria and infected tissues as well⁷. Thus, in order to take advantage of the promising potential of PACT, many researchers have successively improved this alternative to antibiotics by using chemistry⁸⁻¹⁰, or delivery methods^{11,12}. In a previous work, a conjugate consisting of a cationic porphyrin (efficient PACT-tested PS¹³)

covalently bound to a polymyxin derivative (antimicrobial peptide¹⁴, **1**, Figure 1-A) has been developed (**5**, Figure 1-B)¹⁵. In addition to a selective interaction with bacteria, this conjugate showed a better photobactericidal activity than the tetra(*N*-methylpyridyl)porphyrin alone (**TMPyP**, Figure 1-C). The polymyxin derivative, on which this conjugate was based, retained most of the antibiotic activity of genuine polymyxin, ensured by binding to the lipid A of the Gram-negative bacteria cell wall^{16,17}. Such an active conjugate might ease a transition to PACT through a light-enhanced antibacterial activity. Despite the promising results obtained with this conjugate, we investigated an approach aimed at decreasing the antibacterial activity of the peptidic moiety while preserving its target specificity. The rationale behind this modification was to reduce the potential rise of microbial resistance against polymyxin B. Even if a peptidic modification would raise some uncertainties about targeting, such an efficient photosensitizer devoid of resistance-inducing properties would provide a considerable opportunity for PACT. To reach this objective, a new polymyxin derivative was designed by switching all the remaining dab residues with lysine (except residue #4, the dab residue involved in the cycle formation) (**1Lys**, Figure 1-D). Such a compound may offer a good interaction but a reduced biological activity¹⁸. Based on a strategy described in a previous communication¹⁵, we report here the synthesis, characterization and photobactericidal properties of a conjugate made of a cationic porphyrin covalently bound to a lysine analog of polymyxin B (**5Lys**) (Figure 1-E).

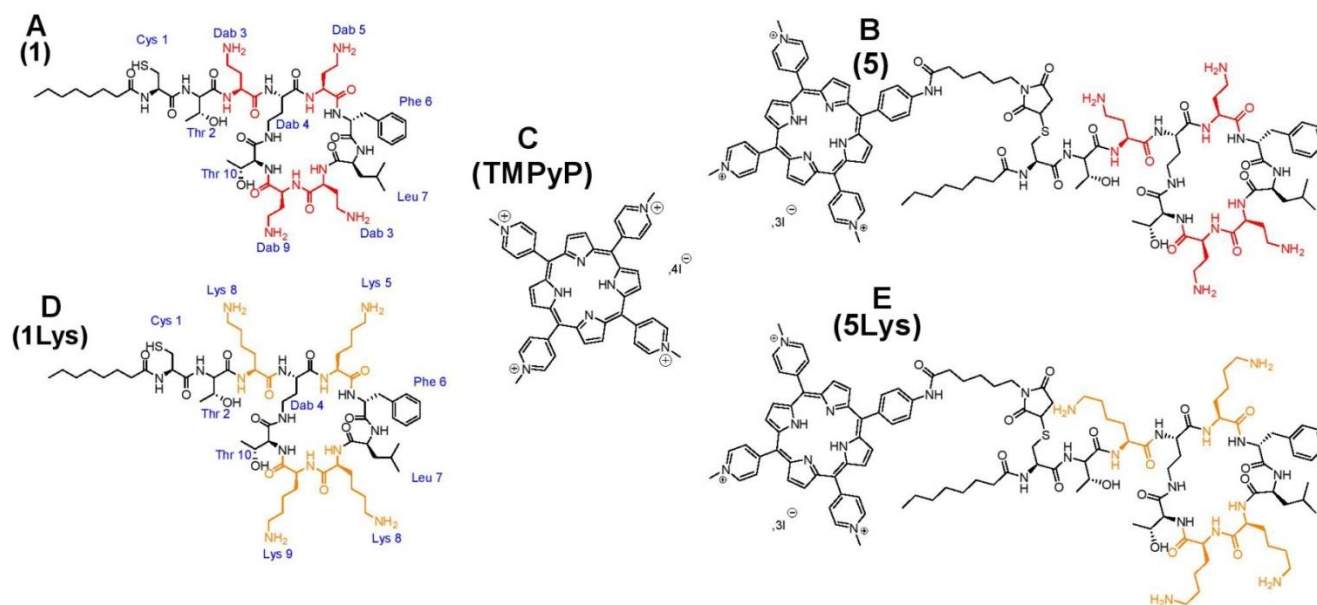


Figure 1. Structures of: A: initial polymyxin derivative (**1**); B: the previous cationic porphyrin-Polymyxin B conjugate (**5**); C: tetrakis(*N*-methylpyridyl)porphyrin (TMPyP); D: Lysine analog of polymyxin (**1Lys**); E: studied conjugate based on the lysine analog

The impact of lysine residue in polymyxin has been only studied with nonapeptides¹⁹, whereas **5Lys** is more related to the initial structure of polymyxins. Nevertheless, Liao and co-workers have shown that the structural fold of the lysine analog shares similarities with original PMB²⁰. However, all these studies have already underscored the sufficient interaction between Gram-negative bacteria and lysine-inspired peptides²¹. The synthesis of this conjugate was simply achieved by following a protocol already described in a previous communication (Figure S1)¹⁵. The amino acid switching did not bring any additional difficulty and the final compound was clearly characterized by HRMS and NMR (Figure S2-6). As expected, this conjugate **5Lys** displayed photophysical properties similar to previously synthesized compound **5** (Figure S7-8, Table S1), indicating that any potential difference between their biological activities must be associated with the peptidic modification.

Bactericidal properties of compounds **1Lys** and **5Lys** have been tested against three bacterial strains (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*) in the dark and in presence of light, and compared with the properties of the parent compounds **1** and **5** (Table 1)¹⁵. Compound **1Lys**, in which 4 dab residues of com-

pound **1** were switched for lysine, displayed a strongly reduced activity against Gram-negative bacteria. A MBC of 50 μM was recorded with compound **1Lys** against *E. coli*, vs 5 μM with compound **1**; the same shift was observed with compound **5Lys** in comparison with compound **5**, with MBC equal to 25 and 1.2 - 5 μM , respectively, against the same strain in the dark. Compounds **1Lys** and **5Lys** were completely ineffective in the dark against *P. aeruginosa* (even at 100 μM), while the parent compounds **1** and **5** showed MBC of 10 μM in the same conditions. We found that, in presence of light, the bactericidal activity of compound **5Lys** was restored to the level found with compound **5**, with MBC of 0.8 vs 0.5 μM , respectively, against *E. coli*. A similar effect was recorded against *P. aeruginosa*, although with a higher value of MBC, 8 vs 2.5 μM . We showed in the previous article that compound **5** was endowed with photobactericidal properties against *S. aureus*¹⁵. The present results show that the Dab/Lys switches had little influence on MBC, 1.2 vs 0.8 μM for compounds **5Lys** and **5**, respectively against this Gram-positive strain. Since the enhanced activity of compound **5** against this strain was based on its strong positive charge, this result seems to be consistent as **5Lys** has an equal charge but longer side chains. Table 1 also shows that compound **5Lys** was more active than the cationic

Table 1. MBCs (μM) against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* under two different conditions at 37 °C; 20 hours of white light irradiation (4.83 mW/cm²) and in the dark. These assays were performed in tryptic soy culture medium, with bacteria in their log phase. The minimal bactericidal concentration corresponds to the concentration of the active compound for which 99.99% of the bacteria have been killed (i.e., 4 log reduction compared to the untreated control). Four replicates were performed for each condition.

Compounds	MBC (μM)					
	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
1 ¹⁵	>50	>50	10.0	10.0	5.0	5.0
5 ¹⁵	0.8	-	2.5	10.0	0.5	1.2 – 5.0
1Lys	-	-	>100	>100	50.0	50.0
TMPyP	5.0	-	20.0	-	18.0	-
5Lys	1.2	-	8.0	>100	0.8	25.0

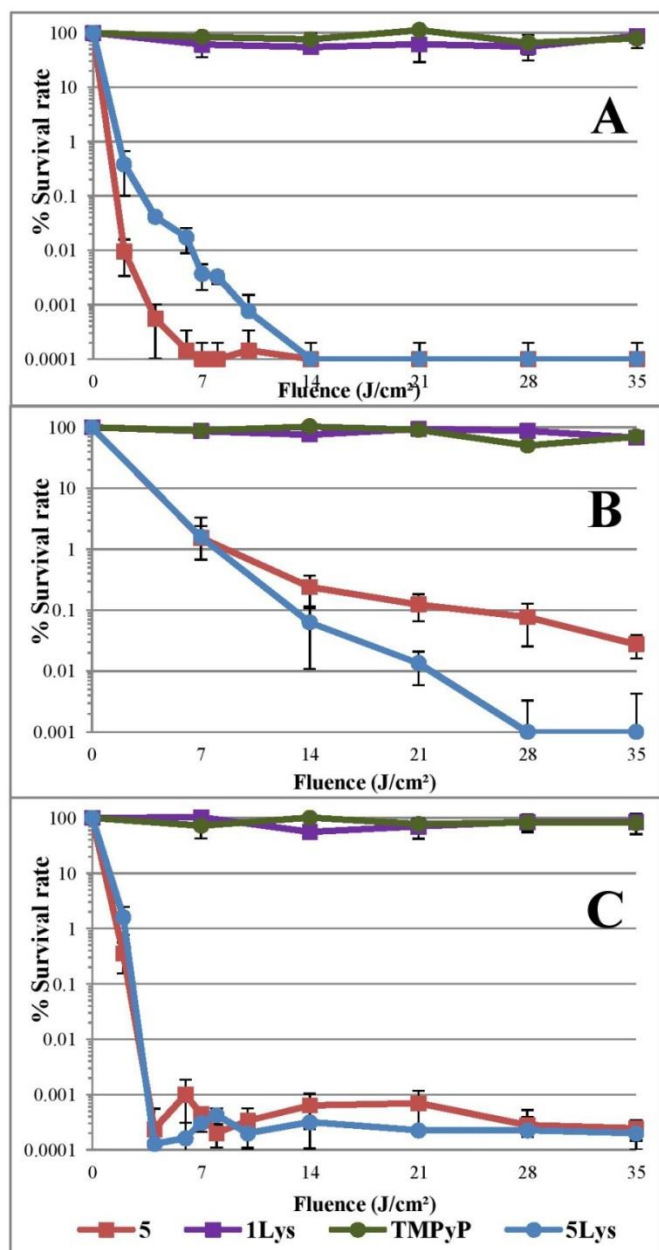


Figure 2. Photodynamic inactivation of *S. aureus* (A), *P. aeruginosa* (B) and *E. coli* (C) in their stationary phase. After 30 min in the different solutions of **5Lys** (10 μ M for *S. aureus* and *E. coli*, 1 μ M for *P. aeruginosa* in PBS 1X), bacteria were washed three times with PBS. Then, they were irradiated by white LED (4.83 mW/cm², 7 J/cm² corresponds to 24 min) at 37° C. Bacterial survival rates (% of initial densities) were plotted against cumulative light fluence at different

porphyrin **TMPyP** alone against the three bacteria studied, which suggests a synergic effect between the two moieties despite the weak activity of the lysine analog of polymyxin.

These results were confirmed through an additional set of experiments (Figure 2). For these assays, a large amount of bacteria were harvested and directly put in contact with the compounds in PBS. After 30 minutes of incubation in the different solutions, bacteria were washed twice with PBS, suspended in the same solution and then irradiated under the same light conditions as before. The bacterial densities and the survival rate were monitored in function of irradiation time. Whereas compound **5Lys** seemed to be slightly less effective than **5** against *S. aureus* (Figure 2-A), the results against

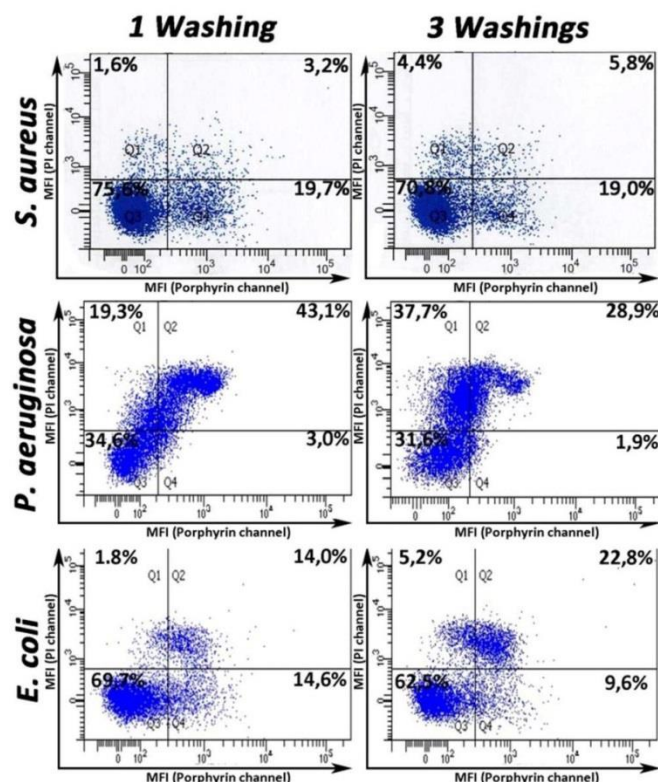


Figure 3. Flow cytometry analyses of bacterial strains after contact with **5Lys**. The bacteria were incubated in a solution of **5Lys** (1 μ M) for 30 min at 37° C, then washed with saline. PI was added (0.01 mg/mL) in order to appreciate the bacterial viability. Q1 refers to bacteria with permeable membrane (PI positive). Q2 refers to double positive bacteria (PI positive and PS positive). Q3 and Q4 refers to live bacteria (PI negative), of which Q4 are labelled with PS. Based on 3 independent experiments, the average population repartition is specified for each condition.

Gram-negative bacteria were interesting. Indeed, **5Lys** showed an efficiency similar to that of conjugate **5** against *E. coli* (Figure 2-C), but a better efficacy against *P. aeruginosa* (Figure 2-B). Despite these slight discrepancies, **5Lys** offers a wide-spectrum of bactericidal effect starting from the first income of light. Based on the results from both experiments, **5** and **5Lys** seem to have a close photobactericidal capacity, whereas the activity of **5Lys** is significantly weaker than **5** in the dark, in accordance with the main purpose of this study.

Because of the peptidic modification, supplementary biological assays were necessary. Even if the biological assays have proven a synergistic effect of the two different moieties of compound **5Lys**, an uncertainty remains about the potential interaction of this compound with bacteria. Then, flow cytometry experiments were tried out in the same experimental condition as before (Figure 3)¹⁵. Propidium iodide (PI) was added as marker of membrane integrity. The analysis with *S. aureus* has shown an unexpected result. In spite of the good amount of labelled bacteria (Q2+Q4=23.8%) which was already observed with compound **5**, the repeated washings did not reduce the percentage of the labelled population. Thus, this result may indicate a strong attachment of this lysine analog to this strain. Among the numerous studies focused on the “Structure-Activity” relationship of polymyxin, some of them have already highlighted an increase of activity against Gram-positive strains after a peptidic modification²²⁻²⁴. Most of these studies assigned this new efficiency to a decrease of the

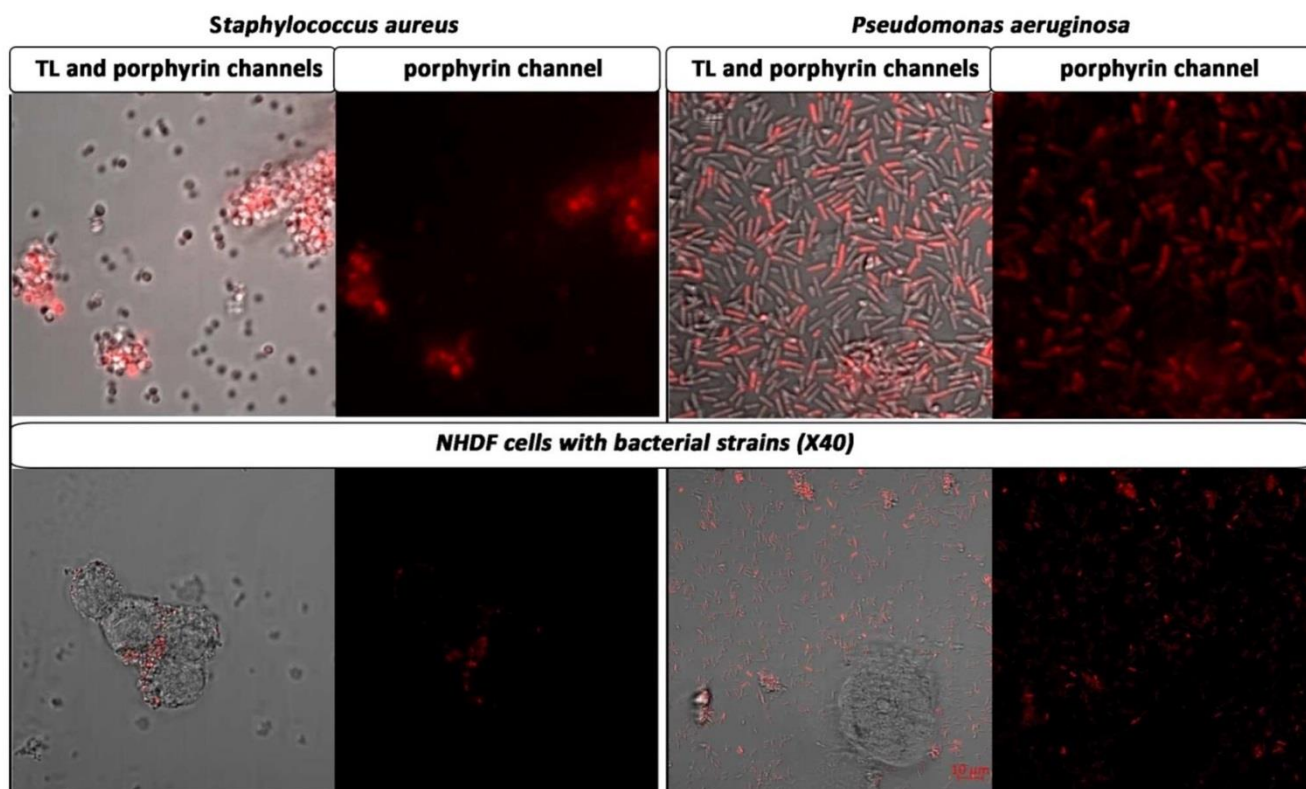


Figure 4. Confocal laser scanning microscopy imaging of *S. aureus* (left) and *P. aeruginosa* (right) after contact with **5Lys** (100X). NHDF cells and bacteria were mixed together before treatment with **5Lys** (40X). Inocula were suspended into solution of 1 μ M for 30 min in 37 $^{\circ}$ C, then washed 3 times with PBS.

cationic charge or an increase of the lipophilic trend, which is not the case here. Anyhow, compound **5Lys** seems to bind to the Gram-positive bacterium without inducing any bactericidal activity.

The cytogrammes obtained from the experiments with *P. aeruginosa* show a less well defined distribution of the populations. Anyway, more than 30% of the bacteria seem to be strongly labelled by **5Lys**. Even if it did not show a bactericidal effect against this strain, the peptidic moiety of this compound still has a significant affinity for the bacterial outer membrane. Moreover, this membrane seems to be weakened as a consequent amount of bacteria are PI positive ($Q2+Q4=64.5\%$). This effect is less pronounced than with previous conjugate **5** (80%)¹⁵. Despite its lack of bactericidal activity, the lysine-based compound **5Lys** showed a capacity to weaken the outer membrane of *P. aeruginosa*. Thus, this retained ability offers an opportunity for ROS to inactivate the bacteria, in accordance with the low MBCs after light irradiation. Similar behaviors were already described for few polymyxin derivatives (such as PMBN¹⁹), and they are generally assigned to a lack of fatty acid chain which leads to a weaker uptake into the outer membrane (OM). Thus, lysine residues may hinder the inclusion of the hydrophobic part of **5Lys** into the OM. Anyway, this result was also confirmed by experiments against *E. coli*, where at least 30% of bacteria were labelled by **5Lys**. Thus, in spite of less efficient interaction than with previously synthesized compound **5**, conjugate **5Lys** still has a good affinity for bacteria and has the ability to weaken the outer-membrane, leading to an enhanced photo-bactericidal activity.

Confocal microscopy analyses were performed to visualize interactions between bacteria and **5Lys** (Figure 4). The pictures with bacteria alone in contact with **5Lys** revealed a sig-

nificant fluorescence which is very similar to that obtained with the previous conjugate **5**. As the peptidic modification could lead to a new and unexpected interaction with mammal cells, the selectivity of the new conjugate **5Lys** was also investigated using normal dermal human fibroblasts (NDHF) incubated together with bacterial strains. As the cytotoxicity of **5Lys** on NDHF was similar to **5** (Table S2), the lysine analog of polymyxin **5Lys** did not seem to have any affinity for NDHF cells, since confocal imaging showed no additional fluorescence emission from these cells. Moreover, in compliance with cytometry flow experiments, both bacterial strains incubated with NDHF cells have kept a noticeable fluorescence. Thus, despite a slightly weaker bacterial interaction, the ability of this new conjugate to selectively target bacteria has been retained.

This additional investigation of a new targeting agent for PACT has highlighted the promising interest for the Lysine analog of polymyxin. Indeed, peptide **1Lys**, as well as the peptidic moiety of the conjugate **5Lys**, have shown a significant loss of activity in the dark. Nevertheless, affinity of **5Lys** for bacteria and its ability to weaken bacterial membrane has been mostly preserved. Unfortunately, the substantial peptidic modification prevents us from finding a clear interpretation as the Lipid A targeting is not ensured anymore. Anyhow, by using this peptide through a conjugate with a cationic porphyrin, ROS production led to very low MBCs. An incertitude remains about the establishment of the resistance from the bacteria which are in contact with such compound, as the bacterial inactivation seems to be induced by PACT only. Such conjugate should resolve this question in further studies and should challenge the limits of resistance to PACT.

ASSOCIATED CONTENT

Experimental procedures

Based on our previous work, identical materials (including devices, bacterial strains and mammalian cell lines) and methods have been used in order to provide homogeneous experimental conditions¹⁵.

Chemical Synthesis

Synthesis of 5-(4-(maleimido)hexanoamidophenyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridinium)porphyrin triiodide (4) and synthesis of PMB-Lysine derivative (1Lys). The used protocols have already been described in the previous communication. From the peptidic preparation, the Fmoc-Dab(Boc)-OH have been switched with Fmoc-Lys(Boc)-OH during the sequential peptide formation. Likewise, Fmoc-Lys-OAllyl was synthesized using similar condition as used for the synthesis of Fmoc-Dab-OAllyl. HRMS (ESI+) [C₆₂H₁₀₉N₁₅O₁₃S]: [M+2H]²⁺ calcd 652.9103, found 652.9088.

Synthesis of the final conjugate porphyrin-PMB (5Lys). **4** (41.6 mg, 33.2 μmol, 1 eq) and **1Lys** (43.3 mg, 33.2 μmol, 1 eq) were dissolved into a phosphate buffer solution (0.5 M) at pH 6.5. The mixture was gently stirred overnight at room temperature. The crude was directly purified by reverse phase chromatography. The freeze-dried final product **5Lys** was obtained as a brown powder with 69% yield (58.5 mg, 22.9 μmol). UV-visible (MeOH), λ_{max}(nm) (ε log L.mol⁻¹.cm⁻¹): 427 (5.31), 519 (4.14), 556 (3.86), 594 (3.73), 650 (3.36). HRMS (ESI+) [C₁₁₆H₁₅₇I₃N₂₄O₁₆S]: [M]³⁺ calcd 724.7305, found 724.7334.

Supporting Information

Synthetic route, MS and NMR analyses, photophysical properties, confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF (alone or with bacteria), and cytotoxicity of **5Lys** on NHDF.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tan Sothea Ouk, phone +33(0)-5-5545-4402; E-mail: tan-sothea.ouk@unilim.fr

*Vincent Sol, phone: +33(0)-5-5545-7490; fax: +33(0)-5-5545-7202 E-mail: vincent.sol@unilim.fr

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the 'Conseil Régional du Limousin' for financial support (FLG) and are indebted to Dr. Michel Guilloton for help in manuscript editing, Claire Carrion (BISCEM – University of Limoges) and Dr Cyril Colas (ICOA-University of Orleans) for respectively confocal microscopy imaging, ESI and HRMS analysis.

ABBREVIATIONS

MDR, multi-drug resistant; MBC, minimal bactericidal concentration; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NHDF, normal human dermal fibroblast; ROS, reactive oxygen species; PACT, photodynamic antimicrobial chemotherapy; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; PMB, polymyxin B; PS, photosensitizer; TPP, *meso*-tetrakis(phenyl)porphyrin.

REFERENCES

- (1) Prescott, L. M.; Willey, J.; Sherwood, L.; Woolverton, C. J. *Microbiologie*, 4th ed.; De Boeck, 2013.
- (2) Cabral, C.; Ingram, J.; Lucas, P. J.; Redmond, N. M.; Kai, J.; Hay, A. D.; Horwood, J. Influence of Clinical Communication on Parents' Antibiotic Expectations for Children with Respiratory Tract Infections. *Ann. Fam. Med.* **2016**, *14* (2), 141–147.
- (3) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm. Ther.* **2015**, *40* (4), 277–283.
- (4) Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegós, G. P.; Hamblin, M. R. Photoantimicrobials—are We Afraid of the Light? *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17* (2), e49–e55.
- (5) O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. **2016**.
- (6) Tavares, A.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Á.; Gomes, N. C. M.; Alves, E.; Almeida, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (1), 91–105.
- (7) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbely, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90* (12), 889–905.
- (8) Dosselli, R.; Ruiz-González, R.; Moret, F.; Agnoloni, V.; Compagnin, C.; Mognato, M.; Sella, V.; Agut, M.; Nonell, S.; Gobbo, M.; Reddi, E. Synthesis, Spectroscopic, and Photophysical Characterization and Photosensitizing Activity toward Prokaryotic and Eukaryotic Cells of Porphyrin-Magainin and -Bofurin Conjugates. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1403–1415.
- (9) Liu, F.; Soh Yan Ni, A.; Lim, Y.; Mohanram, H.; Bhattacharjya, S.; Xing, B. Lipopolysaccharide Neutralizing Peptide-Porphyrin Conjugates for Effective Photoinactivation and Intracellular Imaging of Gram-Negative Bacteria Strains. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (8), 1639–1647.
- (10) Johnson, G. A.; Ellis, E. A.; Kim, H.; Muthukrishnan, N.; Snively, T.; Pellois, J.-P. Photoinduced Membrane Damage of *E. Coli* and *S. Aureus* by the Photosensitizer-Antimicrobial Peptide Conjugate Eosin-(KLAKLAK) 2. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e91220.
- (11) Carpenter, B. L.; Feese, E.; Sadeghifar, H.; Argyropoulos, D. S.; Ghiladi, R. A. Porphyrin-Cellulose Nanocrystals: A Photobactericidal Material That Exhibits Broad Spectrum Antimicrobial Activity. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88* (3), 527–536.
- (12) Anaya-Plaza, E.; van de Winkel, E.; Mikkilä, J.; Malho, J.-M.; Ikkala, O.; Gulias, O.; Bresoli-Obach, R.; Agut, M.; Nonell, S.; Torres, T.; Kostianen, M. A.; de la Escosura, A. Photoantimicrobial Biohybrids by Supramolecular Immobilization of Cationic Phthalocyanines onto Cellulose Nanocrystals. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 4320–4326.
- (13) Yin, R.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22* (18), 2159–2185.
- (14) Velkov, T.; Roberts, K. D.; Thompson, P. E.; Li, J. Polymyxins: A New Hope in Combating Gram-Negative Superbugs? *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (10), 1017–1025.
- (15) Le Guern, F.; Sol, V.; Ouk, C.; Arnoux, P.; Frochot, C.; Ouk, T.-S. Enhanced Photobactericidal and Targeting Properties of a Cationic Porphyrin Following Attachment of Polymyxin B. *Bioconjug. Chem.* **2017**. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00516
- (16) Zavascki, A. P.; Goldani, L. Z.; Li, J.; Nation, R. L. Polymyxin B for the Treatment of Multidrug-Resistant Pathogens: A Critical Review. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60* (6), 1206–1215.

- (17) Caruso, E.; Banfi, S.; Barbieri, P.; Leva, B.; Orlandi, V. T. Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Cationic BODIPY Photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, *114*, 44–51.
- (18) Velkov, T.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Li, J. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 1898–1916.
- (19) Tsubery, H.; Ofek, I.; Cohen, S.; Fridkin, M. Structure-Function Studies of Polymyxin B Nonapeptide: Implications to Sensitization of Gram-Negative Bacteria. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (16), 3085–3092.
- (20) Liao, S.-Y.; Ong, G.-T.; Wang, K.-T.; Wu, S.-H. Conformation of Polymyxin B Analogs in DMSO from NMR Spectra and Molecular Modeling. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1252* (2), 312–320.
- (21) Thomas, C. J.; Surolia, A. Kinetics of the Interaction of Endotoxin with Polymyxin B and Its Analogs: A Surface Plasmon Resonance Analysis. *FEBS Lett.* **1999**, *445* (2–3), 420–424.
- (22) Chihara, S.; Ito, A.; Yahata, M.; Tobita, T.; Koyama, Y. Chemical Synthesis, Isolation and Characterization of α -N-Fattyacyl Colistin Nonapeptide with Special Reference to the Correlation between Antimicrobial Activity and Carbon Number of Fattyacyl Moiety. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, *38* (3), 521–529.
- (23) Witzke, N. M.; Heding, H. Broad-Spectrum Derivatives of Polymyxin B and Colistin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1976**, *29* (12), 1349–1350.
- (24) Weinstein, J.; Afonso, A.; Moss, E.; Miller, G. H. Selective Chemical Modifications of Polymyxin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (23), 3391–3396.

II.3. Informations supplémentaires

II.3.1. Synthèse de **5Lys**

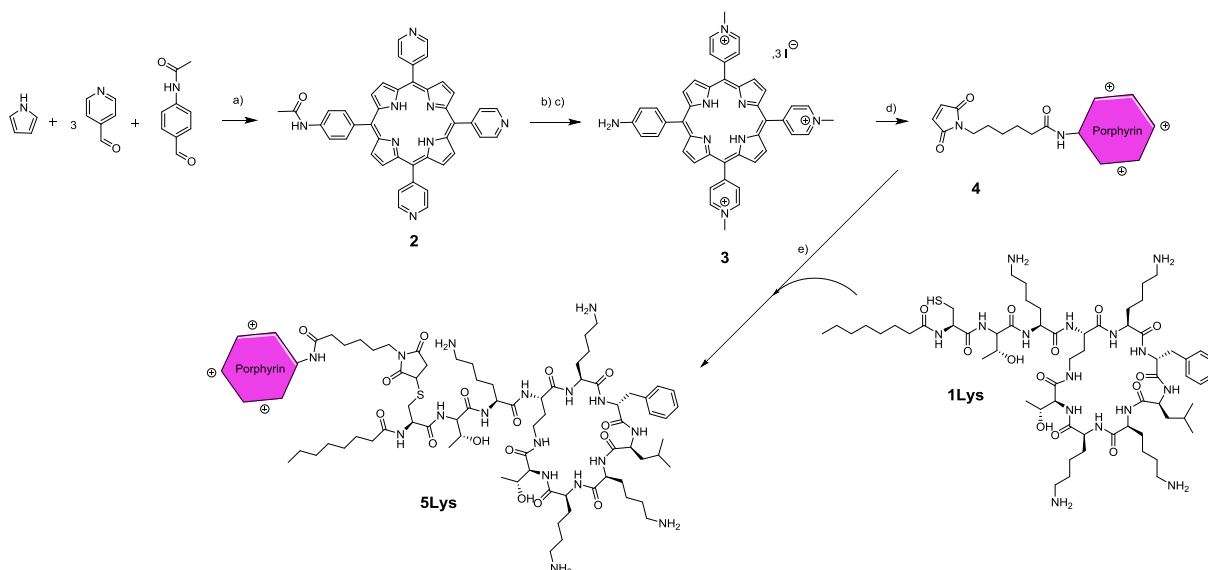


Figure 121 (S1). Synthetic route of **5Lys** based on the previous work (Le Guern et al., 2017). a) Propionic acid, 3 h, 140 °C. b) Iodométhane, anhydrous DMF, 1 h, 140 °C. c) 25% TFA/H₂O, 5 h, 100 °C. d) 6-maleimido-hexanoic acid, HCTU, DIEA, anhydrous DMF, 24 h, RT. e) PBS pH 6.5, 24 h, RT.

II.3.2. Analyses ^1H RMN et MS du peptide **1Lys**

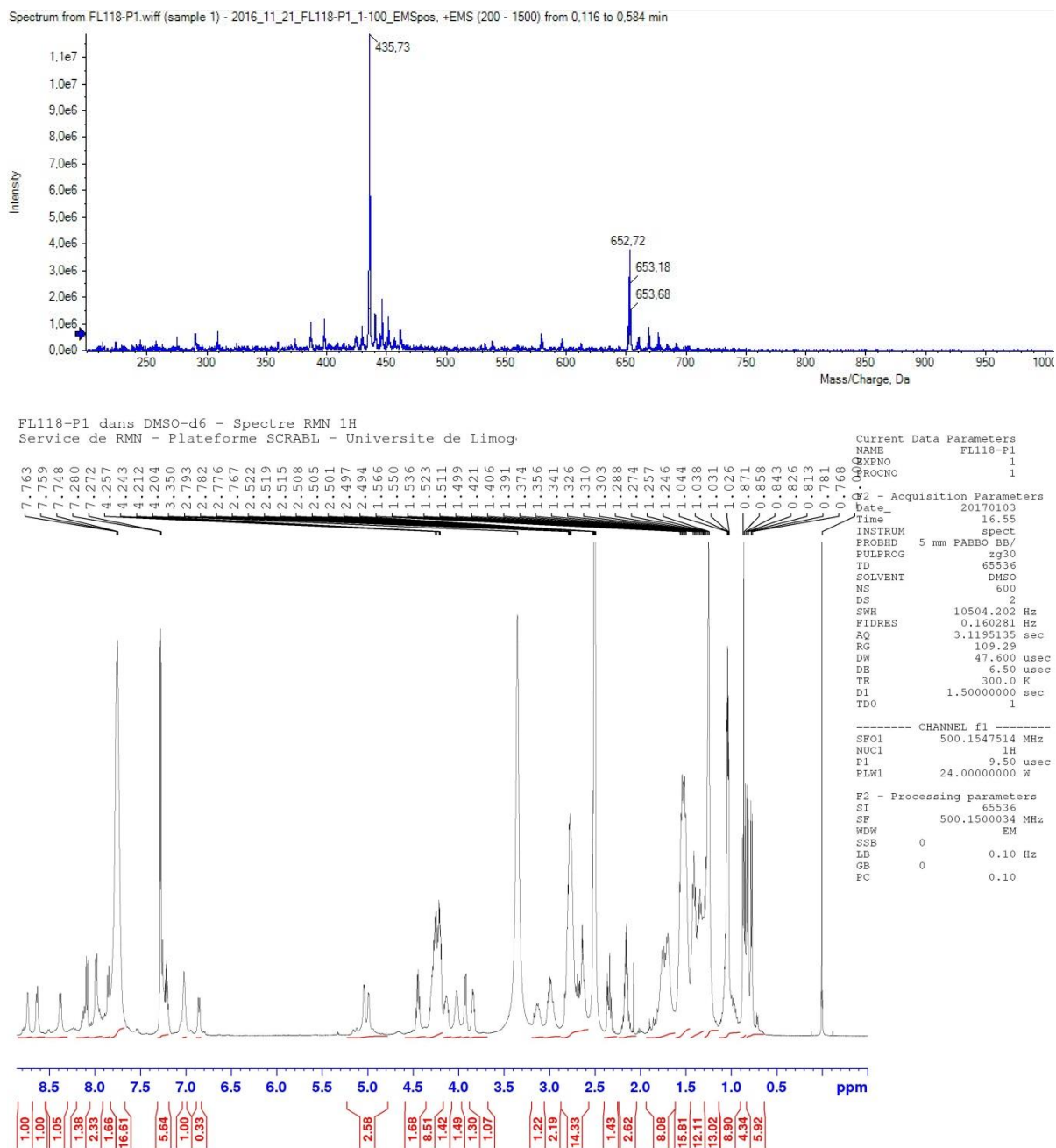


Figure 122 (S2). MS and ^1H NMR analysis of **1Lys** (in DMSO-d₆).

II.3.3. Analyse HRMS de composé conjugué **5Lys**

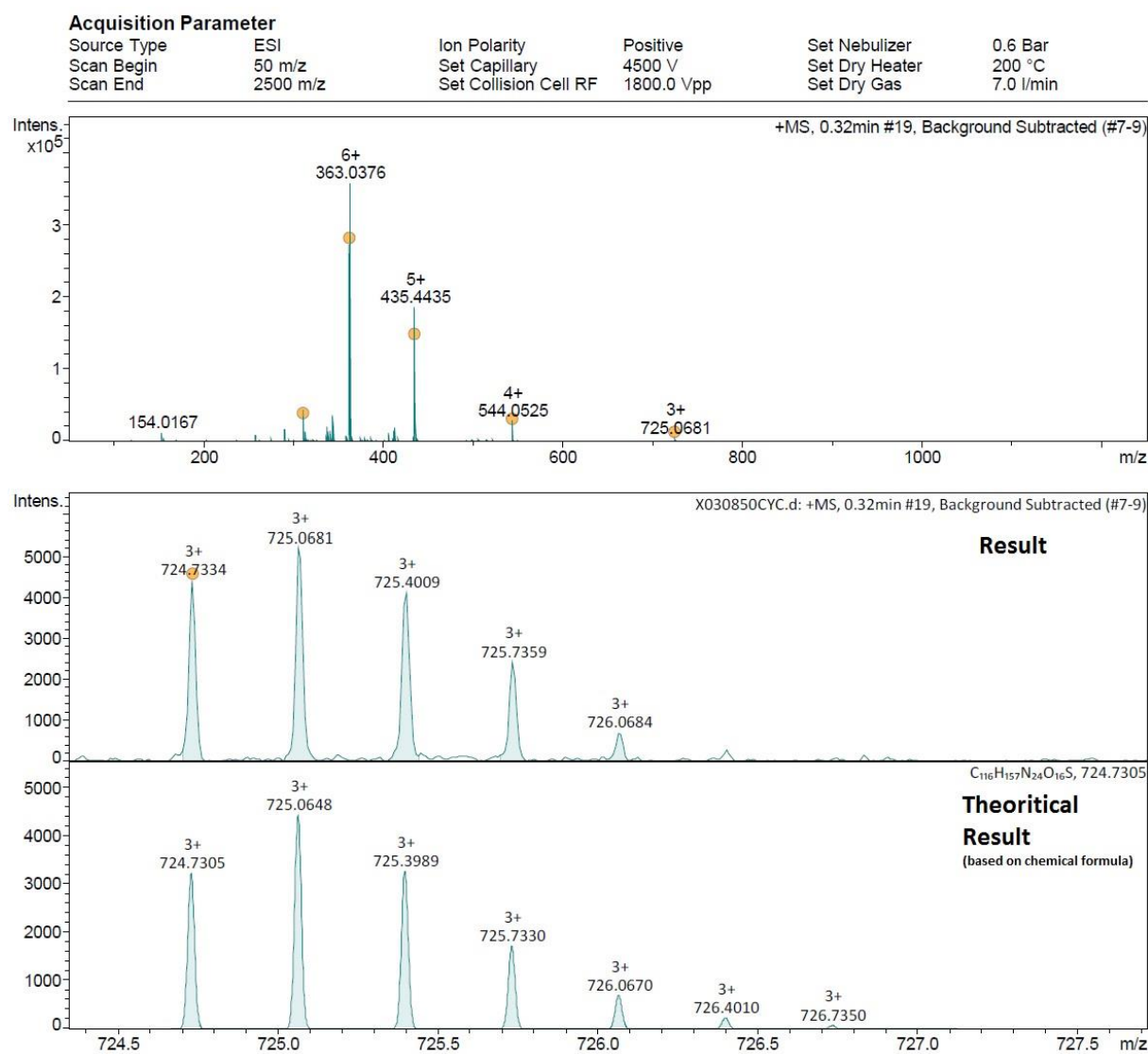


Figure 123 (S3). HRMS analysis of **5Lys**.

II.3.4. Analyse ^1H RMN de composé conjugué 5Lys

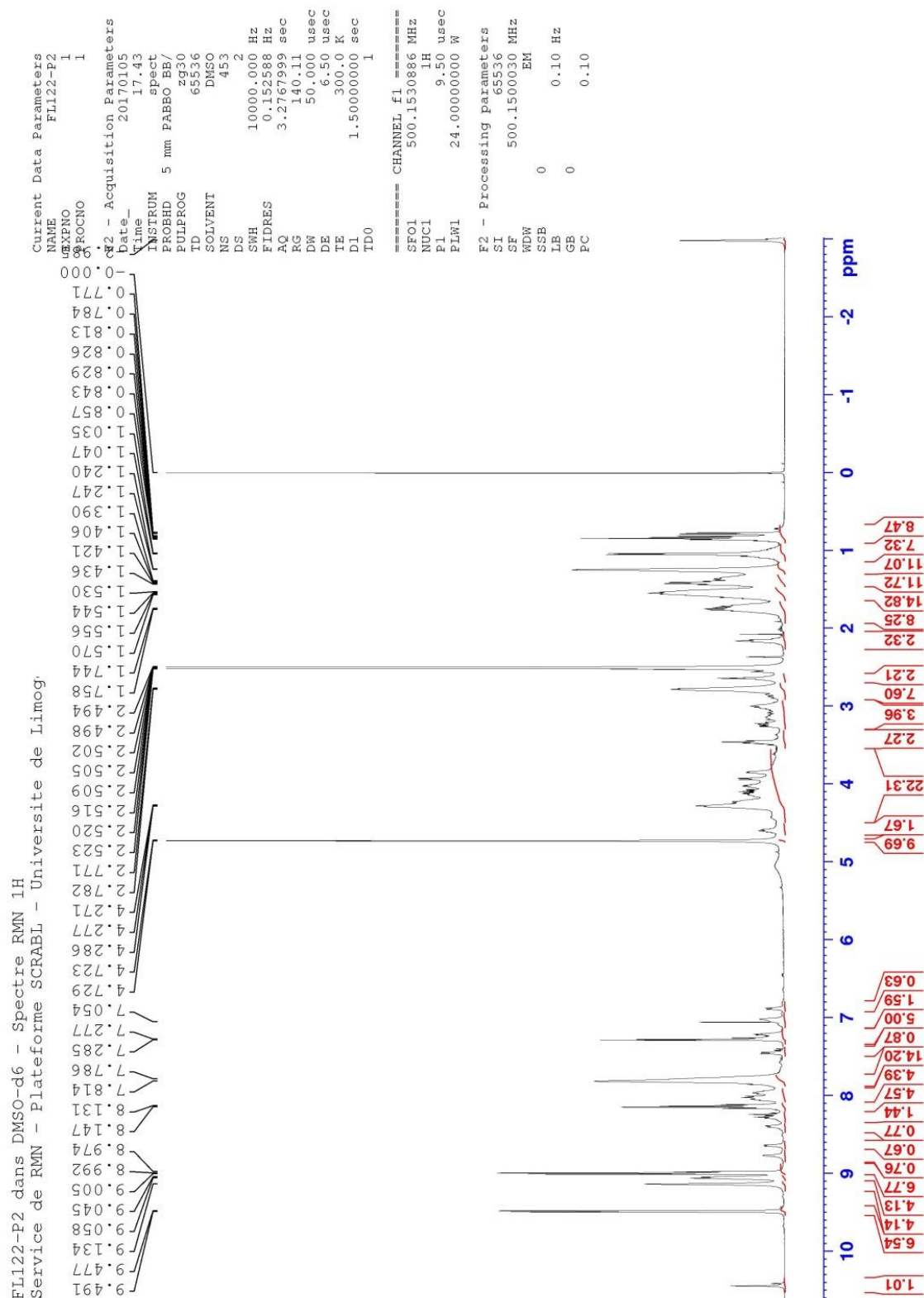


Figure 124 (S4). ^1H NMR analysis of 5Lys (in DMSO-d6).

II.3.1. Analyse ^1H COSY RMN de composé conjugué 5Lys

FL122-P2 dans DMSO-d6 - Spectre RMN 1H-1H COSY
Service de RMN - Plateforme SCRABL - Université de Limoges

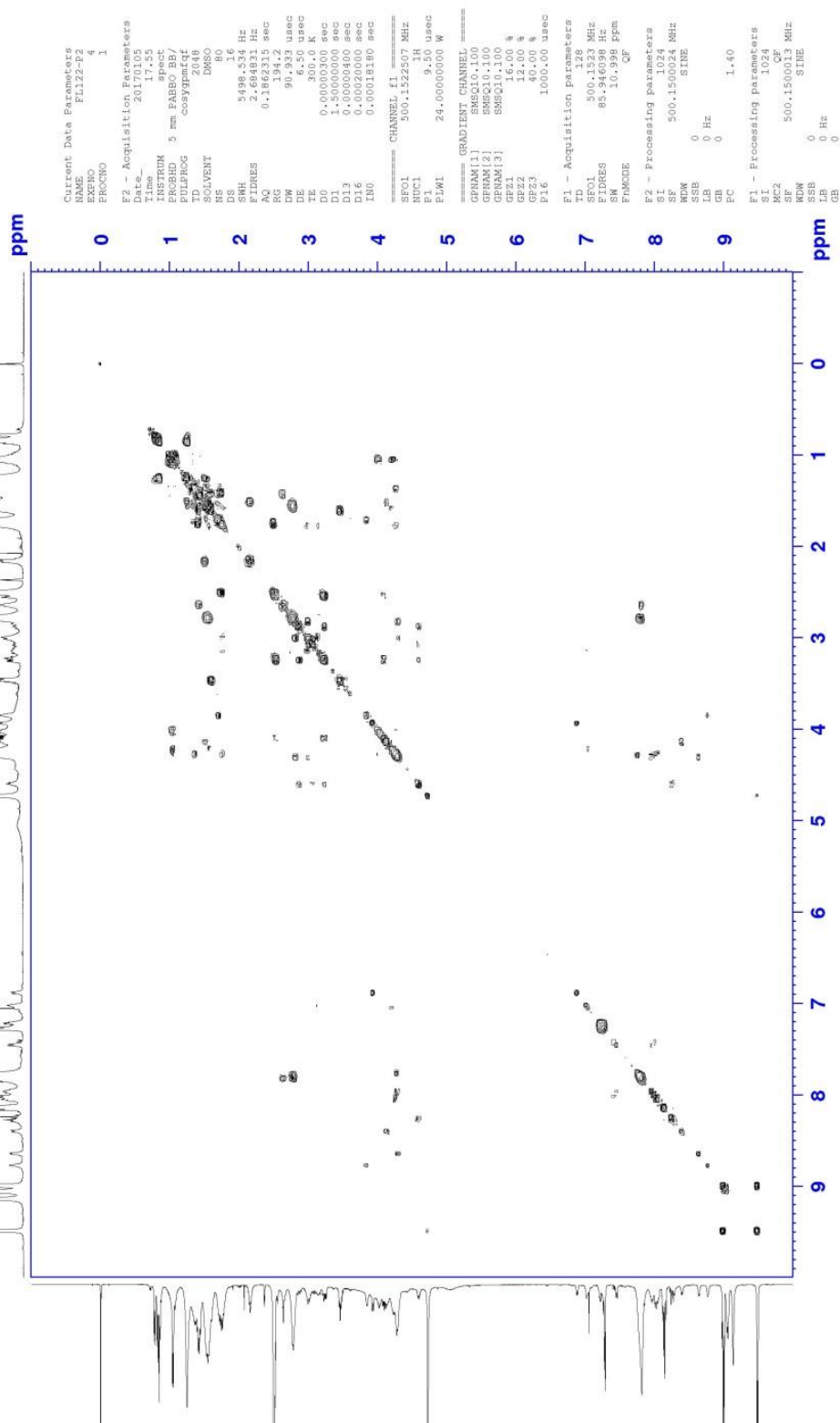


Figure 125 (S5). ^1H COSY NMR analysis of 5Lys (in DMSO-d6).

II.3.2. Analyse ^1H TOCSY RMN de composé conjugué **5Lys**



Figure 126 (S6). ^1H TOCSY NMR analysis of **5Lys** (in DMSO- d_6).

II.3.3. Spectres d'absorbance des composés **5Lys** et **5** dans le méthanol

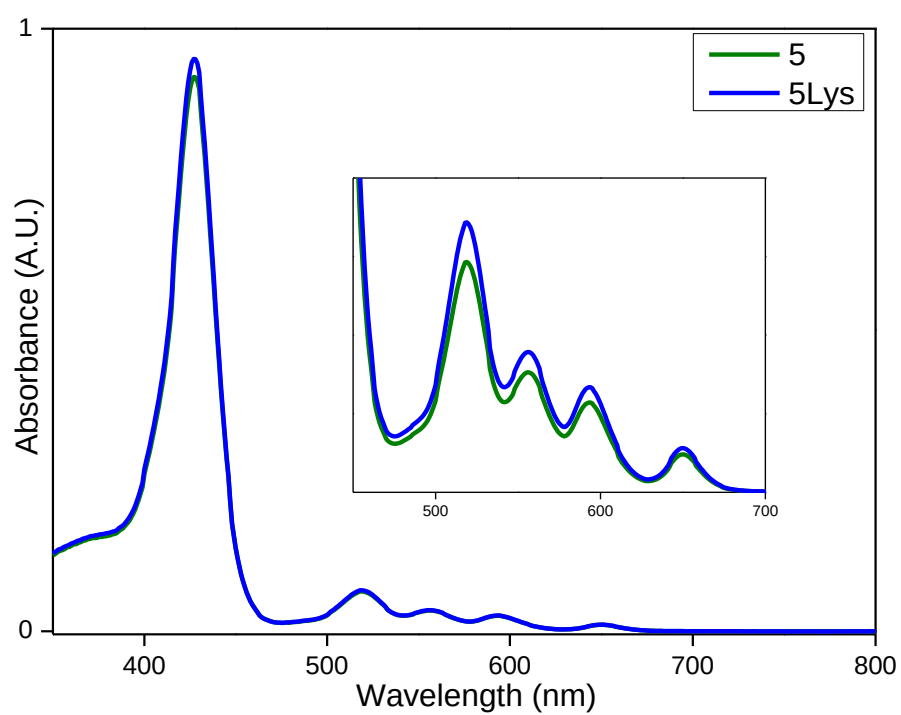


Figure 127 (S7). Absorbance spectra of **5Lys** and **5** in MeOH (4.3 μ M)

II.3.4. Propriétés photophysiques

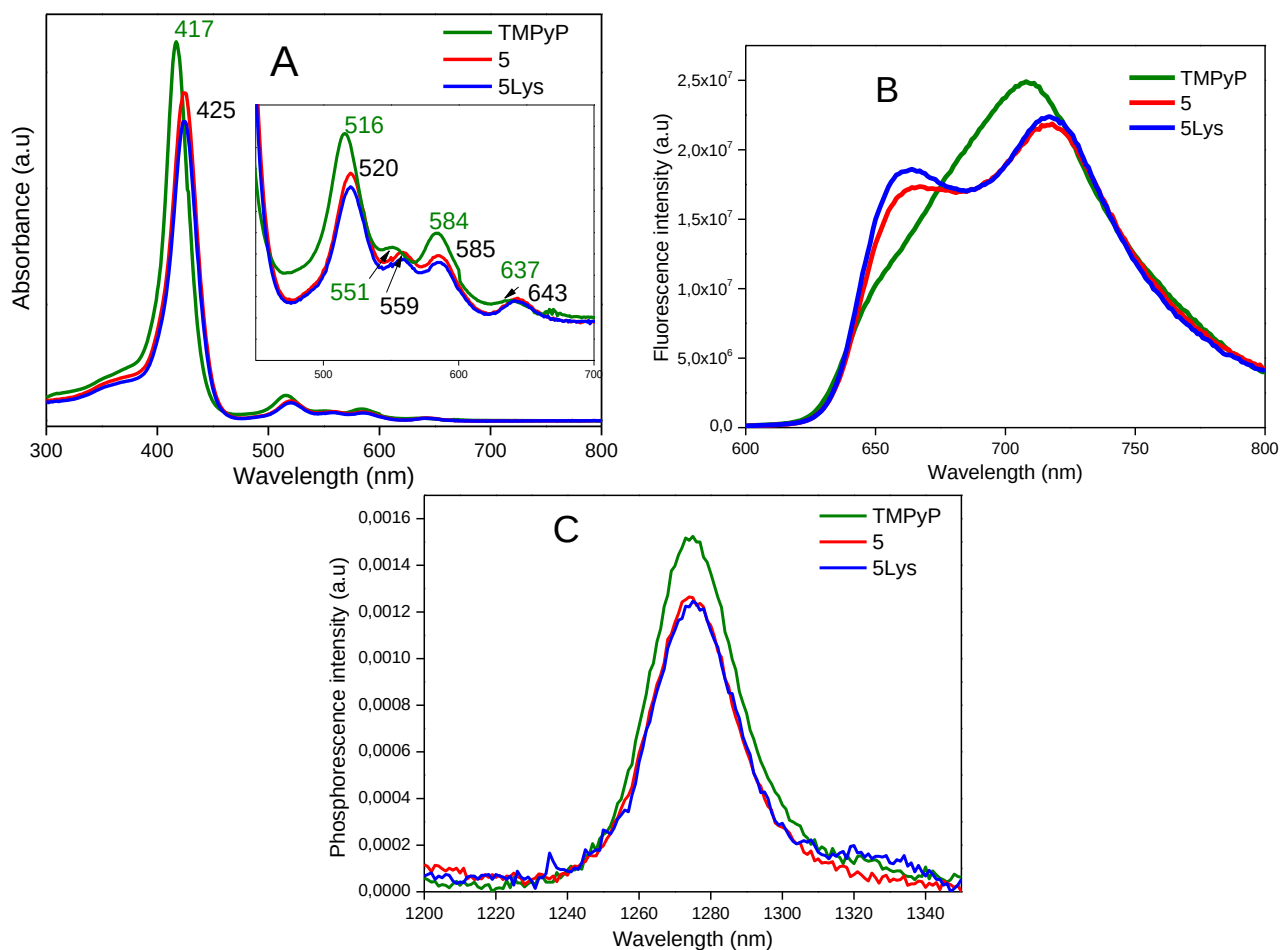


Figure 128 (S8). Absorption (A) ($[TMPyP] = 13.8 \mu M$, $[5] = 16 \mu M$, $[5Lys] = 16 \mu M$), fluorescence (B), and phosphorescence (C) spectra of **TMPyP**, **5** and **5Lys** in D_2O ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$, $A_{425} \sim 0.2$).

Table S1. Fluorescence and phosphorescence properties of conjugate **TMPyP**, **5** and **5Lys** in D_2O . ^aTPP as standard ($\Phi_F(\text{toluene}) = 0.11$) (Redmond and Gamlim, 1999), ^b**TMPyP** as standard ($\Phi_A(D_2O) = 0.90$) (Redmond and Gamlim, 1999), ^cLiterature value $\sim 67 \mu s$ in D_2O (Ogilby and Foot, 1983, Wilkinson et al., 1995). ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$).

compd	$\lambda_{F \text{ max}}$ (nm)	Φ_F^a	Φ_A	$\tau_F(\text{ns})$	$\tau_A(\mu s)^c$
TMPyP	708	0.06	0.90 ^b	6.1	69
5	717	0.07	0.79	5.2	65
5Lys	717	0.07	0.80	6.2	75

II.3.5. Microscopie confocal de NDHF seuls incubés avec 5Lys

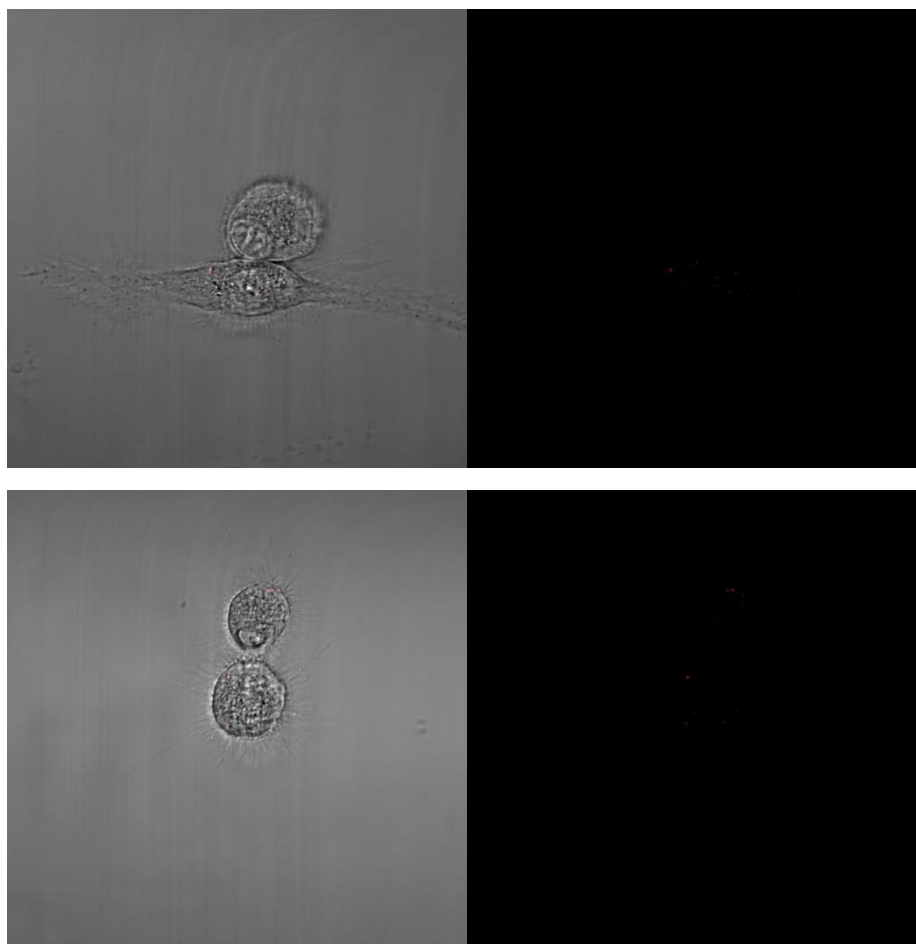


Figure 129 (S9). Confocal laser scanning microscopy imaging of NDHF after incubation with **5Lys**. Cells were suspended in a solution of **5Lys** (1 μ M) for 30 min at 37 °C, then washed 3 times with PBS.

II.3.6. Cytotoxicité de 5Lys

IC_{50} (μ M)	NDHF	
	Light	Dark
1Lys	-	-
5	0.156	-
5Lys	0.156	-

Table S2. IC_{50} (μ M) of the different molecules after light irradiation (white LED, 35 J/cm²) and in the dark. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay protocol was performed to determinate these concentrations.

II.3.7. Microscopie confocale supplémentaire de NDHF et de bactéries incubées au contact de 5Lys

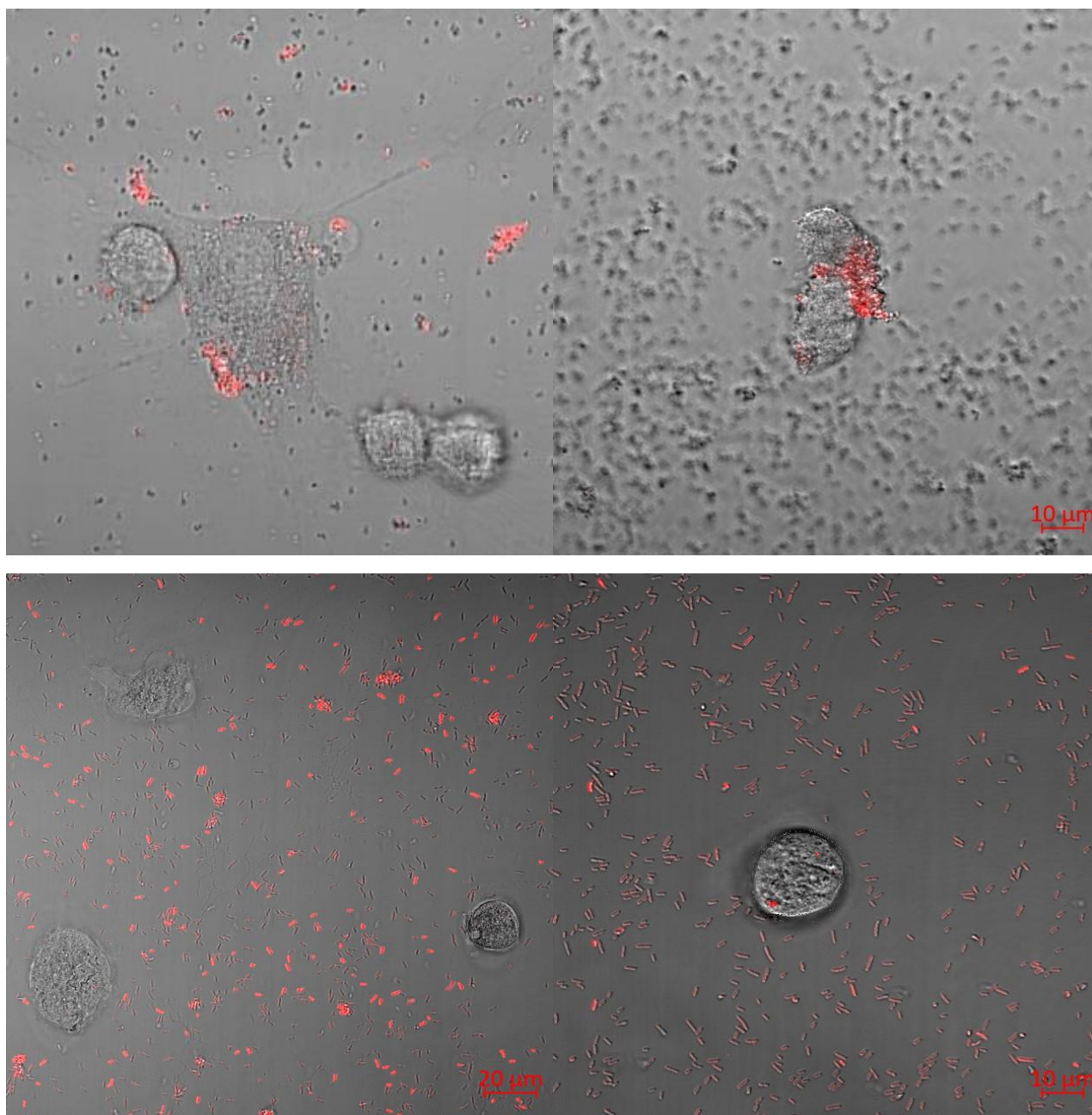


Figure 130 (S10). Additional confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF and bacteria (*S. aureus* and *P. aeruginosa*) after incubation with **5Lys**. Cells were suspended in a solution of **5Lys** (1 μM) for 30 min at 37 °C, then washed 3 times with PBS.

II.4. Résumé et conclusion

En se basant sur les protocoles de l'étude précédente, le composé **5Lys** a été synthétisé. Le remplacement des *L-Dab* par des lysines ne modifie pas les propriétés photophysiques du composé. Néanmoins, en accord avec la littérature, l'interaction entre le peptide et le lipide A des bactéries Gram négatif n'est plus assurée à cause de la conséquente modification de la structure primaire.

Le composé conjugué a montré une efficacité accrue sur *S. aureus* sous irradiation lumineuse. Ce résultat était attendu, car nous avons émis l'hypothèse que cette efficacité était probablement due à la charge cationique du composé, identique à celle du composé **5**. Conformément à nos attentes, le peptide **1Lys** a montré une très faible efficacité contre les bactéries Gram négatif (50 μ M pour *E. coli*, et aucune activité pour *P. aeruginosa*). D'après la littérature, la perte d'efficacité des polymyxines peut être attribuée soit à un manque d'interaction du peptide pour le lipide A ou soit à l'abandon de sa capacité à ouvrir la paroi bactérienne. Néanmoins, le conjugué **5Lys** a montré de très bons résultats sous irradiation lumineuse. Alors que le peptide seul ne présente aucune activité, la CMB du composé sur *P. aeruginosa* est plus faible que celle des porphyrines classiques. Un résultat similaire fut également observé lors des essais sur *E. coli*, où la CMB du nouveau composé **5Lys** est assez proche de celle du composé **5**. Ainsi, malgré la très faible activité de la partie peptidique, un effet synergique fut de nouveau observé sous irradiation lumineuse.

Les analyses en cytométrie en flux et en microscopie confocale ont été réalisées afin de mieux comprendre le rôle de la partie peptidique. Contrairement au composé **5**, le conjugué **5Lys** semble avoir une interaction stable avec *S. aureus*, qui ne peut pas être uniquement due à la charge cationique. De précédentes études ont montré que certaines modifications dans la structure de la polymyxine (diminution de la charge ou augmentation de l'hydrophobie) pouvaient entraîner un effet bactéricide chez certaines souches Gram positif. Malheureusement dans notre cas, le peptide **1Lys** (de même que **5Lys** à l'obscurité) n'a montré aucune efficacité sur *S. aureus*. Cette modification de structure semble permettre une interaction stable pour cette souche, sans forcément induire de mort bactérienne. D'autre part, cette étude a montré des résultats très prometteurs sur les souches Gram négatif. Malgré une interaction moins forte que **5**, le composé **5Lys** a encore la capacité d'interagir sélectivement et de fragiliser la membrane de ces souches. Alors que la modification de structure a permis de fortement réduire l'activité antibactérienne du peptide (notamment sur *P. aeruginosa*), le composé **5Lys** a de nouveau une forte affinité pour les bactéries Gram négatif. Malheureusement, la modification importante de structure rend l'interprétation des résultats difficile, car de nouveaux mécanismes inconnus peuvent maintenant être la cause de telles observations.

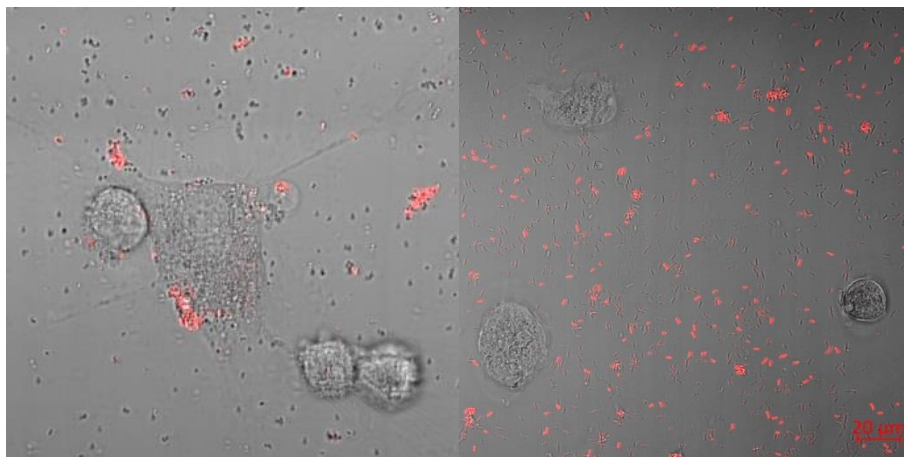


Figure 131. Images en microscopie confocale de mélanges de bactéries (*S. aureus* à gauche et *P. aeruginosa* à droite) et de fibroblastes, après contact avec le composé **5Lys** (40X).

Néanmoins, sur le plan de la thérapie photodynamique antimicrobienne, ce composé **5Lys** a montré une efficacité accrue et une sélectivité prometteuse, avec une très faible activité antibiotique. Un tel composé offre une opportunité unique d'examiner les limites de la résistance à l'aPDT. En effet, alors qu'aucune résistance à l'aPDT n'a pour l'instant été observée, un potentiel établissement n'est pas inconcevable.²⁶⁷ De plus, une incertitude persiste à propos du développement d'une résistance face à un photosensibilisateur vectorisé tel que **5Lys**, car l'effet bactéricide n'est pas induit par le vecteur mais par la production de ROS. Ainsi ce composé **5Lys** devrait permettre obtenir une réponse, sachant que si l'établissement d'une résistance apparaît être compliquée, ce genre de composé pourrait largement être utilisé pour traiter des infections bactériennes.

Chapitre 5 : Amélioration de l'activité photobactéricide de la chlorine-e6 fixée sur des nanocristaux de cellulose par greffage de la polymyxine B

Dans ce chapitre, de nouveaux nanocristaux photobactéricides ont été mis au point et étudiés dans le but d'obtenir un support efficace à large spectre d'activité antimicrobienne, associant l'aPDT et la prophylaxie antibiotique. Nous proposons un résumé des différents matériaux antibactériens actuels pour mieux comprendre les enjeux de nouvelles surfaces efficaces.

I. Etat de l'art sur les surfaces bactéricides

Afin de prévenir les infections bactériennes, différentes surfaces ont été développées permettant de stériliser l'environnement des sujets susceptibles d'être la cible de contaminations ²⁶⁸. Ces contaminations, dont certaines sont à l'origine d'infections nosocomiales, coûtent des millions d'euros de prise en charge chaque année et entraînent également de nombreux décès.³ La création de telles surfaces antimicrobiennes résulte de la volonté de limiter la propagation des bactéries. De plus, l'élaboration de telles surfaces peut aussi permettre la transposition de certaines technicités pour de nouvelles applications médicales, telles que les nanoparticules incluses au sein de gel pour des traitements directs ²⁶⁹ ou d'implants préalablement activés pour stériliser les greffes ²⁷⁰. Etant donné le contexte et la problématique de plus en plus présente, à cause de l'émergence des souches résistantes, une large variété de concepts et d'approches ont vu le jour ces dernières années pour permettre la création de ces nouvelles surfaces antimicrobiennes. A partir de cet ensemble de travaux, nous nous proposons d'extraire et de résumer les grandes stratégies. Malheureusement, la plupart des études énumérées n'offrent que des résultats précliniques et l'absence d'essais à grande échelle ne permet pas de les comparer et d'en favoriser une particulièrement.

I.1. Les surfaces non-adhésives

Ces surfaces ne sont pas bactéricides. Les matériaux antiadhésifs permettent d'empêcher l'adhésion des bactéries sur ces surfaces. Afin de développer ces matériaux, les chercheurs ont étudié les différents sites d'accroches bactériens et mis en avant l'existence d'une fixation passive commune (due aux interactions physico-chimiques) à toutes les espèces, puis de structures d'accroches spécifiques selon les souches, telles que les adhésines bactériennes.^{271,272} Malheureusement, l'adhésion bactérienne a montré de nombreux facteurs d'influence comme la morphométrie et les propriétés physico-chimiques de la surface, les paramètres environnementaux et évidemment la bactérie elle-même. Ces différents facteurs rendent difficiles l'élaboration d'une surface antiadhésive universelle. Parmi les paramètres environnementaux, la concentration en protéines au contact des surfaces joue un rôle essentiel car un film protéique peut se former sur les matériaux ce qui facilite les accroches bactériennes.²⁷³ Des résultats prometteurs ont été obtenus à partir de surface poly-anionique à base de revêtement polymérique à partir d'héparine²⁷⁴, polyéthylène glycol²⁷⁵, poly(oxychlorure de phosphore)²⁷⁶ ou encore de nitrure de silicium.²⁷⁷ En plus de ces modifications chimiques, l'étude de la morphométrie du verre a permis de mettre en avant différents comportements bactériens selon la porosité de ce dernier.²⁷⁸ Etant donné la complexité de la création d'une surface antiadhésive, les résultats sont encore limités.

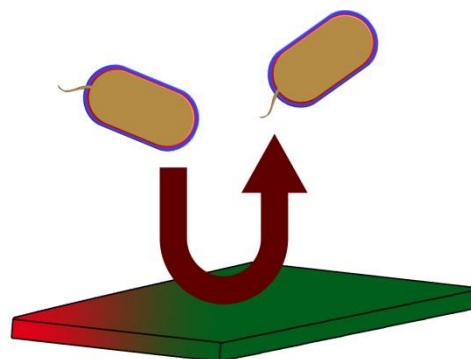


Figure 132. Schématisation d'une surface antiadhésive.

I.2. Les matériaux intrinsèquement antibactériens

L'ensemble de ces matériaux ont la propriété d'être bactéricide, sans aucune modification ou revêtement. Les surfaces métalliques, à base de fer, de zinc, de cuivre ou d'alliages sont les composés les plus connus, mais certains polymères et verres²⁷⁹ y sont aussi inclus tel que le chitosan²⁸⁰. L'effet bactéricide des métaux est induit par différents mécanismes. Parmi tous ces processus, des études ont montré que le fer avait la capacité d'inhiber certaines enzymes incluses dans le cycle respiratoire des bactéries.²⁸¹ L'effet bactéricide des métaux est généralement associé aux ions métalliques (Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , etc.) qui permettraient de dénaturer la membrane bactérienne.²⁸² Cependant, l'utilisation de métaux bruts en tant que surface bactéricide est actuellement très limitée car ces derniers se corrodent vite et relarguent des ions responsables d'une toxicité environnante. Afin de pouvoir utiliser le caractère bactéricide des éléments métalliques et réduire leur toxicité, des études proposent de les inclure au sein de formulations ou de revêtements, notamment à partir de micro ou nanoparticules. Ainsi des surfaces bactéricides basées sur ces études ont permis l'élaboration de nouveaux revêtements sur des cathéters ou de pansements. Cependant, ces inventions sont sujets à quelques polémiques vis à vis du caractère toxique de ces particules²⁸³ et de la répercussion de l'utilisation de ces métaux dans les eaux usées.

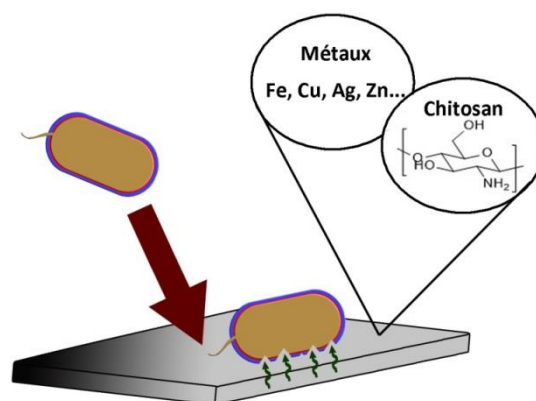


Figure 133. Schématisation d'une surface intrinsèquement bactéricide.

I.3. Les revêtements bactéricides

De nombreuses études se sont intéressées à la création de revêtements efficaces à appliquer sur des matériaux ayant les propriétés physiques souhaitées (durabilité, stabilité, inoffensive, etc.). Hormis les revêtements basés sur l'aPDT qui feront l'objet d'une attention particulière (Chapitre 5.II, page 159), nous proposons ici une liste non-exhaustive de différentes stratégies de revêtement.

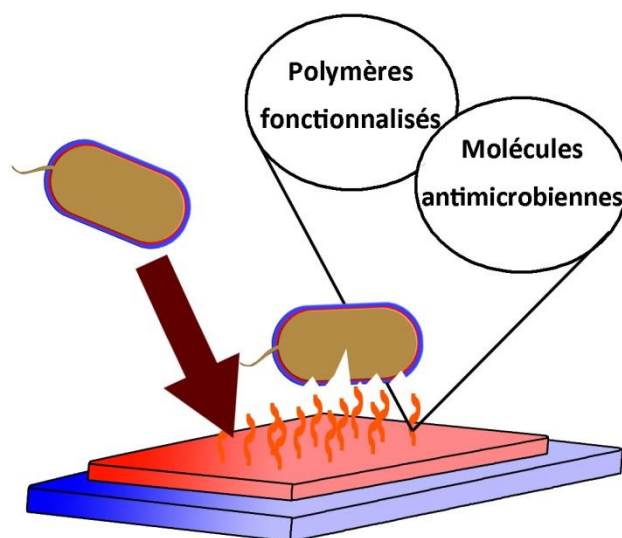


Figure 134. Principe du revêtement antibactérien.

1.3.1. Fixation de molécules antimicrobiennes

Différentes catégories de molécules ont été greffées de façon covalente à des revêtements afin de conférer des propriétés bactéricides. Parmi ces dernières, nous pouvons citer des antiseptiques déjà présents dans le commerce tel que le triclosan²⁸⁴⁻²⁸⁶, la chlorhexidine^{285,287} et le chlorure de benzalkonium.²⁸⁸ L'intérêt que suscitent ces surfaces, a été atténué par la mauvaise réputation de certains de ces antiseptiques, notamment le triclosan qui est maintenant reconnu comme un perturbateur endocrinien.

Des fragments antibiotiques pouvant être de nature peptidique ont été utilisés pour recouvrir des surfaces.^{289,290} Evidemment, les avantages et les inconvénients de ces matériaux sont directement reliés aux propriétés de ces antibiotiques. Ainsi, à cause de la courte durée de vie de ces composés et du risque engendré par l'apparition des souches résistantes, très peu d'applications ont été actuellement envisagées.

Parmi ces études, Mohorcic et coll.²⁹¹ ont mis en avant l'efficacité de polymyxines B greffées sur un revêtement à base de silane. A partir d'un verre inerte et après plusieurs traitements afin d'établir un revêtement comportant des fonctions silanes et des cycles époxydes à la surface, des molécules de polymyxines B ont été fixées. Lors d'essais *in vitro*, la surface a eu un impact direct sur une culture d'*Escherichia coli* après 24h d'incubation. Il est important de remarquer que cette efficacité est néanmoins bien plus faible par rapport au peptide sous sa forme libre.

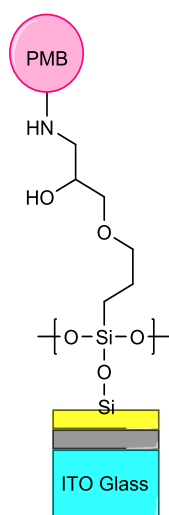


Figure 135. Polymyxine B greffée sur un support solide d'après Mohorcic et coll.²⁹¹

1.3.2. Revêtement polymérique fonctionnalisé

A l'instar des PS en aPDT, les polymères utilisés au sein de certains revêtements présentent des charges cationiques importantes. Une fois encore, les sels d'ammonium ont montré un fort potentiel antibactérien en adéquation avec les études préliminaires.²⁹² Ainsi, les polymères présentant des sels d'ammonium permettent un revêtement efficace et durable.²⁹³⁻²⁹⁶ Les bactéries rentrant au contact de ces surfaces, sont éliminées à cause d'un choc électrostatique entre la charge cationique élevée de ces surfaces et la tendance anionique des parois bactériennes. Le greffage covalent de ces polymères cationiques permet à ces revêtements de perdurer dans le temps et d'éviter un phénomène de relargage. Ces surfaces illustrent encore une fois l'utilité des fonctions

ammoniums à des fins bactéricides, de la même façon que les sels compris dans les détergents ou des groupes pyridinium constituant les porphyrines précédemment citées.

En 2002, Cen et coll.²⁹⁷ ont modifié de la cellulose en greffant des polymères à base de vinylpyridinium, après un traitement au plasma qui avait pour but de créer des fonctions peroxydes (Figure 136 .A). Cette cellulose modifiée pourrait permettre la création de tissu ayant la capacité d'inhiber les souches d'*Escherichia coli* au contact. Abel et coll.²⁹⁸ modifièrent aussi une surface à base de carbohydrate afin d'y substituer des groupements DABCO (1,4-diazobicyclo[2.2.2]octane) portant deux charges cationiques et des chaînes lipophiles (Figure 136 .B). Ils mirent en avant l'efficacité contre plusieurs souches bactériennes d'un composé portant une chaîne hexadecane. Les travaux de Lin et coll.²⁹⁹ établirent une corrélation entre l'activité antibactérienne et la taille de polyéthylèneimine greffée sur de la cellulose. En 2012, Palermo et coll.³⁰⁰ ont reporté l'efficacité large spectre d'un copolymère à base de méthacrylate (Figure 136 .C). Ce copolymère comporte des chaînes latérales hydrophiles de type 4-aminobutylene et hydrophobes de type méthacrylate d'éthyle. Cette étude a montré que l'efficacité et la cytotoxicité de ce genre de composé étaient proportionnelles à la longueur des chaînes hydrophiles. Ainsi, le compromis optimal fut obtenu avec les chaînes de 4 carbones. Des résultats prometteurs ont été obtenus sur plusieurs souches bactériennes, dont MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Parmi ces différents exemples, deux phénomènes furent conjointement admis : l'activité antibactérienne est reliée à la densité cationique³⁰¹ et à la longueur des différentes chaînes sur les surfaces.

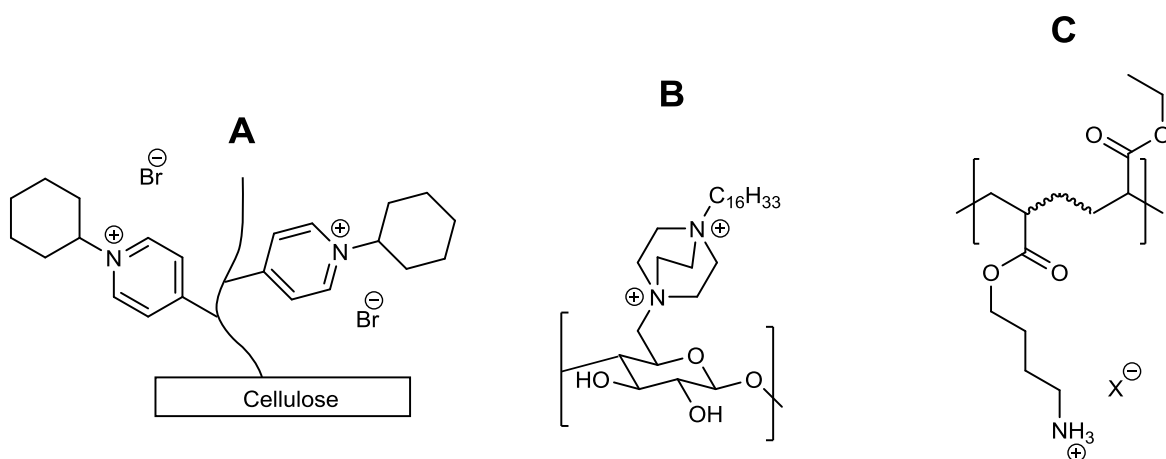


Figure 136. Différentes surfaces cationiques antibactériennes d'après A : Cen et coll.²⁹⁷ B : Abel et coll.²⁹⁸ C : Palermo et coll.³⁰⁰

Une autre famille de polymère à base de *N*-halamine a montré des résultats prometteurs. De par son instabilité, la liaison *N*-halamine (R_2N-Cl) se brise pour former une liaison R_2N-H et un atome de chlore cationique. Ce dernier est une espèce très réactive pouvant engendrer des transformations dans le système enzymatique et métabolique, entraînant la mort de la bactérie. Les *N*-halamines peuvent être régénérées par la chloration du composé comportant la liaison $N-H$, ainsi les matériaux reposant sur ces fonctions peuvent être récupérés et réactivés après utilisation. Selon les fonctions en alpha de la liaison *N*-halamine, cette dernière est plus ou moins stable, et donc inversement plus ou moins actif (stabilité : amine > amide > imide). Découverte et étudiée à partir de 1976, la fonction *N*-halamine a surtout été utilisée pour le traitement des eaux.

En 2007, Cao et coll.³⁰² ont modifié directement du chitosan par un blanchiment au chlore afin de créer les fonctions *N*-halamines (Figure 137 .A). Ce polymère modifié a permis d'inhiber la croissance des souches d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* pendant 1 mois lors d'essais *in vitro*. Après ce temps, l'efficacité a pu être obtenue de nouveau après un nouveau traitement. Liang et coll.³⁰³ préparèrent de la cellulose activée grâce à l'utilisation d'un nouveau précurseur portant une fonction époxyde (Figure 137 .B). En plus de bons résultats sur les souches habituelles, l'utilisation d'un tel précurseur est adaptable à grande échelle. En 2008, Luo et coll.³⁰⁴ ont successivement traité des tubes de polypropylène afin de recouvrir la surface de *N*-halamines permettant d'inhiber la croissance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* contenues dans un flux continu (Figure 137 .C).

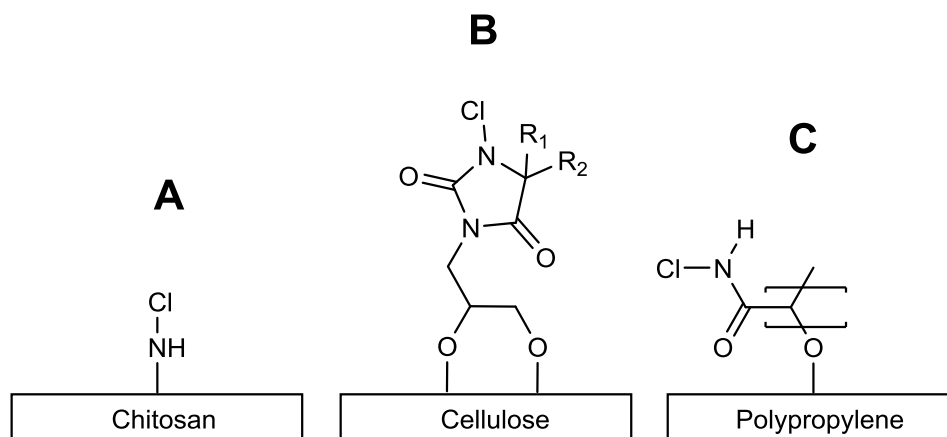


Figure 137. Exemples de surfaces actives à base de *N*-halamine selon A : Cao et coll.³⁰² B : Liang et coll.³⁰³ C : Luo et coll.³⁰⁴

1.3.3. Relargage d'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule naturellement bactéricide à faible durée de vie possédant un caractère pléiotropique.³⁰⁵ Cette molécule est déjà présente dans le système immunitaire car elle est notamment produite par certains leucocytes lors de la réponse innée. Ce composé fait l'objet de nombreuses études étant donné son pouvoir cytotoxique exceptionnel à des concentrations de l'ordre du picomolaire à nanomolaire. Malheureusement, sa grande efficacité pose un problème de contrôle et la plupart des travaux ont pour objectif de formuler des plateformes ou « véhicules », permettant de délivrer l'oxyde nitrique vers la cible. Cette molécule semblerait adéquate à la création de surface bactéricide. Ainsi, des matériaux ont été développés en utilisant des molécules qui relarguent chimiquement des NO (appelées « NO-donor »). Parmi ces dernières, nous pouvons citer les diazeniumdiolates^{306,307} ou les *S*-nitrosothiols.³⁰⁸ Les études préliminaires ont montré de bons résultats en termes de stérilisation de greffe.

En 2009, Riccio et coll.³⁰⁸ transcrivent la préparation d'un film xerogel, matériau à réseau macromoléculaire d'oxydes, à partir de 3-mercaptopropyltriméthoxysilane et méthyltriméthoxysilane comportant des fonctions *S*-nitrosothiols. En addition des bons résultats *in vitro* sur les bactéries, la cytotoxicité de ce film a été testée et ces essais ont montré que les fibroblastes ne sont pas sujets à un effet cytotoxique de la part d'un tel matériau. En 2012, Carpenter et coll.³⁰⁷ proposent la préparation de nanoparticules de silice ayant la particularité d'avoir des fonctions ammoniums et des groupements « NO-donor » à base de *N*-diazeniumdiolate. Cette étude montre que le relargage d'oxyde nitrique permet d'inhiber la croissance des souches de

Pseudomonas aeruginosa alors que les ammoniums ont uniquement un effet bactéricide sur *Staphylococcus aureus*. Ainsi, les nanoparticules regroupant les deux types de fonctions permettent d'obtenir un large spectre d'effet antimicrobien.

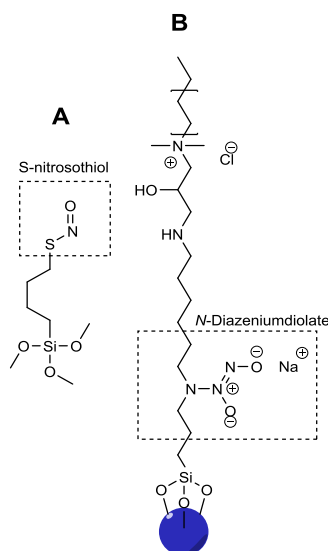


Figure 138. Utilisation de molécules "NO-donor" fixées à des fins bactéricides selon A : Riccio et coll.³⁰⁸ B : Carpenter et coll.³⁰⁷

1.3.4. Surface relarguant des molécules actives

Ces matériaux sont basés sur le relargage de produits actifs selon différents phénomènes physiques tels que la simple diffusion, l'érosion, la dégradation de matrices, ou l'hydrolyse de liaisons covalentes. Parmi ces molécules actives, on retrouve certains métaux (comme le fer), quelques antiseptiques (comme la chlorhexidine) et une grande quantité d'antibiotiques (Gentamicine, Vancomycine, etc.). A cause du caractère éphémère de cette stratégie, les surfaces étudiées ont pour unique objectif d'être transposées en tant que matériel médical, comme des pansements, des cathéters ou des implants. Pendant ces trois dernières décennies, les surfaces utilisant du fer ou de la chlorhexidine ont été sujets à quelques débats.^{309,310} En plus d'une efficacité très limitée dans le temps³¹¹, ces matériaux ont montré de nombreux effets secondaires.³¹² Les surfaces à base d'antibiotiques ont montré de meilleurs résultats. Malheureusement, le problème de l'émergence des résistances bactériennes a circonscrit ces recherches aux implants. Dans le cadre d'une greffe infectée par un biofilm bactérien, l'utilisation d'une nouvelle prothèse riche en antibiotique (après identification des souches) s'avère très utile afin de diffuser localement et continuellement le produit actif et de limiter sa concentration dans l'ensemble de l'organisme. Ainsi de nombreux antibiotiques (Rifampicine³¹³, Vancomycine³¹⁴, Gentamicine³¹⁵, etc.) ont été incorporés dans des surfaces. A l'instar de la prophylaxie antibiotique, les futures stratégies se basent sur l'utilisation de peptides antimicrobiens, étant donné leur origine immunologique. Evidemment, les problèmes associés à ces peptides (énumérés au Chapitre 1.III.4.4, page 28) demeureront pour ces futures études.

II. Les surfaces photobactéricides

Ces matériaux ont comme particularité d'induire un effet bactéricide sous l'influence d'une irradiation lumineuse. En plus des revêtements à base de photosensibilisateurs (qui seront étudiés en II.1), certains composés métalliques ont montré de très bons résultats, comme l'oxyde de titane³¹⁶ et les complexes de ruthénium. Après une irradiation à 385 nm, l'oxyde de titane est capable d'induire des dommages aux membranes par peroxydation des lipides, et donc d'engendrer une efficacité contre un large variété de bactéries, des champignons et des virus.³¹⁷ En plus d'être potentiellement adaptable pour le secteur médical, les études sur le titane d'oxyde ont montré que leur utilisation en tant que nanoparticule engendre plus d'efficacité que sous forme de film, par une augmentation de la surface de contact.^{318,319} Parmi ces études, un alliage à base d'argent (Ag-TiO₂) s'est distingué par des bons résultats obtenus après irradiation par une lumière visible.³²⁰ Les surfaces à base de ruthénium offrent aussi de prometteuses opportunités, car cet atome peut accueillir des ligands divers et variés, ce qui permet de moduler ce composé selon les besoins, tout en conservant ses propriétés photophysiques.

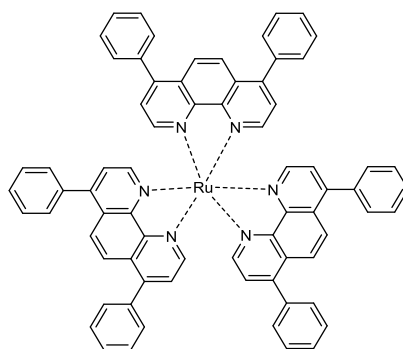


Figure 139. Complexe de ruthénium photobactéricide « RDP²⁺ » compris dans des cylindres de silicone, selon Jiméñez-Hernández et coll.³²¹

Afin de créer de nouvelles surfaces photobactéricides, l'intégration de photosensibilisateurs dans les stratégies de synthèse était *a fortiori* inévitable. En addition de l'utilité d'un tel composé en biologie, ce genre de surface offre aussi des opportunités dans le domaine de l'opto-électronique.³²² Ainsi, de nombreux travaux traitent de la création de matériau à base de photosensibilisateur. Les différentes surfaces photosensibles existantes se différencient selon le type de surface (nature ou forme) et de photosensibilisateurs (nature, dérivé, type de couplage, etc...). Nous proposons une liste non-exhaustive d'études utilisant les photosensibilisateurs qui ont été préalablement cités au chapitre 2.

II.1. Matériaux à base de PS non-tétrapyrroliques

Les premières surfaces photobactéricides à base de PS comprenaient des molécules non-tétrapyrroliques, dont les plus connues ont été citées dans la partie Chapitre 2.III.1 (page 42). Etant donné leurs implications dans le secteur médical, les PS de type phénothiazinium (Bleu de méthylène et Bleu de toluidine) sont de très bons candidats pour la création de tels matériaux. Ainsi, ils ont été incorporés au sein de structures à base de silice³²³⁻³²⁶, de polyuréthane^{327,328}, de polyéthylène³²⁹, d'acétate de cellulose³³⁰⁻³³², et de diverses plastiques couramment utilisés. Les polymères à base de silicone et de polyuréthane, possédant du bleu de méthylène, ont été étudiés par Perni et coll. Ils ont proposé d'inclure le PS grâce à l'utilisation des nanoparticules d'or dans la matrice du polymère. En

plus d'augmenter l'effet photobactéricide des surfaces en milieu clinique, ils ont montré que la petite taille de ces nanoparticules avait un rôle essentiel. Les autres études ont été réalisées en imprégnant simplement les phénothiaziniums sur les différents polymères, suivi de l'évaporation du solvant. L'ensemble de ces travaux ont montré des résultats satisfaisants sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* après une excitation lumineuse vers 600 nm, malgré le caractère transitionnel de cette activité, dû au relargage des produits actifs à cause du manque de liaison covalente.



Figure 140. Film de polyuréthane imprégné de bleu de méthylène par l'utilisation de nanoparticules d'or, selon Naik et coll.³²⁷

Dans les années 1970, le rose de Bengale fut le premier PS à être fixé sur un support. En effet, Schaap et coll.³³³ greffèrent de façon covalente du Rose de Bengale à un copolymère à base de styrène et de divinylbenzène (Résine de Merrifield) en 1975. Ils montrèrent qu'une fois fixé, le PS perdait en production d'oxygène singulet à cause d'une mauvaise diffusion. Bezman et coll.³³⁴ furent les premiers à activer des billes de polystyrène en plaçant ce PS à leur surface, et à montrer leur activité photobactéricide sur *Escherichia coli*. Avec la prolifération du polystyrène dans le commerce, la majorité des études utilisa ce support pour fixer les molécules de Rose de Bengale. D'autres se distinguèrent en utilisant des surfaces à base de nanoparticules de silice³³⁵, d'acétate de cellulose³³¹ par simple absorption ou de chitosan.^{162,336} Contrairement aux phénothiaziniums, le Rose de Bengale comporte un acide carboxylique et une fonction hydroxyle ce qui permet à ce PS d'être relié chimiquement à une surface, offrant ainsi des matériaux beaucoup plus stables dans la durée. Malheureusement, cette molécule est moins efficace sur les souches Gram négatif à cause de sa nature anionique. Ces dernières années, l'idée de greffer ce PS sur du chitosan, un polymère déjà connu pour ses propriétés bactéricides et portant des amines primaires libres, a permis d'améliorer l'effet photobactéricide de cette catégorie de surface.

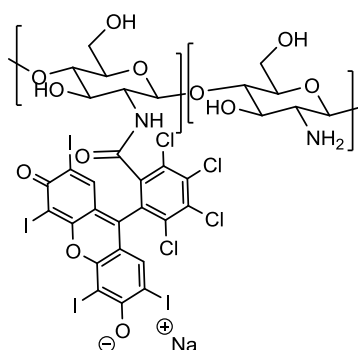


Figure 141. Nanoparticules de chitosan photobactéricides via le greffage covalent de rose de Bengale, selon Shrestha et coll.¹⁶²

II.2. Surface à base de PS tétrapyrroliques

Les PS tétrapyrroliques ont été énormément utilisés pour la création de nouvelles surfaces photobactéricides, notamment à cause de la possibilité de synthétiser ces derniers avec une grande variété de fonctions répondant aux différents besoins. Ainsi, des phtalocyanines ont été fixées sur des surfaces au cours des dernières années. En plus de résoudre le problème de solubilité de ces composés, dû à leur tendance à s'agglomérer, la fixation de phtalocyanines cationiques permet la création de surface photobactéricide efficace et durable, notamment en utilisant un dérivé proche de RLP068.³³⁷ Cependant, une étude montre que les phtalocyanines comportant un atome de zinc au centre sont moins stables que les porphyrines à base libre.³³⁸ En addition, la majorité des travaux, ayant pour but de fixer des photosensibilisateurs, utilise les porphyrines, car ces molécules regroupent de nombreux avantages, comme une synthèse modulable, une meilleure solubilité, une bonne efficacité et une stabilité dans le temps.

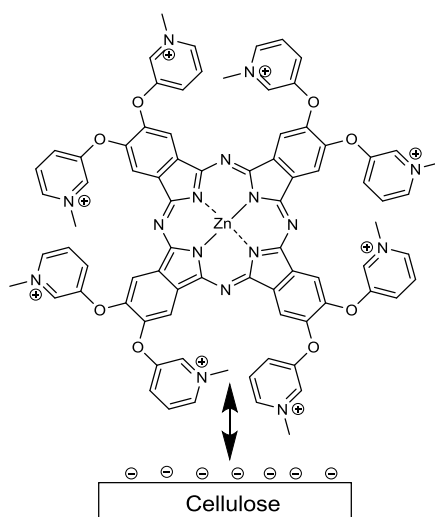


Figure 142. Nanocristaux de cellulose imprégnés de phthalocyanine cationique, d'après Anaya-Plaza³³⁹.

En considération avec les problèmes environnementaux de ces dernières années, des matériaux photobactéricides à base de polymères naturels ont été élaborés pour cette famille de PS, en addition des habituels structures synthétiques déjà citées (tel que le polystyrène, les nanoparticules de silice, etc.). Hormis quelques études à base de chitosan³⁴⁰ ou de dextrane³⁴¹, la majorité de ces travaux utilisent des supports cellulotiques. En 1994, Bonnett et coll.³⁴² initièrent des travaux sur une cellulose transparente imprégnée de porphyrine cationique (TMPyP) et obtinrent de bons résultats visuels et préliminaires. Par la suite, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, sous l'impulsion des Professeurs Krausz et Sol, acquit une expertise dans le domaine de la création de surface cellulotique photobactéricide. A partir de 2006, les premiers travaux présentaient l'activité photobactéricide de dérivés cellulotiques (de type laurate ou chloroacétate) grâce au greffage covalent de protoporphyrine IX³⁴³ ou de porphyrines cationiques.^{344,345} Ensuite, les travaux du laboratoire permirent de créer des fibres cellulotiques recouvertes de porphyrines neutres ou anioniques par l'utilisation de la "click-chemistry"³⁴⁶ ou de pont triazine.³⁴⁷ Dès lors, les matériaux entraînaient déjà des photoinactivations de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. En adéquation avec les avancées en aPDT, un film comportant des porphyrines cationiques greffées de façon covalente afin d'optimiser l'effet photobactéricide a été élaboré.³⁴⁸ Ainsi, le LCSN démontra à

travers ces études que l'activation d'une surface cellulosique était réalisable par le greffage covalent de différents photosensibilisateurs. Parallèlement, un protocole différent a été établi en activant préalablement une pâte Kraft, permettant ensuite d'obtenir un papier photobactéricide sur mesure.³⁴⁹ Simultanément, Carpenter et Feese publièrent une étude photobactéricide basée sur l'utilisation de nanocristaux de cellulose recouverts de porphyrines cationiques par un lien triazol.^{350,351} En plus de confirmer les photoinactivations de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* observés par le LCSN, ils mirent en avant une activité plus faible sur *Pseudomonas aeruginosa*.

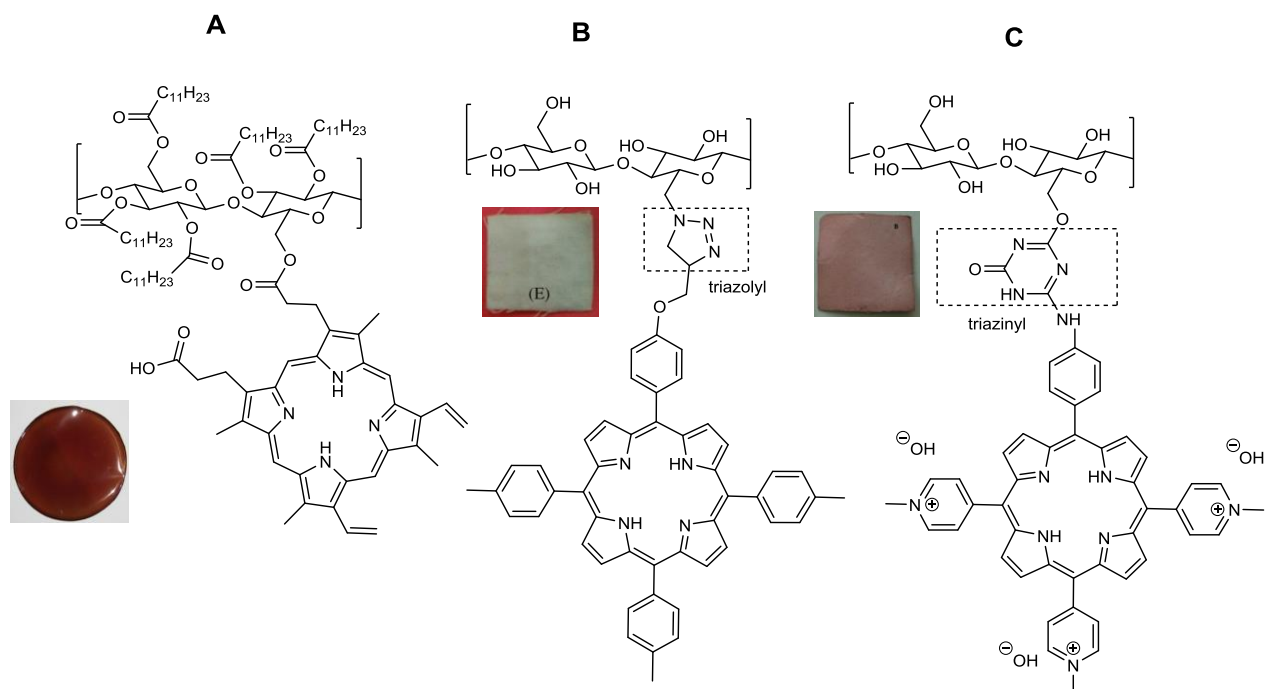


Figure 143. Différentes surfaces photobactéricides élaborées par le LCSN lors des travaux de, A: Krouit et coll.³⁴³ B: Ringot et coll.³⁴⁶ C: Mbakidi et coll.³⁴⁸.

III. Nanocristaux antibactériens : Principe

Cette étude bibliographique montre bien qu'un matériau peut photoinactiver des souches bactériennes après le greffage d'un photosensibilisateur. Malheureusement, les bactéries Gram négatif restent assez insensibles si le PS n'est pas cationique et donc d'origine synthétique.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la PMB avait la capacité d'améliorer l'efficacité des photosensibilisateurs en aPDT. Il serait donc théoriquement possible d'associer la PMB à un photosensibilisateur naturel afin d'augmenter l'efficacité d'un matériau. Dans cette nouvelle étude, nous avons voulu associer la prophylaxie antibiotique et l'aPDT afin de créer un matériau biosourcé antibactérien à large spectre d'activité et transposable à large échelle.

Pour se faire, un photosensibilisateur naturel et une polymyxine commerciale ont été fixés sur une plateforme biosourcée. Le choix du PS s'est porté sur un dérivé de chlorure-e6, la purpurine-18. En effet, le LCSN est connu pour l'extraction et l'utilisation de cette chlorure d'origine naturelle dans le cadre d'applications anticancéreuses.^{183,352} Ce photosensibilisateur sous forme libre peut s'avérer assez instable, notamment en solution aqueuse où des phénomènes d'agrégation peuvent apparaître selon le pH. La fixation de ce composé sur un polymère assure une augmentation de sa stabilité. Dans cette étude, les nanocristaux de cellulose ont été choisis pour être la plateforme d'origine naturelle.

La cellulose est un polymère d'origine naturelle qui est déjà utilisé dans de nombreux domaines industriels en tant qu'emballages, vêtements, papiers, etc. Son abondance dans la nature, sa compatibilité et sa dégradation naturelle font de ce polymère un excellent matériel pour la recherche.³⁵³ La cellulose est composée de monomères de glucose, reliés par des liaisons β (1,4), offrant un grand nombre de fonctions hydroxyles idéales pour la fixation de composés divers. A partir de ce polymère naturel, des nanocristaux de cellulose (CNCs) peuvent être obtenus par une hydrolyse acide des régions « amorphes ».³⁵⁴ De petite taille (~150 nm) et à la forme d'aiguille³⁵⁵, ces nanoparticules sont déjà présentes dans plusieurs domaines de recherche, dont la thérapie anticancéreuse^{352,356} et les traitements antibactériens.³⁵⁷

Afin de pouvoir fixer la polymyxine B (PMB) sur les nanocristaux de cellulose, ces derniers ont subi une oxydation. En effet, la formation d'acide carboxylique sur la plateforme permet la création de liaison amide avec les différents produits actifs. Enfin, les CNCs partiellement recouverts avec le dérivé de chlorure-e6 et avec la PMB (**CNCs_{C6-PMB} (3)**) ont été mis au contact de diverses souches bactériennes (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis*).

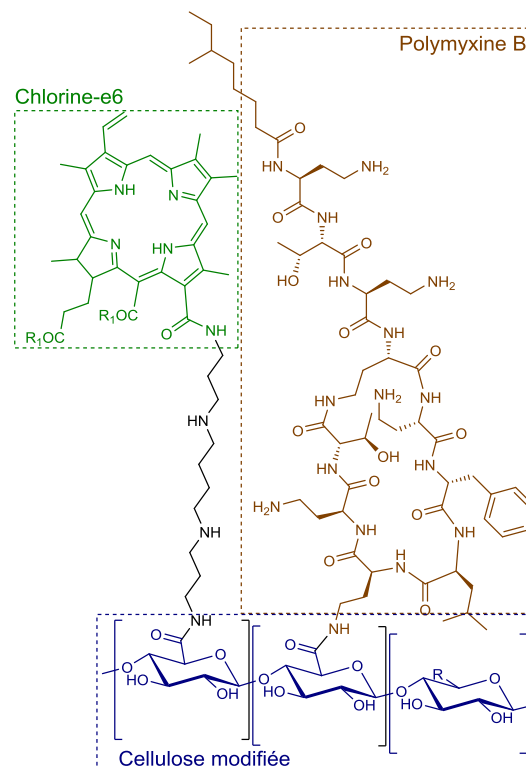


Figure 144. Structure des nanocristaux finales **CNCs_{C6-PMB} (3)**.



Cite this: DOI: 10.1039/c7tb01274h

Enhancement of photobactericidal activity of chlorin-e6-cellulose nanocrystals by covalent attachment of polymyxin B[†]

 Florent Le Guern,^a Tan-Sothea Ouk,^a Karine Grenier,^{ib} ^a Nicolas Joly,^b
 Vincent Lequart^b and Vincent Sol ^{ib} ^{✱a}

Despite the advances made over the last decade, infections caused by multi-drug resistant bacterial strains are increasingly important societal issues that need to be addressed. New approaches have already been developed in order to overcome this problem. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) could provide an alternative to fight infectious bacteria. This approach has already inspired the development of innovative materials. Interesting results have been obtained against Gram-positive bacteria, but it also appeared that Gram-negative strains, especially *Pseudomonas aeruginosa*, were less sensitive to PACT. Enhanced efficacy against Gram-negative bacteria had been previously obtained with photosensitizers bound to antimicrobial peptides. In this work, we designed a photobactericidal organic material, **CNCs_{C6-PMB}**, consisting of cellulose nanocrystals to which the photosensitizer chlorin-e6 and the antimicrobial polypeptide polymyxin B (PMB) were covalently attached. These modified nanocrystals were characterized by IR spectroscopy, zeta potential measurements and elemental analyses, after which antibacterial assays were carried out. Following light irradiation, **CNCs_{C6-PMB}** demonstrated efficiency against Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*) by inhibition of bacterial growth. An amplifying effect of chlorin-e6 has been highlighted against these Gram-negative strains, based on membrane weakening and a potential docking effect from the polymyxin moiety. Such results confirmed the importance of using an antimicrobial peptide in order to broaden the spectrum of PACT.

Received 10th May 2017,
Accepted 28th July 2017

DOI: 10.1039/c7tb01274h

rsc.li/materials-b

Introduction

Wound infection is a major cause of morbidity and mortality that is associated with high costs for the health care system. Consequently, it represents a serious problem for public health. Infection may lead to a delay of wound healing.¹ The management of infected wounds has become difficult due to the emergence of multi-drug resistant bacteria otherwise named superbugs. The bacteria responsible for these life-threatening conditions come from hardly sterilizable surfaces in the patient's environment. Bacteria proliferate on these surfaces and build biofilms which present strong resistance to treatments in comparison with the corresponding planktonic cultures. Bacterial biofilms are a current issue in the medical field, as well as in the food industry.² To solve

this problem, different strategies were developed such as anti-adhesive surfaces, bioactive materials, coating with active molecules and antimicrobial-releasing films.³ Antimicrobial-coated materials were obtained by grafting antiseptics,⁴ quaternary ammonium functions,^{5–8} zwitterionic compounds,^{9,10} peptides,^{11–14} or metals.^{15–17} The currently available surfaces present some disadvantages such as loss of efficiency due to the leaking of active compounds, degradation of the material, or the presence of metals or toxic compounds. Hence, the development of novel organic materials able to inactivate a broad spectrum of bacteria is still relevant.

Cellulose is a biopolymer which is used in many industrial fields such as food packaging and the textile industry, as well as the paper industry. Abundance, biological compatibility and biodegradability make cellulose an excellent organic material for research.¹⁸ Cellulose is composed of β-1,4-linked-D-glucose chains, in which the presence of many hydroxyl functions (primary and secondary alcohols) offers chemical opportunities for potential grafting. Cellulose nanocrystals (CNCs) are small, rod-like particles,¹⁹ obtained by acidic hydrolysis of amorphous regions within the natural polymer.²⁰ These nanoparticles have

^a Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France.
E-mail: vincent.sol@unilim.fr

^b Université d'Artois, 1230 rue de l'Université, CS 20819, 62408 Béthune Cedex, France

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: TGA and TEM analyses. See DOI: 10.1039/c7tb01274h

been used in different fields of research, including cancer therapy,^{21,22} antibacterial applications and bacterial imaging.²³ Indeed, antibacterial surfaces were developed from modified cellulose nanocrystals,²⁴ but most of them display the same disadvantages as those outlined above.

Around the world, laboratories are turning their attention toward a recent and promising alternative to antibiotics, namely photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). Photosensitizers (PS) produce cytotoxic oxygen species upon appropriate light irradiation in the presence of oxygen. In particular, one of these species, called singlet oxygen, is highly reactive and has a short lifespan.^{25,26} Unlike common sanitizers, reactive oxygen species (ROS) do not end up in the waste system and are thus compatible with environmental protection matters. This therapy was first tried out on bacterial suspensions, such as Gram-positive bacteria, and more specially against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with promising results.²⁷ Among PS, cationic porphyrins showed a photoinduced activity against a broad spectrum of bacteria,^{28,29} notably when these PS were combined with specific peptides capable of targeting Gram-negative bacteria.^{30–34} This combination between a PS and these peptides allows singlet oxygen to be generated on the outer membrane surface or even from within bacterial cells. The antimicrobial properties of PS have been exploited to create photobactericidal polymers. The efficiency of specific PS, grafted on beads, was first demonstrated against *Escherichia coli*.³⁵ These assays allowed the validation of this concept, and showed that the PS fundamental mode of action remains unchanged, even when covalently bound to materials. In our laboratory, the development of photobactericidal surfaces started with the studies carried out by Krausz *et al.* and the demonstration of the antibacterial effect of porphyrins linked to hydrophobic cellulose films^{36–38} then onto cotton fabric or paper.^{39–42} Ghiladi and his co-workers designed cellulose nanocrystals containing a synthetic porphyrin which proved to be effective against Gram-positive bacteria.⁴³ Unfortunately, the results against *P. aeruginosa*, a bacterium involved in nosocomial infections, are still insufficient to develop a broad-spectrum antibacterial surface.⁴⁴

Polymyxins refers to a family of antibiotics consisting of a hydrophilic “head” and a lipophilic “tail”. These antimicrobial peptides, especially polymyxin E (also called colistin), have already been used to fight Gram-negative induced infections.⁴⁵ In the last few years, the appearance of antibiotic-resistant strains led to an increasing use of polymyxins.⁴⁶ These antibiotics, which are produced by *Bacillus polymyxa*, are specific to Gram-negative bacteria, due to the electrostatic attraction between their γ -amine functions and the negatively charged phosphate head groups of Lipid A.⁴⁷ Besides the antimicrobial activity of grafted polymyxin B (PMB),¹¹ this peptide could increase the effect of PACT on Gram-negative bacteria by disorganizing bacterial membranes.⁴⁸ However, the excessive use of polymyxins may have led to bacterial resistance and eventually to the emergence of superbugs.^{49–51}

In this work, we have designed a new photobactericidal polymer based on organic compounds and endowed with a broad spectrum of activity (Scheme 1). Based on oxidized cellulose

nanocrystals (CNCs_{ox} (1)), a chlorin-e6 derivative was grafted to obtain CNCs_{e6} (2). Finally, to enlarge the spectrum of activity of the photosensitizer, polymyxin B was also combined with the nanocrystals to eventually obtain CNCs_{e6-PMB} (3). After several analyses, the nanocrystals were tested against *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* and *S. epidermidis*, with or without light irradiation.

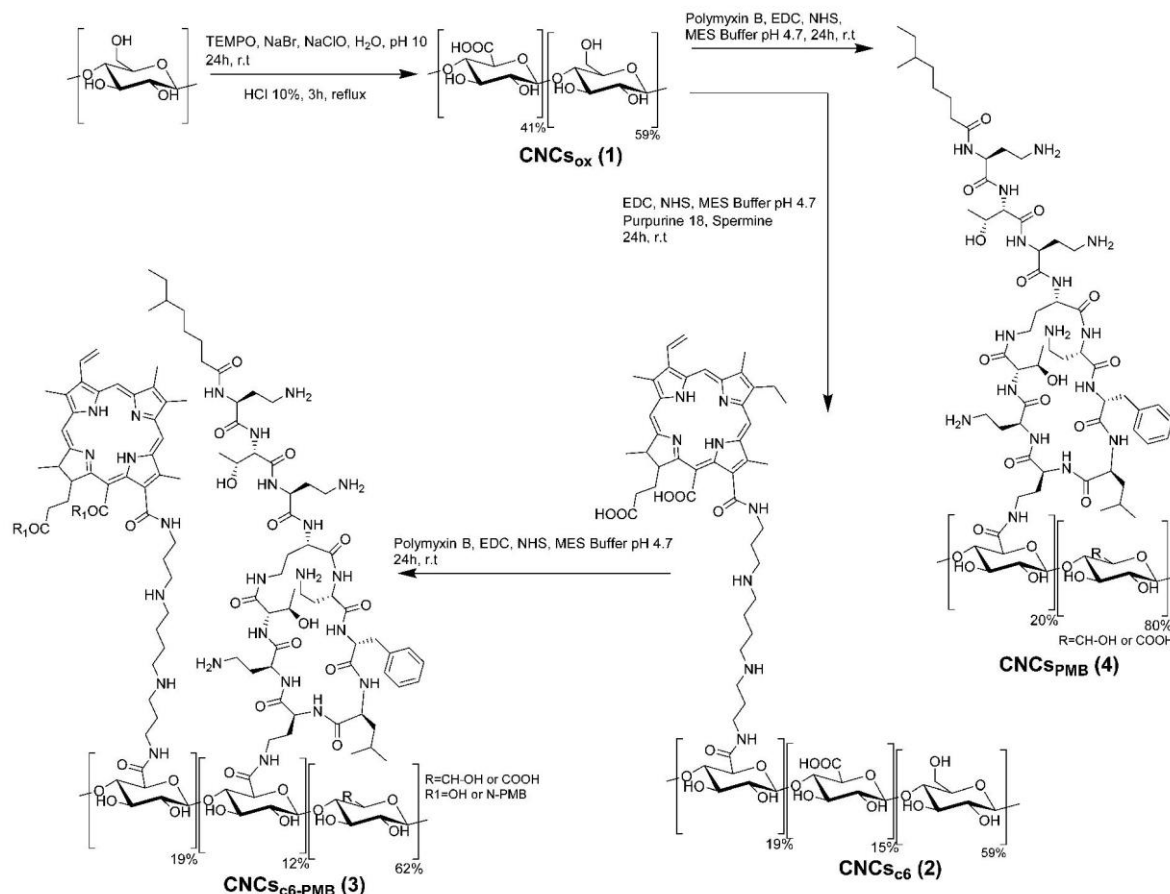
Results

Synthesis and characterization

The activated nanocrystals were prepared in three steps. According to the structure of polymyxins, the cellulose nanocrystals had to undergo modification. The amine functions of this antimicrobial peptide were chosen in order to be later used during coupling. As cellulose oxidation is well-known in the literature,⁵² the purpose was to link the peptide to the nanocrystals *via* an amide function.²³

Commercial cotton was first oxidized to facilitate hydrolysis, as cellulose oxidation unravels the fiber.⁵³ Then, after several dialyses, the smallest nanocrystals were separated from the bulk by centrifugation and recovered in the supernatant. An IR spectrum revealed a strong signal due to carbonyl stretching (1732 cm⁻¹) (Fig. 1). As the carboxylic acid function was intended to be used for further reactions, its exact concentration had to be determined. Conductometric titration was carried out. The zeta potential of CNCs_{ox} (1) was recorded and served as a reference.

To avoid the synthesis of photosensitizers, we used purpurin-18. The cyclic anhydride of purpurin easily reacts with free-amine compounds like spermine. This reaction presents several advantages: the purpurin derivative is much more soluble in water than purpurin-18, and the second primary amine function of spermine allows coupling with nanocrystals through an amide function. Moreover, chlorin-e6 brings two extra acid carboxylic groups, which may be used for further amide coupling. The chlorin-e6-based reactant was prepared by simply mixing purpurin-18 and spermine in chloroform, which leads to a color change (Fig. 2). Also, this spermine linker was supposed to add flexibility to grafted chlorin-e6 molecules. After removing the solvent, chlorin had to be quickly coupled with nanocrystals to avoid any degradation. Once grafted, chlorins are stable, unlike free chlorins in aqueous solution, which tend to aggregate. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) is usually used to form amide functions in aqueous solutions. For this reaction, a 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer with a pH between 4 and 6 is usually advised,^{54,55} though manual pH control also provided good results during our first trials. The carboxylic acid functions of the nanocrystals were activated 15 minutes before the addition, and high porosity dialysis was used for purification, in order to remove free chlorin and potential aggregates from the mixture. The color switch of the CNCs, as well as other analyses, confirmed the coupling. An IR spectrum revealed an amplification of the 2930 cm⁻¹ and 1600 cm⁻¹ bands, due to the aromatic structure. The coupling with chlorin-e6 increased the zeta potential of the nanocrystals, because of the presence of spermine.



Scheme 1 Synthetic route to cellulose nanocrystals coated with chlorin-e6 and polymyxin B.

Elemental analysis revealed a nitrogen content of 3.05% in CNCs_{c6} (2) (Table 1). Knowing the available carboxylic acid content and reagent quantities, a maximum content of about 3.30% was expected, so the yield could be calculated: $3.05/3.30 = 92\%$. The combination of this yield with the oxidation degree then allowed the calculation of the density of chlorin-e6 on the nanocrystals: $0.92 \times 21\% = 19\%$ (see the ESI†). The polymyxin grafting step was based on the previous step using EDC/*N*-hydroxysuccinimide (NHS). Cellulose nanocrystals coated with polymyxin, but which did not contain chlorin (CNCs_{PMB} (4)), were also synthesized, for comparison purposes in further anti-microbial assays. The IR spectrum of CNCs_{PMB} (4) showed a strong signal at around 1650 cm^{-1} , due to the carbonyl stretching of the amide functions contained in the peptide sequence. This signal could also be found in the IR spectrum of CNCs_{c6-PMB} (3). As expected, the zeta potential increased up to a “neutral zone”, whereas CNCs_{PMB} (4) remained negatively charged. As before, the amount of grafted polymyxin was estimated through elementary analysis, as the nitrogen content was 4.05% for an expected maximum of 4.22% ($4.05/4.22 = 95\%$). The final degree of substitution (DS) of polymyxin for CNCs_{PMB} (4) was about 20%. Otherwise, the grafting of polymyxin on CNCs_{c6} (2) to obtain CNCs_{c6-PMB} (3) was less efficient, as shown by the increase in nitrogen content from one product to the next

one: $((4.79-3.05)/(5.61-3.30) = 75\%)$. Finally, the PMB DS for CNCs_{c6-PMB} (3) was 12% (see the ESI†).

Knowing the composition of CNCs_{c6-PMB} (3), dilutions were applied to CNCs_{ox} (1), CNCs_{c6} (2), CNCs_{PMB} (4), and free-PMB in order to obtain the same concentration of each component. Indeed, equal concentrations of chlorin-e6, PMB or nanocrystals are required in order to obtain significant results from anti-bacterial assays. As mentioned above, the presence of polymyxin B and chlorin-e6 bound to the nanocrystals was revealed, but there was no analysis confirming the existence of a covalent bond. Polymyxin and spermine compounds are highly positively charged reactants, while cellulose is a well-known negatively charged polymer. Between these molecules, strong ionic bonds can be formed, which could interfere with biological assays through a salting-out effect. Different trials were performed to ensure the absence of ionic bonds. First, samples of the supernatant were collected from the suspensions and then freeze-dried. They were free from any remaining reactant.

Afterwards, the nanocrystals were placed into a saturated brine solution in order to disrupt the possible electrostatic interactions, and shaken for several hours. The brine solutions were then centrifuged; the supernatants displayed virtually flat UV-vis spectra. The presence of the PMB covalent bond was also verified through agar-diffusion tests. Nanocrystals containing

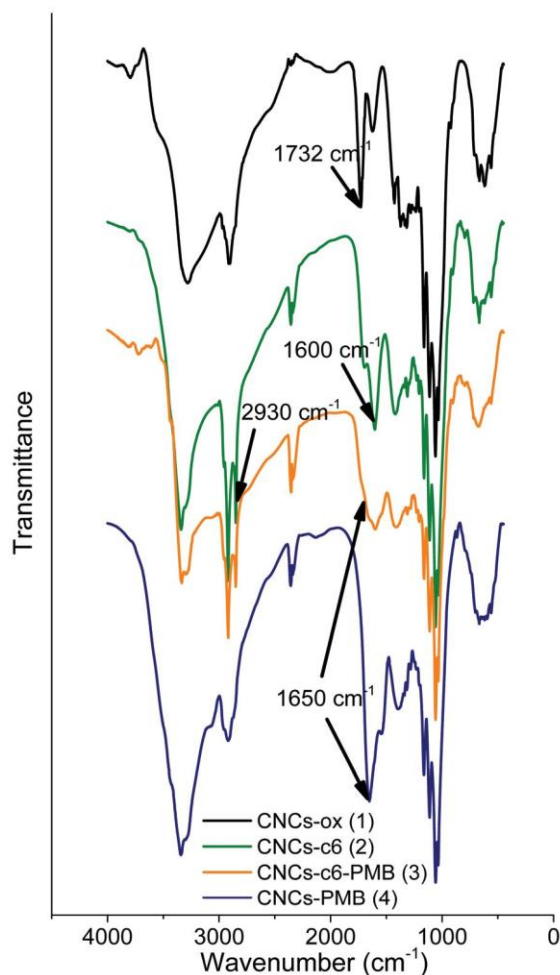


Fig. 1 IR spectra of the nanocrystals: CNCs_{ox} (1), CNCs_{c6} (2), CNCs_{c6-PMB} (3), CNCs_{PMB} (4).

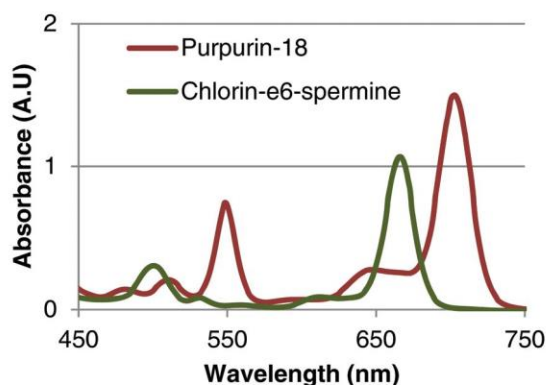


Fig. 2 Absorbance spectra of the reactant (purpurin-18) and the product (chlorin-e6-spermine) in chloroform. The opening of the cyclic anhydride function leads to a color switch.

polymyxin were subjected to this test, either after purification, after sterilization or after inactivation of a suspension of *P. aeruginosa*. For these trials, no diffusion through agar was observed, contrary to free PMB. None of these assays showed

Table 1 Analysis data (zeta potential and elementary analysis) of the different nanocrystals

		CNCs _{ox} (1)	CNCs _{c6} (2)	CNCs _{c6-PMB} (3)	CNCs _{PMB} (4)
Zeta potential (ζ) [± 1 mV]		−30	−12	−1	−3
Elementary analysis	%C	40.13	51.25	48.49	39.09
	%N	0.00	3.05	4.79	4.05
	%H	6.04	7.19	6.89	5.37

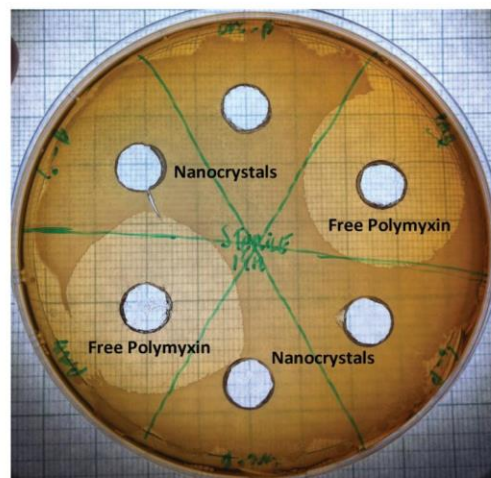


Fig. 3 Illustration of the diffusion test. A clear halo appeared around the wells containing free polymyxin B, as opposed to the wells containing the antibiotic covalently bound to cellulose nanocrystals.

any kind of ionic interaction between the reactants and nanocrystals (Fig. 3).

The nanocrystalline structure of all the CNCs was verified by Transmission Electron Microscopy (TEM), showing a typical whisker morphology (Fig. S1, ESI†). The rod-like cylindrical particles were around 200–300 nm long and 10–20 nm wide. For CNCs_{ox} (1) and CNCs_{c6-PMB} (3), relatively well-dispersed and rod-shaped nanoparticles were observed, implying that surface chemical modification and functionalization did not affect the structural and morphological integrity of the cellulose nanocrystals. In our attempts to further elucidate the physical/chemical properties of these new nanoparticles, we investigated, also, the thermal stabilities of the initiator and modified CNCs by thermogravimetric analysis. The weight loss profiles for CNCs_{ox}, CNCs_{c6} and CNCs_{c6-PMB} are illustrated in Fig. S2 (ESI†). Evaporation of water, which is usually present despite freeze drying the samples, led to the first gradual weight loss. Thus, CNCs_{ox} (1) and CNCs_{c6} (2) displayed very similar TGA profiles up to 350 °C (1) and 364 °C (2–3) respectively. Nevertheless, thereafter, the weight loss of 1 is more important than for CNCs (2) and (3) indicating that the covalent immobilization of chlorin-e6-spermine and chlorin-e6-spermine-PMB seemed to increase the thermal stability of the nanocrystals. In addition, CNCs_{c6} (2) and CNCs_{c6-PMB} (3) displayed a slightly different TGA curve, consistent with the presence of PMB on the nanocrystals 3. Finally, the photooxidation of 9,10-dimethylantracene (DMA) and Singlet

Oxygen Sensor Green Reagent (SOSG) allowed us to observe the capacity of each CNC to produce singlet oxygen under light irradiation (Fig. S3 and S4, ESI†).⁵⁶ As expected, **CNCs_{ox}** (1) and **CNCs_{PMB}** (4) do not produce singlet oxygen, whereas **CNCs_{c6}** (2) and **CNCs_{c6-PMB}** (3) seem to have a similar production under light irradiation.

Photoinactivation of bacteria

To obtain relevant results, commercial bacterial strains were used in this study. They are known to be involved in common hospital-acquired infections (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* and *S. epidermidis*). The purpose of this study was to inhibit the bacterial growth, thus avoiding biofilm formation. For antibacterial assays, bacteria in their log phase were exposed to the different nanocrystals, which was meant to show the potential capacity of these nanocrystals to inhibit biofilm formation. For each antibacterial assay, the initial bacterial concentration was determined and compared to the concentrations reached after 15 hours of incubation, with or without irradiation. In addition to nanocrystal mixtures, two control solutions were also tested: 250 μL of sterilized water was added to each bacterial suspension in order to check any dilution effect, and free PMB (61.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was then compared to grafted polymyxin B. The free chlorin-e6-spermine derivative could not be tested, as these molecules tend to aggregate after several minutes, in particular, into slightly acidic solutions. The potential inactivation of *S. aureus* (Fig. 4A) and *S. epidermidis* (Fig. 4B) was investigated. The inactivity of **CNCs_{ox}** (1), **CNCs_{PMB}** (4) and PMB was confirmed, whereas the effect of chlorin-e6 grafted on **CNCs_{c6}** (2) and **CNCs_{c6-PMB}** (3) was significant under light irradiation (6 log units decrease). For both strains, our final product **CNCs_{c6-PMB}** (3) and **CNCs_{c6}** (2) showed interesting photobactericidal efficacy against Gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria were exposed to the different mixtures. Carrying out the assays at this product concentration (0.191 mg mL^{-1}) demonstrated the worthlessness of light irradiation against *E. coli* (Fig. 5C1), due to the efficiency of bound or free PMB. Additional tests were then carried out at lower compound concentrations (0.019 mg mL^{-1}) (Fig. 5C2). A promising result was obtained with **CNCs_{c6-PMB}** (3) under light irradiation, as the bacterial concentration decreased. These results revealed a photobactericidal effect and the inactivity of bound PMB at this concentration, in opposition to free PMB which was still efficient. The difference between the two sets of conditions showed the photobactericidal activity of **CNCs_{c6-PMB}** (3) against *E. coli*, whereas **CNCs_{c6}** (2) showed no such result.

Assays on *P. aeruginosa* have confirmed the results obtained with *E. coli* (Fig. 6). Whereas a lack of activity of the nanocrystals was observed at 0.019 mg mL^{-1} , a similar photobactericidal activity of **CNCs_{c6-PMB}** (3) was obtained at 0.080 mg mL^{-1} .

Confocal microscopy imaging of bacteria

Analyses by confocal microscopy were performed to analyze the integrity of the bacterial membrane, in contact with the different CNCs in the dark. A LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit was used, including a mixture of SYTO9 (nucleic acid DNA stain) and propidium iodide (PI). Thus, bacteria with intact

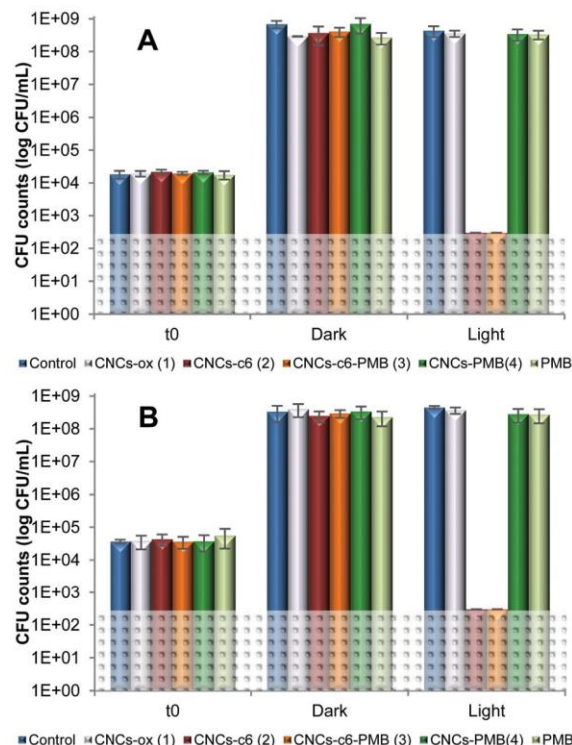


Fig. 4 Photoinactivation of Gram-positive strains. (A) *S. aureus*, (B) *S. epidermidis*. The control (blue bar) was obtained by mixing inoculum with water instead of products. The composition of **CNCs_{c6-PMB}** (3) used (0.191 mg mL^{-1}) allowed the other suspensions to be diluted to obtain equimolar concentrations of the compounds. PMB concentration: 61.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Two plates were prepared the same way, but one was exposed to light for 15 h (0.8 mW cm^{-2}) while the other was kept in the dark. Due to the protocol used, concentrations below 300 CFU mL^{-1} could not be determined (grey area).

cell membranes stain fluorescent green (SYTO9), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). After 30 min of contact with different CNCs, the fluorescence emissions from *S. aureus* (Fig. S4, ESI†), *E. coli* (Fig. S5, ESI†) and *P. aeruginosa* (Fig. S6, ESI†) were observed. As expected, the **CNCs** and **free-PMB** did not have any impact on the integrity of the membrane of *S. aureus*. The results with **CNCs_{ox}** (1) and **CNCs_{c6}** (2) in contact with Gram-negative strains were also similar to the assays with untreated bacteria. **CNCs_{c6-PMB}** (3), **CNCs_{PMB}** (4) and **free-PMB** led to an increase of red-fluorescence from *E. coli* and *P. aeruginosa*. Moreover, the results with **CNCs_{c6-PMB}** (3) and **CNCs_{PMB}** (4) showed some discrepancies in comparison to those with **free-PMB**. These nanocrystals have induced some aggregation of *E. coli* and *P. aeruginosa* (Fig. 7). These bacterial aggregates showed a significant fluorescence from PI. Since such behaviors from the Gram-negative strains were not observed under other conditions, the fixed PMB should be the reason for these observations.

Discussion

The bacterial threat is still a current issue in hospitals. Advances in the field of PACT have brought promising results,

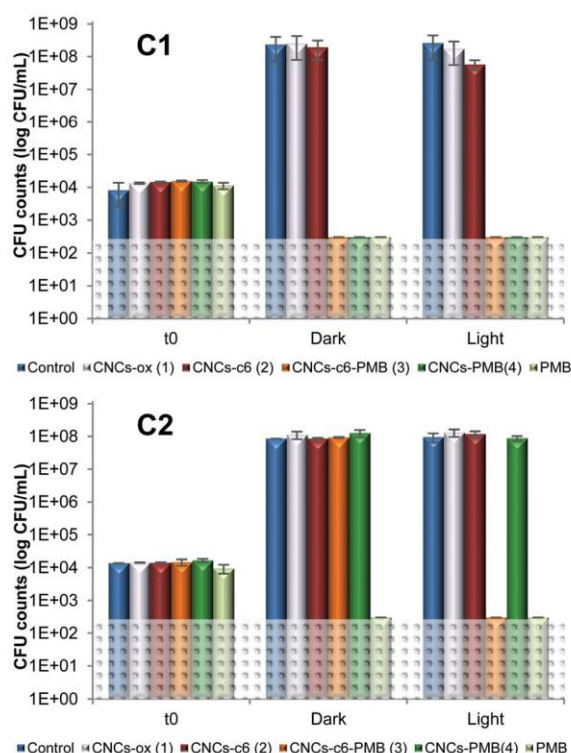


Fig. 5 Inactivation of *E. coli*. The control (blue bar) was obtained by mixing inoculum with water instead of products. The concentrations of **CNCs_{c6-PMB} (3)** used: 0.191 mg mL⁻¹ for C1 and 0.019 mg mL⁻¹ for C2. PMB concentrations: 61.8 µg mL⁻¹ for C1 and 6.2 µg mL⁻¹ for C2. Two plates were prepared the same way, but one was exposed to light for 15 h (0.8 mW cm⁻²) while the other was kept in the dark. Due to the protocol used, concentrations below 300 CFU mL⁻¹ could not be determined (grey area).

with the creation of photobactericidal surfaces. While previous studies highlighted the efficiency of cationic porphyrin grafted on cellulose against common bacterial strains,⁴⁴ the purpose of this work was to enlarge the spectrum of efficacy by adding an antimicrobial peptide to the cellulosic surface, based on previous work predicting an enhanced photobactericidal effect.⁴⁸

To respect our commitment to environmental awareness, the synthesis of the final compound had to be carried out using as many bio-based compounds as possible. Following this idea, cellulose nanocrystals and chlorin-e6 were chosen as the surface and the photosensitizer, respectively. Moreover, click chemistry was banned to avoid any use of metals. According to these considerations, chlorin-e6 and PMB were successfully grafted onto the cellulose nanocrystals, and the corresponding densities of substitution were calculated through elemental analysis. These DS were high, in comparison with the ones mentioned in previous studies, even though they were still consistent with 24 h EDC/NHS coupling in MES buffer. Moreover, as spermine and PMB are highly positively charged and oxidized cellulose nanocrystals bear negative charges, bringing into contact the reagents and the surface was made even easier. The higher zeta potential of **CNCs_{c6} (2)**, as well as its partial coating, could explain the lower yield of PMB coupling leading to **CNCs_{c6-PMB} (3)**. The formation of *N*-acylurea, due to excess EDC, corrupted the calculation of DS and yields, which thus exceeded our expectations. To minimize its impact on the comparison of bactericidal activities, the same quantity of EDC was used for each reaction. The lack of regioselectivity of our synthesis also had to be considered. As the final purpose was to covalently link both reagents, regioselectivity, which is often a major issue with organic compounds, was not the main objective. Actually, the presence of ionic bonds in the suspensions was our biggest worry in this work. Firstly, the dialysis tubing should have removed excess reagents, thanks also to its cellulosic composition which may lead to ionic interactions with unreacted compounds. Nevertheless, we cannot consider that ionic bonds are totally absent, but we assume that they are negligible compared to the covalent ones. However, diffusion tests have shown that minor interactions do not disturb antibacterial assays.

The photobactericidal potential of our nanocrystals still had to be verified on Gram-positive strains. As expected, nanocrystals coated with chlorin-e6 led to a total inhibition of *S. aureus* and *S. epidermidis*. These results are in accordance with previous studies on chlorin-e6.^{57,58} Additionally, this bio-based photosensitizer was

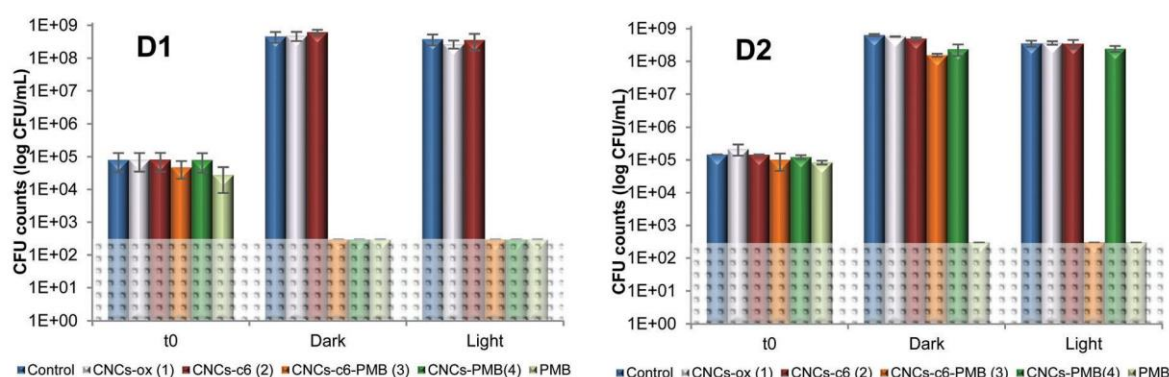


Fig. 6 Inactivation of *P. aeruginosa*. The control (blue bar) was obtained by mixing inoculum with water instead of products. The concentrations of **CNCs_{c6-PMB} (3)** used: 0.191 mg mL⁻¹ for D1 and 0.080 mg mL⁻¹ for D2. PMB concentrations: 61.8 µg mL⁻¹ for D1 and 6.2 µg mL⁻¹ for D2. Two plates were prepared the same way, but one was exposed to light for 15 h (0.8 mW cm⁻²) while the other was kept in the dark. Due to the protocol used, concentrations below 300 CFU mL⁻¹ could not be determined (grey area).

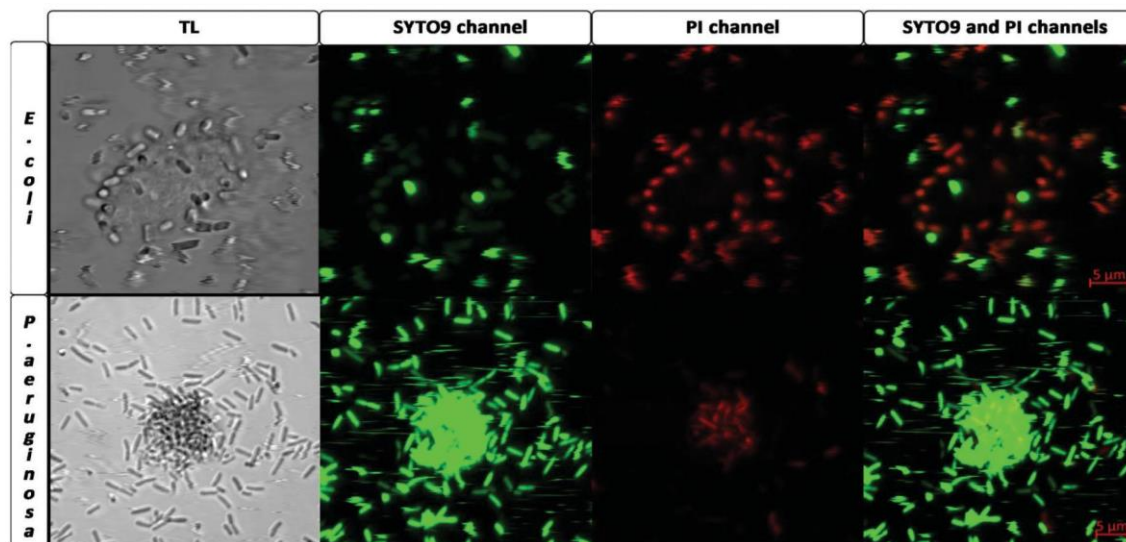


Fig. 7 Confocal laser scanning microscopy imaging of *E. coli* and *P. aeruginosa* in contact with **CNCs_{c6-PMB} (3)** (0.010 mg mL^{-1}). LIVE/DEAD[®] BacLight[™] was used to observe the viability of the bacteria. Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green (SYTO9), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). Images were obtained after 30 min of contact at room temperature.

known to be less effective against Gram-negative bacteria, in opposition to cationic porphyrins, which have already proved that they could inhibit, for example, *E. coli*. According to the literature,¹¹ we expected that bound PMB should have less bactericidal power, while still interacting with Gram-negative bacteria. Unfortunately, free chlorin-e6-spermine could not be used in these biological assays. Nevertheless, the purpose of the study was to investigate the potential interaction of the bound PMB with this PS, for the purpose of the elaboration of a photobactericidal material. Moreover, the enhancement of PACT by grafting PS on nanocrystals is already well-known from the literature.^{43,59}

However, grafted PMB has shown good efficiency against *P. aeruginosa* and *E. coli*. Moreover, the diluted assays have confirmed the discrepancy between the bound and the free peptide, which led us to question its mode of action. Based on previous work,¹¹ we suppose that the inhibition of bacteria by bound PMB could be due to a lack of regioselectivity, particularly due to the amount of amine functions. An osmotic shock and membrane weakening should also be considered. As expected, *P. aeruginosa* was less sensitive to PMB, which is consistent with the literature.¹¹ For the first time, an amplifying effect of chlorin-e6 by the bound polymyxin has been observed. Whereas this PS has shown no activity by itself under light irradiation (**CNCs_{c6} (2)**), light irradiation has clearly highlighted the photobactericidal activity of **CNCs_{c6-PMB} (3)**. A potentially enhanced photobactericidal activity brought by the peptide fixation could not be attributed to a stronger production of ROS, since both CNCs have shown similar rates of singlet oxygen production, which is the main ROS produced by chlorin-e6.⁶⁰ Thus, this enhancement was thought to be, *a fortiori*, due to a docking effect and/or membrane weakening. In fact, confocal microscopy imaging has shown that these Gram-negative strains

undergo membrane weakening in contact with **CNCs_{c6-PMB} (3)** and **CNCs_{PMB} (4)**. Moreover, the observed aggregates of bacteria indicate that a potential docking effect may occur. The nanocrystals thus get closer to Gram-negative bacteria, which are recognized by PMB. As it was already observed in different studies using attenuated polymyxin derivatives,^{48,61} grafted PMB also undermines the external membrane, thus offering ROS the capacity to easily reach their targets. The difference between *P. aeruginosa* and *E. coli* supports this hypothesis as *P. aeruginosa* is known for being less sensitive to ROS than *E. coli*, especially when the production of these species is a consequence of permeabilization of the inner membrane induced by polymyxin B.⁶²

Nanocrystal suspensions were stored in a cold place and protected against any kind of light irradiation. Their activities were shown to be conserved even 6 months after synthesis. **CNCs_{c6-PMB} (3)** still had a tendency to be slightly acidic, due to the last carboxylic functions stabilizing PMB.⁶³

This work allowed us to reach a different standpoint. The activity of bound PMB may be a problem in the future, since the emergence of resistant strains may become a catastrophe. Even though **CNCs_{c6-PMB} (3)** shows interesting results against these kinds of strains, according to the mechanisms used by bacteria to develop resistance, this concern remains.

However, such activated nanocrystals may be used for topical application. Polymyxins are becoming common antibiotics with the emergence of antibiotic-resistant strains. To overcome infections, some treatments are based on drug administration with a strong dose, which may induce some side effects such as renal complications.⁴⁵ In addition to a better efficiency, the use of **CNCs_{c6-PMB} (3)** may delay the apparition of bacterial resistance and the spreading of polymyxins into the blood system.

Conclusions

In this study, a broad-spectrum bactericidal material has been developed based on a combination of two well-known concepts to eradicate microbes, PACT and antibiotic prophylaxis. To respect our commitment to environmental awareness, this material was built with cellulose nanocrystals coated with organic compounds, such as chlorin-e6 and commercial polymyxin B. After light irradiation, a synergistic effect has been described between both the bound organic PS and the antimicrobial peptide. Similar nanocrystals may be considered as good substitutes for topical application containing free polymyxins. Moreover, PACT may inactivate antibiotic-resistant bacterial strains.

Experimental

Materials

All organic materials and microbial nutrients were purchased from commercial suppliers (Acros Organics, Alfa Aesar, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific). Polymyxin B sulfate was provided by TCI (Zwijndrecht, Belgium). Commercial cotton was obtained from a grocery store.

Instrumentation

Dialyses were performed using 6–8 kDa Spectrum-Labs RC tubes.

IR spectra were obtained using a Perkin Elmer Spectrum 1000 photometer, with samples conditioned on KBr pellets. Melting points (M_p) were uncorrected. Ultraviolet-visible spectra (UV-Vis) and absorbances of the samples were recorded on a SPECORD[®] 210 double beam spectrophotometer using 10 mm quartz cells. Zeta potential measurements were performed on a Malvern Zetasizer Nanoseries using DTS1070 cells. Conductometric titrations were conducted using a Thermo Scientific Orion Star A112 benchtop. Samples were freeze-dried inside a Christ Alpha LSC device.

Combustion elemental analyses of products were performed on a Fisons Instrument Thermoquest Flash EA 1112 CHNS analyzer. The gases used were Helium Alphagaz 2 and Oxygen Alphagaz 2. The method used was CHNS with the BBOT standard. Each analysis reported was based on two repeats of the same samples and the percentages of elements (%C, %H, %N) shown were the mean values of the analyses.

Square plates and products were kept warm inside a Thermos SR1000 incubator. Antimicrobial experiments used a Heidolph Unkubator 1000 combined with a Unimax 1010 for agitation. An Isotech Lightmeter 1335 light meter was used to measure the effective irradiation power. To plate 50 μ L of bacterial suspensions, an easySPIRAL[®] plater (Interscience, St. Nom la Bretèche, France) was used.

Synthesis

Cellulose nanocrystal preparation. Commercial cotton (6 g) was cut into small pieces and added to a beaker containing (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) (100 mg, 0.64 mmol), and sodium bromide (900 mg, 8.75 mmol) dissolved in 600 mL of distilled water. The pH was adjusted to 10 with a 0.5 M sodium

hydroxide solution. An aqueous solution containing 11% sodium hypochlorite (12.5 mL, 1.65 g, 22.2 mmol) was added dropwise to the suspension, under shaking. Sodium hydroxide was steadily added to bring the pH to 10. The mixture was shaken at room temperature until pH stabilisation. The batch was directly dialyzed against distilled water.

Oxidized cotton was recovered. Concentrated hydrochloric acid (37%) was directly added into the suspension to obtain a 10% solution. Cotton hydrolysis was performed for 3 hours under reflux, and impurities were removed by dialysis. The entire batch was centrifuged at 3700 rpm for 10 min and the smallest nanocrystals were recovered in the supernatant.

Densities were obtained by weight measurement of the freeze-dried suspensions (100 mL). Conductometric titration was performed to measure the carboxylic acid concentration. 70.3 mg of CNCs_{ox} (1) were dispersed into a 0.01 M HCl solution and shaken for 10 min. The conductivity of this solution was recorded during the progressive addition of a 0.01 M NaOH solution. The carboxylic acid content was calculated as previously described.⁵³

The suspension of CNCs_{ox} (1) was kept in a cold place (576.6 mg, 2.3 mmol of carboxylic acid per g, average oxidation degree = 41%, compatible with a previous communication⁵³ and in accordance with elementary analysis).

Preparation of CNCs_{e6} (2). Purpurin-18 was extracted from *Spirulina maxima* as previously described.⁵⁷ Purpurin-18 solution (131.3 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) was added dropwise to a solution of spermine (47.1 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) in chloroform. The batch was shaken at room temperature for 3 hours. The reaction was monitored by UV-Vis absorption, taking advantage of the color change due to the opening of cyclic anhydride (Fig. 2).²¹ The solvent was removed *in vacuo*. The crude product was directly dissolved in distilled water and added to a solution of MES Buffer (pH 4.7) with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (70 μ L, 80 mg, 0.5 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (50.2 mg, 0.44 mmol), and oxidized cellulose nanocrystals (200 mg, 0.464 mmol of carboxylic acid). After 24 hours at room temperature, the suspension was purified by dialyzing against distilled water and 288 mg of CNCs_{e6} (2) were recovered. The quantity of the grafted chlorin-e6 was calculated from elementary analysis data; the yield was about 92% (degree of substitution (DS): 19%) (Table S3, ESI[†]).

Obtention of CNCs_{e6-PMB} (3) and CNCs_{PMB} (4). Polymyxin B Sulfate was directly dropped into a solution of MES Buffer (pH 4.7) with EDC (35 μ L, 40 mg, 0.3 mmol), NHS (24.7 mg, 0.21 mmol), and oxidized cellulose nanocrystals (100 mg, 0.232 mmol of carboxylic acid). After 24 hours at room temperature, any excess reactants were then removed by dialyzing against distilled water and polymyxin-nanocrystals (CNCs_{PMB} (4)) were obtained. Elementary analysis allowed the calculation of the density of the grafted polymyxin with 95% yield (DS: 20%) (Table S3, ESI[†]). An identical protocol was used to couple polymyxin B with CNCs_{e6} (2) in order to reach the final product CNCs_{e6-PMB} (3) (101 mg, 0.191 mg mL⁻¹) with 75% yield (DS: 12%). All nanocrystal mixtures were kept in a fridge as suspensions in order to avoid any redispersion issues after drying.

Biological assays

Diffusion tests. Diffusion assays were performed through agar-tryptic soy: 1 mL of *P. aeruginosa* ($\sim 2 \times 10^5$ CFU mL⁻¹) was spread onto a square plate. After impregnation of agar, wells were created under a laminar flow hood (LFH). Into these small wells, suspensions containing nanocrystals grafted with polymyxin B (100 μ L) were deposited. The plate was incubated for 24 hours at 37 °C. Free polymyxin diffused through the agar and inactivated bacteria on the surface, instead of nanocrystals. A clear halo appeared around the wells containing free polymyxin B, as opposed to the wells containing the antibiotic covalently bonded to cellulose nanocrystals.

Bacterial strains and growth conditions. Gram-positive bacteria (*S. aureus* CIP7625 and *S. epidermidis* CIP109562) and Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa* CIP76110 and *E. coli* CIP54.8T) were purchased from the Institut Pasteur (Paris, France). These strains were cultivated in liquid tryptic soy (pancreatic casein extract 17 g L⁻¹, soy flour papaic digest 3 g L⁻¹, dextrose 2.5 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, and K₂HPO₄ 2.5 g L⁻¹) and incubated at 37 °C overnight under aerobic conditions.

Bacterial incubation in contact with nanocrystals. Prior to use, every sample was sterilized in an incubator overnight at 70 °C. Heat exposure for a few hours did not degrade the mixture (diffusion trial achieved). 750 μ L of a culture at 10^5 CFU mL⁻¹ (for *P. aeruginosa*) or at 2×10^4 CFU mL⁻¹ (*E. coli*, *S. epidermidis* and *S. aureus*), were deposited into each one of the wells displayed by two 24-well plates (BD Falcon). 250 μ L of the different mixtures were then added to the wells. Different nanocrystal concentrations were used: 0.062 mg mL⁻¹, 0.026 mg mL⁻¹, and 0.006 mg mL⁻¹ of CNCs_{ox} (1), 0.129 mg mL⁻¹, 0.054 mg mL⁻¹, and 0.013 mg mL⁻¹ of CNCs_{c6} (2), 0.191 mg mL⁻¹, 0.080 mg mL⁻¹, and 0.019 mg mL⁻¹ of CNCs_{c6-PMB} (3), 0.102 mg mL⁻¹, 0.043 mg mL⁻¹, and 0.010 mg mL⁻¹ of CNCs_{PMB} (4), and 0.062 mg mL⁻¹, 0.026 mg mL⁻¹, and 0.006 mg mL⁻¹ of free-PMB. The 24-well plates were incubated under gentle shaking (200 rpm) at 37 °C, and constant irradiation by a visible light LED for 15 h. The fluence rate was about 0.8 mW cm⁻² (fluence = 43.2 J cm⁻²). Other 24-well plates were prepared under the same conditions but kept in the dark. For each strain, 6 independent experiments were performed.

Bacterial count. Bacterial count was performed after serial dilutions of each well content. Each dilution was spread on tryptic soy agar plates using an automatic plate. After incubation at 37 °C for 24 h, the plates were counted to determine the total CFU per mL (CFU mL⁻¹). Due to the protocol employed, the lowest concentration which could be determined was about 300 CFU mL⁻¹.

Confocal microscopy. 200 μ L of the different mixtures were added to 1 mL of bacterial suspensions ($\sim 10^7$ CFU mL⁻¹). Different nanocrystal concentrations were used: 0.006 mg mL⁻¹ of CNCs_{ox} (1), 0.013 mg mL⁻¹ of CNCs_{c6} (2), 0.019 mg mL⁻¹ of CNCs_{c6-PMB} (3), 0.010 mg mL⁻¹ of CNCs_{PMB} (4), and 0.006 mg mL⁻¹ of free-PMB. Then, 3.6 μ L of an extemporaneous mixture of LIVE/DEAD[®] BacLight[™] was added directly to the suspension. After 15 min at room temperature, the suspensions were transferred

into the NUNC[™] Lab-Tek[™] II chamber coverglass (Corning, France). SYTO9 (included in the prepared solution from the kit) was excited with a 488 nm laser and the fluorescence emitted was detected between 499 and 570 nm. PI was excited with a 561 nm yellow-green laser and the fluorescence emitted was detected between 596 and 712 nm. Fluorescence emissions were analyzed using a LSM880 laser scanning confocal microscope (Zeiss, Germany). Image acquisition and analysis were realized using Zeiss ZEN Lite software. Images were obtained using a 100 $\times$ objective lens.

Acknowledgements

We thank the 'Conseil Régional du Limousin' for financial support. The authors are indebted to Dr Michel Guilloton for manuscript editing, and Pierre Carles and Solange Begot (Carmalim Plateform – SPCTS – Limoges University) for TEM and TGA analysis, respectively.

Notes and references

- 1 J. L. Bolognia, J. L. Jorizzo and J. V. Schaffer, *Dermatology: 2-Volume Set*, Saunders Elsevier, United States of America, 3rd edn, 2012.
- 2 C. A. Phillips, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2016, **51**, 1731–1743.
- 3 D. Campoccia, L. Montanaro and C. R. Arciola, *Biomaterials*, 2013, **34**, 8533–8554.
- 4 B. H. Kim, H. S. Seo, S. C. Jung, S. H. Ohk, K. H. Kim, D. L. Cho and Y. M. Ko, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2011, **11**, 1530–1533.
- 5 J. Lin, S. Qiu, K. Lewis and A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **83**, 168–172.
- 6 J. C. Tiller, S. B. Lee, K. Lewis and A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **79**, 465–471.
- 7 B. Gottenbos, H. C. van der Mei, F. Klatte, P. Nieuwenhuis and H. J. Busscher, *Biomaterials*, 2002, **23**, 1417–1423.
- 8 L. Mei, Y. Ren, T. J. A. Loontjens, H. C. van der Mei and H. J. Busscher, *Int. J. Artif. Organs*, 2012, **35**, 854–863.
- 9 L. Mi and S. Jiang, *Biomaterials*, 2012, **33**, 8928–8933.
- 10 G. Cheng, H. Xue, Z. Zhang, S. Chen and S. Jiang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 8831–8834.
- 11 M. Mohorčič, I. Jerman, M. Zorko, L. Butinar, B. Orel, R. Jerala and J. Friedrich, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2010, **21**, 2775–2782.
- 12 K. Hilpert, M. Elliott, H. Jenssen, J. Kindrachuk, C. D. Fjell, J. Körner, D. F. H. Winkler, L. L. Weaver, P. Henklein, A. S. Ulrich, S. H. Y. Chiang, S. W. Farmer, N. Pante, R. Volkmer and R. E. W. Hancock, *Chem. Biol.*, 2009, **16**, 58–69.
- 13 M. Kazemzadeh-Narbat, J. Kindrachuk, K. Duan, H. Jenssen, R. E. W. Hancock and R. Wang, *Biomaterials*, 2010, **31**, 9519–9526.
- 14 Y. Li, K. N. Kumar, J. M. Dabkowski, M. Corrigan, R. W. Scott, K. Nüsslein and G. N. Tew, *Langmuir*, 2012, **28**, 12134–12139.
- 15 L. Rio, E. Kusiak-Nejman, J. Kiwi, B. Bétrisey, C. Pulgarin, A. Trampuz and A. Bizzini, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 8176–8182.

- 16 J. Qu, X. Lu, D. Li, Y. Ding, Y. Leng, J. Weng, S. Qu, B. Feng and F. Watari, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2011, **97B**, 40–48.
- 17 A. Ewald, S. K. Glückermann, R. Thull and U. Gbureck, *BioMed. Eng. Online*, 2006, **5**, 22.
- 18 N. Lin, J. Huang and A. Dufresne, *Nanoscale*, 2012, **4**, 3274–3294.
- 19 M. A. S. Azizi Samir, F. Alloin and A. Dufresne, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 612–626.
- 20 J. Araki, M. Wada, S. Kuga and T. Okano, *Langmuir*, 2000, **16**, 2413–2415.
- 21 N. Drogat, R. Granet, C. Le Morvan, G. Bégaud-Grimaud, P. Krausz and V. Sol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 3648–3652.
- 22 K. Miki, T. Inoue, Y. Kobayashi, K. Nakano, H. Matsuoka, F. Yamauchi, T. Yano and K. Ohe, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 219–227.
- 23 J. Zhou, N. Butchosa, H. S. N. Jayawardena, J. Park, Q. Zhou, M. Yan and O. Ramström, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 1426–1432.
- 24 C. Spagnul, L. C. Turner and R. W. Boyle, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2015, **150**, 11–30.
- 25 F. Vatansever, W. C. M. A. de Melo, P. Avci, D. Vecchio, M. Sadasivam, A. Gupta, R. Chandran, M. Karimi, N. A. Parizotto, R. Yin, G. P. Tegos and M. R. Hamblin, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013, **37**, 955–989.
- 26 J. S. Dysart and M. S. Patterson, *Phys. Med. Biol.*, 2005, **50**, 2597–2616.
- 27 X. Fu, Y. Fang and M. Yao, *BioMed Res. Int.*, 2013, **2013**, 159157.
- 28 E. Alves, L. Costa, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Â. Cunha and A. Almeida, *BMC Microbiol.*, 2009, **9**, 70.
- 29 E. Saino, M. S. Sbarra, C. R. Arciola, M. Scavone, N. Bloise, P. Nikolov, F. Ricchelli and L. Visai, *Int. J. Artif. Organs*, 2010, **33**, 636–645.
- 30 R. Dosselli, M. Gobbo, E. Bolognini, S. Campestrini and E. Reddi, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 35–38.
- 31 R. Dosselli, C. Tampieri, R. Ruiz-González, S. De Munari, X. Ragàs, D. Sánchez-García, M. Agut, S. Nonell, E. Reddi and M. Gobbo, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 1052–1063.
- 32 A. Di Poto, M. S. Sbarra, G. Provenza, L. Visai and P. Speziale, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3158–3166.
- 33 R. Dosselli, R. Ruiz-González, F. Moret, V. Agnolon, C. Compagnin, M. Mognato, V. Sella, M. Agut, S. Nonell, M. Gobbo and E. Reddi, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 1403–1415.
- 34 F. Liu, A. Soh Yan Ni, Y. Lim, H. Mohanram, S. Bhattacharjya and B. Xing, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**, 1639–1647.
- 35 J. S. Bellin, L. Lutwick and B. Jonas, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, **132**, 157–164.
- 36 M. Krouit, R. Granet, P. Branland, B. Verneuil and P. Krausz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 1651–1655.
- 37 M. Krouit, R. Granet and P. Krausz, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 10091–10097.
- 38 M. Krouit, R. Granet and P. Krausz, *Eur. Polym. J.*, 2009, **45**, 1250–1259.
- 39 C. Ringot, V. Sol, R. Granet and P. Krausz, *Mater. Lett.*, 2009, **63**, 1889–1891.
- 40 C. Ringot, S. Naima, R. Granet, P. Bressollier, V. Sol and P. Krausz, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2010, **14**, 925–931.
- 41 J.-P. Mbakidi, K. Herke, S. Alvès, V. Chaleix, R. Granet, P. Krausz, S. Leroy-Lhez, T.-S. Ouk and V. Sol, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **91**, 333–338.
- 42 J. K. Nzambe Ta Keki, T.-S. Ouk, R. Zerrouki, P.-A. Faugeras, V. Sol and F. Brouillette, *Mater. Sci. Eng., C*, 2016, **62**, 61–67.
- 43 E. Feese, H. Sadeghifar, H. S. Gracz, D. S. Argyropoulos and R. A. Ghiladi, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3528–3539.
- 44 B. L. Carpenter, E. Feese, H. Sadeghifar, D. S. Argyropoulos and R. A. Ghiladi, *Photochem. Photobiol.*, 2012, **88**, 527–536.
- 45 A. P. Zavascki, L. Z. Goldani, J. Li and R. L. Nation, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, **60**, 1206–1215.
- 46 T. Velkov, K. D. Roberts, P. E. Thompson and J. Li, *Future Med. Chem.*, 2016, **8**, 1017–1025.
- 47 T. Velkov, P. E. Thompson, R. L. Nation and J. Li, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 1898–1916.
- 48 Y. Nitzan, M. Gutterman, Z. Malik and B. Ehrenberg, *Photochem. Photobiol.*, 1992, **55**, 89–96.
- 49 H. P. Schweizer, *GMR, Genet. Mol. Res.*, 2003, **2**, 48–62.
- 50 S. J. Pamp, M. Gjermansen, H. K. Johansen and T. Tolker-Nielsen, *Mol. Microbiol.*, 2008, **68**, 223–240.
- 51 E. Padilla, E. Llobet, A. Doménech-Sánchez, L. Martínez-Martínez, J. A. Bengoechea and S. Albertí, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, **54**, 177–183.
- 52 T. Saito, Y. Nishiyama, J.-L. Putaux, M. Vignon and A. Isogai, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 1687–1691.
- 53 D. da Silva Perez, S. Montanari and M. R. Vignon, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 1417–1425.
- 54 P. Chauhan, C. Hadad, A. Sartorelli, M. Zarattini, A. Herreros-López, M. Mba, M. Maggini, M. Prato and T. Carofiglio, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 8525–8527.
- 55 I. Filpponen and D. S. Argyropoulos, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 1060–1066.
- 56 I. Scalise and E. N. Durantini, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 3037–3045.
- 57 G. P. Tegos, M. Anbe, C. Yang, T. N. Demidova, M. Satti, P. Mroz, S. Janjua, F. Gad and M. R. Hamblin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, **50**, 1402–1410.
- 58 N. S. Soukos, M. R. Hamblin and T. Hasan, *Photochem. Photobiol.*, 1997, **65**, 723–729.
- 59 E. Anaya-Plaza, E. van de Winkel, J. Mikkilä, J.-M. Malho, O. Ikkala, O. Gulías, R. Bresolí-Obach, M. Agut, S. Nonell, T. Torres, M. A. Kostianen and A. de la Escosura, *Chem. – Eur. J.*, 2017, **23**, 4320–4326.
- 60 L. Huang, Y. Xuan, Y. Koide, T. Zhiyentayev, M. Tanaka and M. R. Hamblin, *Lasers Surg. Med.*, 2012, **44**, 490–499.
- 61 H. Tsubery, I. Ofek, S. Cohen and M. Fridkin, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3085–3092.
- 62 A. Romsang, P. Leesukon, J. Duangkern, P. Vattanaviboon and S. Mongkolsuk, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2015, **45**, 314–318.
- 63 W. Saohin, PhD thesis, Robert Gordon University, 1997.

V. Informations supplémentaires

V.1. Microscopie électronique en transmission de nanocristaux

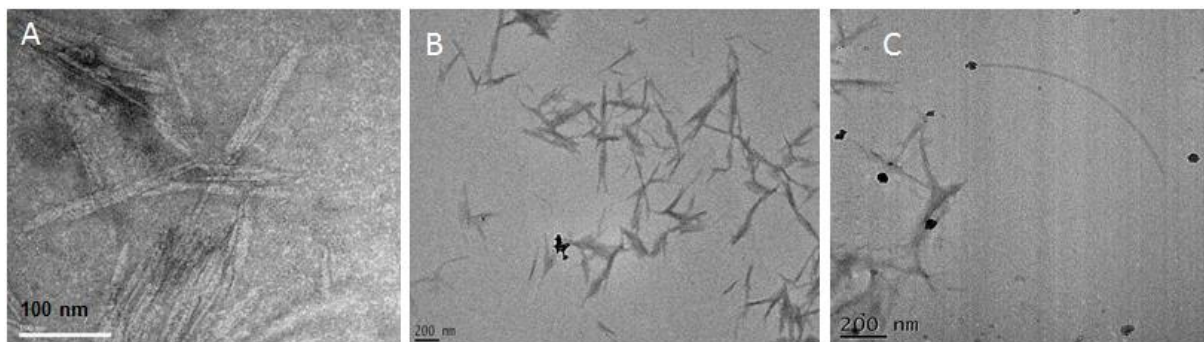


Figure 145 (Fig S1). TEM images of samples dispersed in water: unmodified CNCs (A), $\text{CNCs}_{\text{ox}} 1$ (B) and $\text{CNCs}_{\text{c6-PMB}} 3$ (C). All samples were stained with uranyl acetate for better contrast.

V.2. Analyses thermogravimétriques des nanocristaux

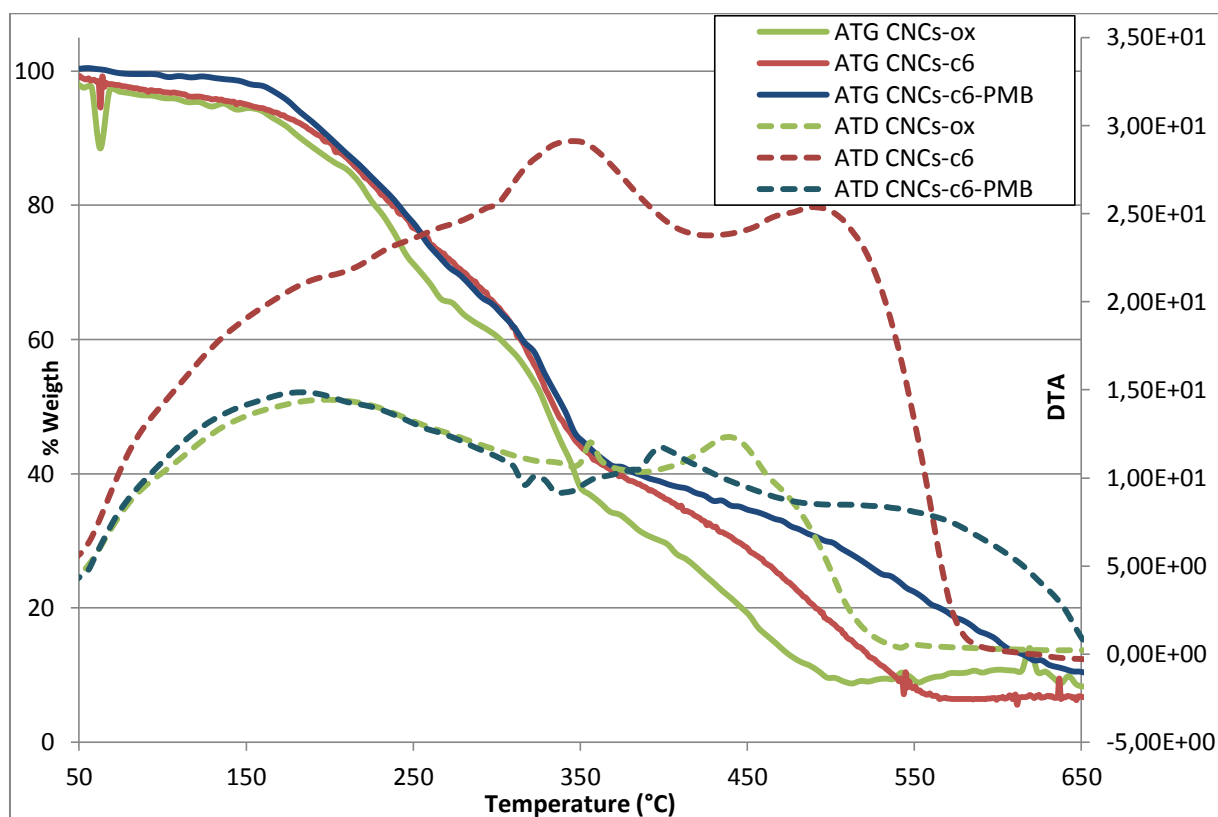


Figure 146 (Fig S2). Thermogravimetric analyses (TGA) and differential thermal analyses (DTA) of dried samples : $\text{CNCs}_{\text{ox}} 1$, $\text{CNCs}_{\text{c6}} 2$ and $\text{CNCs}_{\text{c6-PMB}} 3$.

V.3. Production d'oxygène singlet

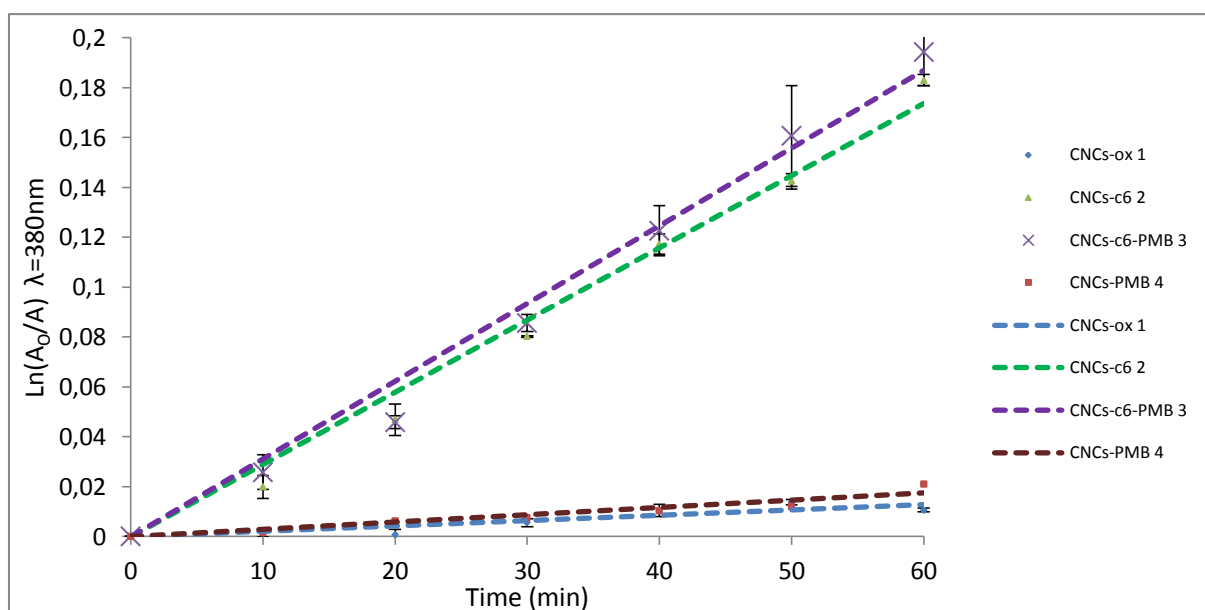


Figure 147 (Fig S3). Photooxidation of 9,10-dimethylanthracene (DMA, 95 μ M) under light irradiation (850 LUX) in presence of CNCs_{ox} 1 (0.164 mg/mL), CNCs_{c6} 2 (0.129 mg/mL), CNCs_{c6-PMB} 3 (0.191 mg/mL), or CNCs_{PMB} 4 (0.164 mg/mL) in N-N-dimethylformamide. Values represent means $\pm$ standard deviation of three separate experiments.

In order to confirm this result, the photooxydation of Singlet Oxygen Sensor Green Reagent (SOSG) was observed in contact of each CNCs under irradiation in aqueous solvent:

Nanocrystals were suspended in a solution of DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, pH 7.0-7.3) (0.1X, 1 mL) : CNCs_{ox} (1): 0.164 mg/mL ; CNCs_{c6} (2): 0.129 mg/mL ; CNCs_{c6-PMB} (3): 0.191 mg/mL ; CNCs_{PMB} (4): 0.164 mg/mL. 2 μ L of a fresh solution of SOSG in methanol (~5mM) was added to the suspensions. The photooxidation was studied by following the fluorescence emissions of the solution at 535 nm (I) (λ_{exc} = 485 nm), under a red light irradiation (red LED, 400 LUX). The rate of photooxidation was illustrated by a linear least-squares fit of the semilogarithmic plot of Ln (I/I₀) versus time. As expected, an identical result was obtained in physiological conditions.

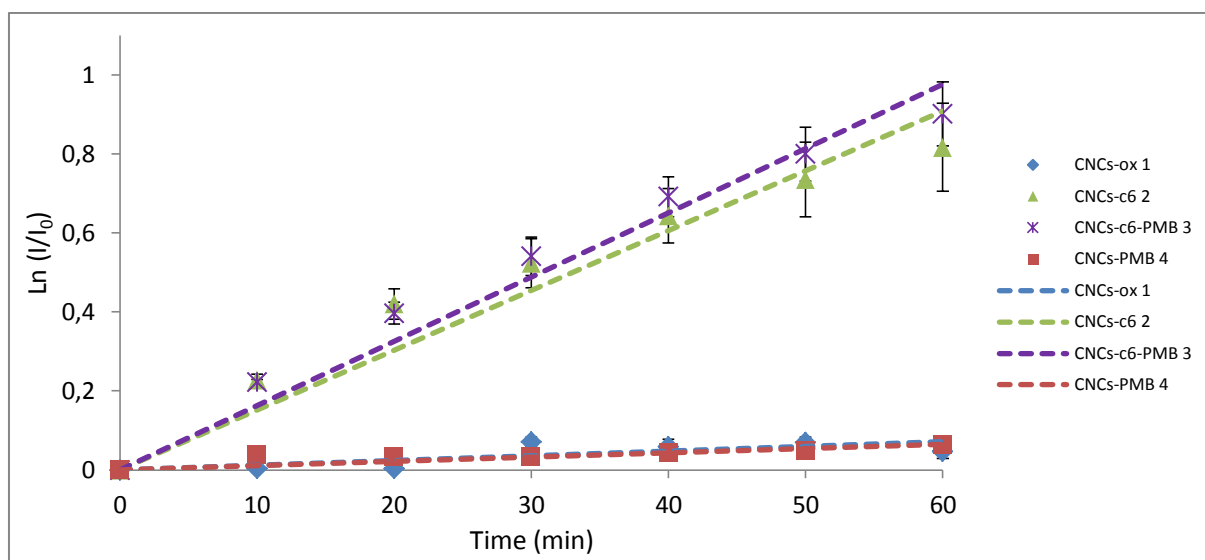


Figure 148 (Fig S4). Photooxidation of SOSG (10 μ M) under red light irradiation (400 LUX) in presence of CNCsox 1 (0.164 mg/mL), CNCsC6 2 (0.129 mg/mL), CNCsC6-PMB 3 (0.191 mg/mL), or CNCsPMB 4 (0.164 mg/mL) in DPBS (0.1X) . Values represent means $\pm$ standard deviation of three separate experiments.

V.4. Microscopie confocale de *S. aureus* au contact des nanocristaux

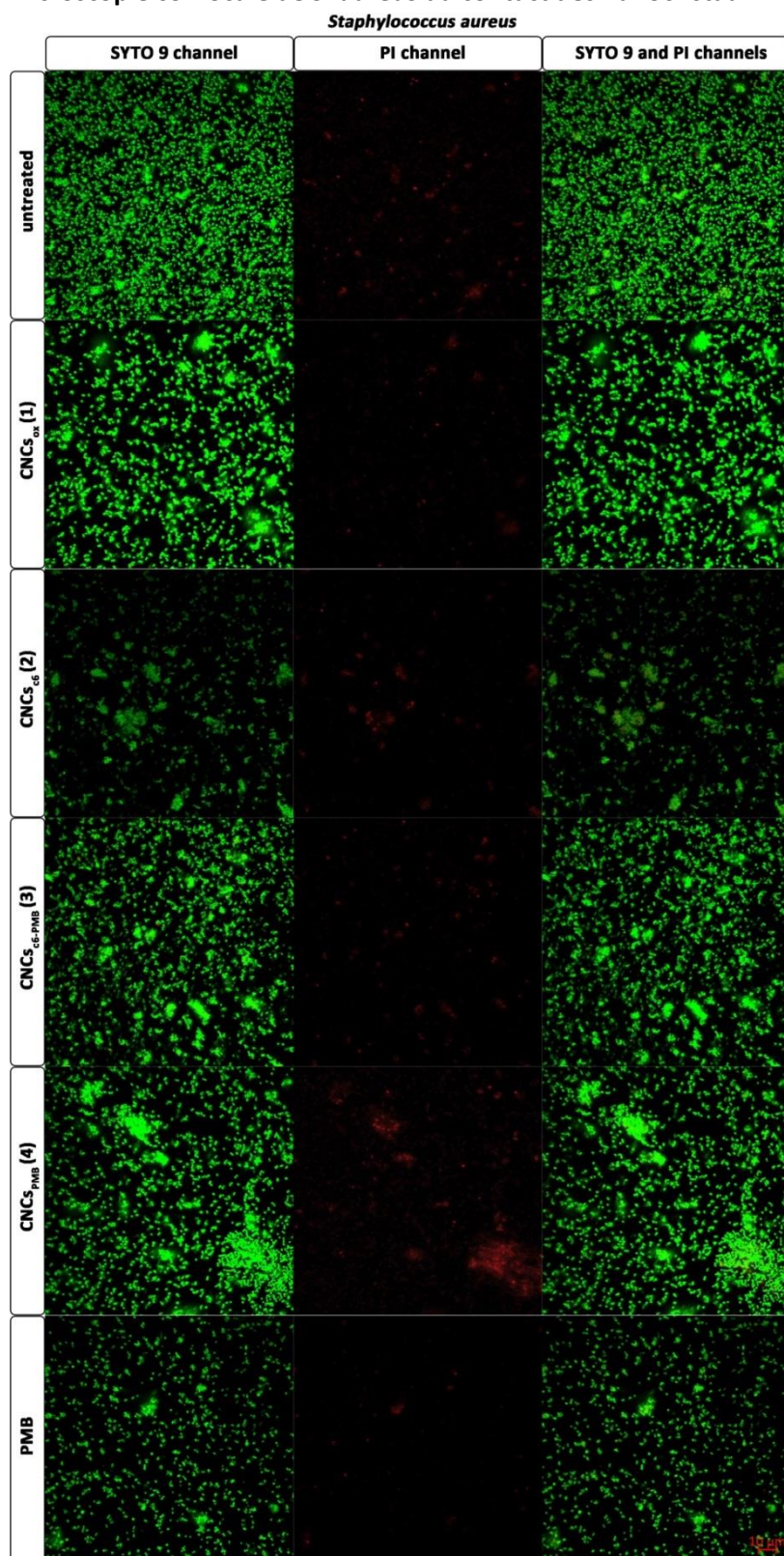


Figure 149 (Fig S5). Confocal laser scanning microscopy imaging of *S. aureus* in different conditions: untreated, in contact with the different CNCs or free PMB. LIVE/DEAD® BacLight™ was used to observe the viability of bacteria. Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green (SYTO9), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). Images were obtained after 30 min of contact at room temperature.

V.5. Microscopie confocale de *E. coli* au contact des nanocristaux

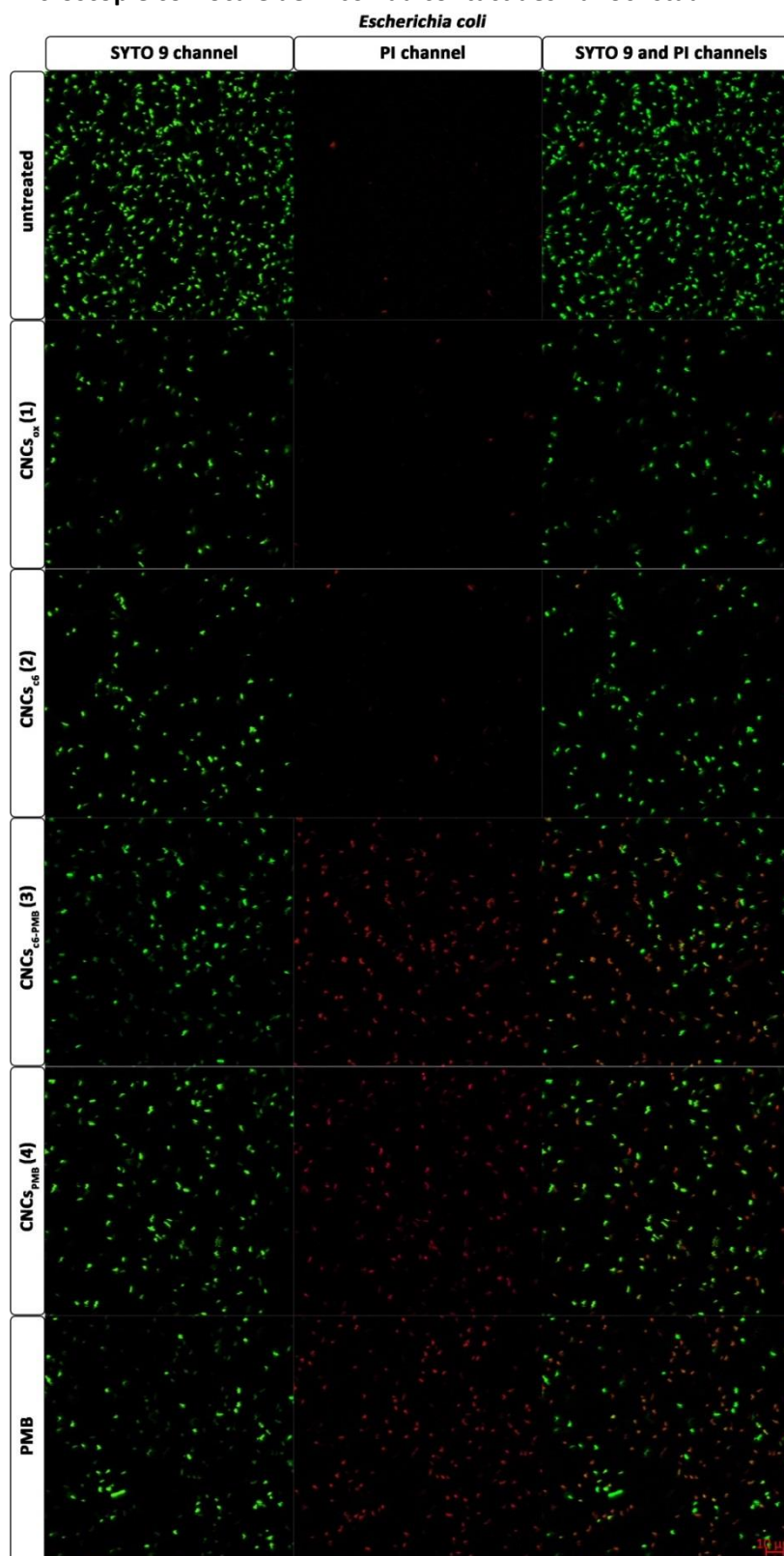


Figure 150 (Fig S6). Confocal laser scanning microscopy imaging of *E. coli* in different conditions: untreated, in contact with the different CNCs or free PMB. LIVE/DEAD® BacLight™ was used to observe the viability of bacteria. Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green (SYTO9), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). Images were obtained after 30 min of contact at room temperature.

V.6. Microscopie confocale de *P. aeruginosa* au contact des nanocristaux

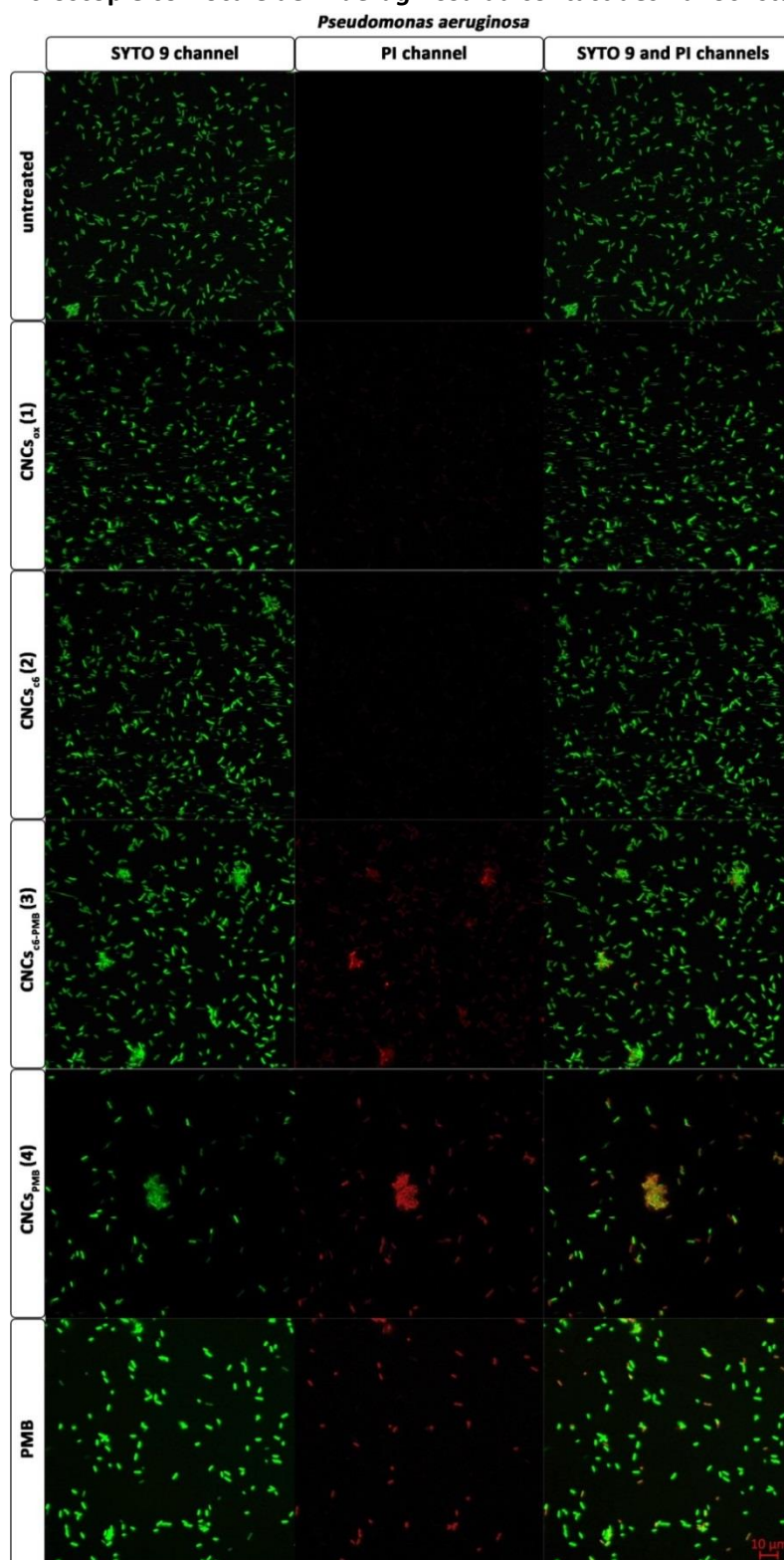


Figure 151 (Fig S7). Confocal laser scanning microscopy imaging of *P. aeruginosa* in different conditions: untreated, in contact with the different CNCs or free PMB. LIVE/DEAD® BacLight™ was used to observe the viability of bacteria. Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green (SYTO9), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). Images were obtained after 30 min of contact at room temperature.

V.7. Degré de substitution

Based on the maximum amount of units possible (Table S1) and their theoretical elementary analysis, a theoretical result for each nanocrystal was calculated (Table S2)

Table S1. Maximum Theoretical DS for each CNCs. Each unit has been represented by abbreviations: "COOH" for carboxyl units, "OH" for hydroxyl units, "c6" for units bearing a chlorin-e6-spermine, "PMB" for polymyxin units and "N-acyl" for N-acylisourea by-products units.

	COOH	OH	c6	PMB	N-acyl	Σ
CNCs_{ox} (1)	0.41	0.59	0	0	0	1
CNCs_{c6} (2)	0.15	0.59	0.21	0	0.05	1
CNCs_{c6-PMB} (3)	0	0.59	0.21	0.15	0.05	1
CNCs_{PMB} (4)	0.15	0.59	0	0.21	0.05	1

Table S2. Theoretical elementary analysis of the different CNCs (calculated with ChemBioDraw®).

	C	H	N	O
CNCs_{ox} (1)	43.0	5.5	0.000	51.4
CNCs_{c6} (2)	48.4	6.2	3.306	42.1
CNCs_{c6-PMB} (3)	50.3	6.7	5.610	37.4
CNCs_{PMB} (4)	46.5	6.4	4.217	42.9

Then, for each CNCs, the formula (Equation) has been applied to afford the estimation of DS (Table S3).

$$DS = \text{maximun DS} \times \frac{\text{increase of nitrogen content (experimental)}}{\text{increase of nitrogen content (theoretical)}}$$

Equation. Calculation of the DS.

Table S3. Estimated DS.

	c6	PMB
CNCs_{c6} (2)	0.19	0
CNCs_{c6-PMB} (3)	0.19	0.12
CNCs_{PMB} (4)	0	0.20

The yield of COOH on CNCs ox is 92 %. The combination of this yield with the oxidation degree then allowed the calculation of chlorin-e6 density on nanocrystals: $0.92 \times 21\% = 19\%$ where 21% correspond to DS maximum if only one half of the carboxylic substituted glucose units was used to graft the chlorin-e6.

VI. Résumé et conclusion

Les analyses physico-chimiques ont confirmé l'obtention des nanocristaux **CNCs_{c6-PMB} (3)** et montré des résultats cohérents indiquant la présence de la chlorine-e6 et de la PMB sur les nanocristaux. De plus, les greffages semblent donner de bons résultats, malgré un manque de précision pour le calcul des DS à cause des produits secondaires inhérents à l'utilisation de l'EDC. Néanmoins, les greffages semblent bien être de nature covalente, puisque les tests de diffusion sur milieu de culture gélosé ont montré l'absence de polymyxine libre, et que des essais de relargage dans des solutions ioniques n'ont rien donné.

Les essais biologiques ont montré la capacité des nanocristaux **CNCs_{c6-PMB} (3)** à inhiber la croissance d'un large spectre de bactérie, sous irradiation lumineuse. En adéquation avec la littérature, le dérivé de chlorure-e6 greffé sur les nanocristaux **CNCs_{c6} (2)** et **CNCs_{c6-PMB} (3)** permet de photoinactiver les bactéries Gram positif. De son côté, la PMB fixée a conservé sa capacité à inactiver les bactéries Gram négatif, malgré une moins bonne efficacité que sa forme libre. Ainsi, les nanocristaux **CNCs_{c6-PMB} (3)** ont bien une efficacité à large spectre sous irradiation lumineuse.

Les essais à des concentrations plus faibles ont permis d'observer un phénomène intéressant. En effet, alors que **CNCs_{c6} (2)** n'a jamais montré d'efficacité sur les bactéries Gram négatif, les nanocristaux **CNCs_{c6-PMB} (3)** ont la capacité d'induire la mort de ces bactéries sous l'effet de la lumière, à faible concentration. Les analyses de microscopie confocale ont permis d'observer la fragilisation de la membrane externe de ces souches au contact des nanocristaux recouverts de PMB. A l'instar de la polymyxine lysine, les PMB fixés semblent donc pouvoir engendrer une perturbation dans la membrane externe, sans forcément entraîner la mort bactérienne. De plus, des agrégations de bactéries ont été observées, ce qui pourrait indiquer un phénomène de « docking ». Ainsi, les bactéries Gram négatif au contact des nanocristaux **CNCs_{c6-PMB} (3)** ont une membrane externe fragilisée et une grande proximité avec la chlorure-e6, ce qui facilite l'action des ROS produits lors de l'irradiation lumineuse, et donc, ce qui induit une meilleure efficacité de l'aPDT.

De tel matériau ont un intérêt certain pour le milieu médical. En effet, l'utilisation de ces nanoparticules sur des plaies infectées permettrait d'obtenir une stérilisation rapide après une irradiation lumineuse adéquate. De plus, contrairement à la polymyxine B à l'état libre, ces particules ne sont pas supposées pénétrer dans le système sanguin, évitant ainsi les complications rénales. Enfin, la combinaison entre la chlorure-e6 et la PMB permet d'obtenir un effet photobactéricide sur les souches Gram négatif, ce qui permet de réduire la quantité de polymyxine utilisée et donc l'apparition de souches résistantes.

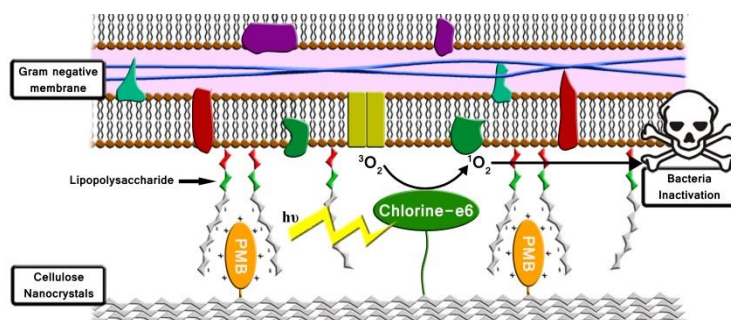


Figure 152. Schématisation de l'interaction entre les nanocristaux **CNCs_{c6-PMB} (3)** et les bactéries Gram négatif.

Conclusion et perspectives

Dans le but de valoriser l'aPDT en tant qu'application antibactérienne concrète, trois études ont été réalisées au cours de ce travail.

Alors que les porphyrines cationiques sont très présentes en aPDT, une étude chimique, photophysique et photobactéricide sur de nouvelles porphyrines cationiques a été réalisée. Les porphyrines *N*-méthyl pyridinium sont déjà réputées pour leur efficacité à large spectre, cette étude a mis en avant de nouvelles porphyrines présentant des groupes imidazolium. Alors que les porphyrines *N*-méthyl pyridinium restent des PS très efficaces, cette famille de porphyrine est sujette à des nombreux transferts énergétiques, ce qui peut entraîner une extinction des émissions (et de la production d'oxygène singulet). De plus, la réactivité des acides carboxyliques présents sur ce genre de porphyrine est fortement réduite, ce qui nécessite de repenser les stratégies de synthèse. D'un autre côté, les porphyrines phénylimidazoliums ont montré de nombreux avantages, comme des rendements de synthèse plus élevés, des propriétés photophysiques plus stables et une activité significative sur *Escherichia coli*. Enfin les porphyrines méthylimidazoliums sont moins enclines aux transferts énergétiques. De plus, un dérivé symétrique portant deux acides carboxyliques a montré un haut rendement de production d'oxygène singulet, ce qui rend ce composé particulièrement intéressant dans le cas d'étude utilisant deux agents de vectorisation. Ainsi, cette étude apporte un support adéquat dans le choix du type de porphyrine cationique dans le cas d'un couplage avec un agent de vectorisation.

Afin d'améliorer l'interaction entre une porphyrine cationique et les bactéries Gram négatif, nous avons associé cette dernière à deux différents dérivés de polymyxine, via un bras « spacer » et grâce à une réaction « click-thiol maléimide ». Ces deux composés ont été caractérisés, et mis au contact de différentes bactéries. Le premier composé fut conçu avec une partie peptidique proche de la structure originale des polymyxines. Grâce à l'association de ces deux molécules, le composé a montré une très bonne activité photobactéricide, et ce, dès les premiers apports de lumière blanche. Des analyses en cytométrie en flux et de microscopie confocale ont montré que ce composé arbore une forte interaction pour les bactéries Gram positif et Gram négatif. En effet, alors que son affinité pour la première catégorie est induite par la haute charge cationique du composé, l'interaction forte pour les bactéries Gram négatif est due à la partie peptidique qui a conservé son activité, malgré le couplage avec le PS. Même si ce composé semble être plus enclin à subir l'endocytose de la part des cellules humaines que le PS seul, les résultats ont montré que ce produit a une interaction hautement sélective pour les bactéries. Etant donné l'importance de la proximité du PS avec sa cible en PDT, une telle sélectivité et efficacité pourrait indiquer un effet photobactéricide à large spectre, bien avant tout effet secondaire sur les cellules humaines.

Puisque la partie peptidique a subi une faible modification, son activité bactéricide fut majoritairement conservée, ce qui peut entraîner l'émergence de souches résistantes. Afin d'optimiser le composé précédent, une étude supplémentaire a été réalisée visant à obtenir un composé aussi efficace, mais arborant une activité bactéricide réduite de part de la partie peptidique. Les derniers acides aminés butyriques ont été remplacés par des lysines dans la structure du peptide. Alors que ces modifications ont entraîné une perte d'activité significative de la part de la partie peptidique, le nouveau composé a, quant à lui, obtenu des résultats prometteurs après irradiation lumineuse. En effet, malgré des concentrations d'inhibition légèrement plus élevées que précédemment, l'efficacité du nouveau composé à base lysine est bien au supérieure à celle du PS seul. De plus, les analyses en cytométrie en flux et en microscopie confocale ont montré que ce nouveau composé a d'une interaction stable pour les bactéries, et qu'il dispose aussi de la capacité

de perméabiliser la paroi externe. Néanmoins, à cause des modifications importantes dans la structure du peptide, une interprétation plus approfondie des résultats est impossible puisque le fonctionnement décrit pour les polymyxines n'est probablement plus garanti.

Basé sur une idée similaire, un nouveau matériel a été élaboré dans une dernière étude. Le LCSN est reconnu pour ses travaux utilisant des nanocristaux de cellulose en tant plateforme afin de « porter » des molécules actives (dont des PS). Ainsi, des nanocristaux de cellulose oxydés ont partiellement été recouvert d'un PS d'origine naturelle (la chlorine-e6) afin de créer un matériel photobactéricide biosourcé. Etant donné le caractère neutre de ce PS, son efficacité sur les bactéries Gram négatif s'est révélé être assez faible. Pour remédier à ce problème, des polymyxines ont été aussi greffées sur ces nanocristaux afin d'obtenir un large spectre d'activité. Ces nanoparticules biosourcés ont montré une efficacité à large spectre selon deux méthodes, la thérapie photodynamique antimicrobienne et la prophylaxie antibiotique. Des expériences approfondies ont montré que ces nanoparticules arboraient une activité photobactéricide sur les bactéries Gram négatif. Puisque l'apparition de cette capacité fut induite par le greffage de polymyxines, un effet synergique entre ce peptide et le PS neutre a pu être démontré. En effet, il semblerait que les bactéries Gram négatif soient sujettes à un effet de « docking » au contact de ces nanocristaux via l'interaction entre le peptide et les LPS. Enfin, le peptide ayant partiellement conservé sa capacité à fragiliser la paroi bactérienne, offre une opportunité intéressante pour les ROS.

L'ensemble des travaux réalisés ont montré l'intérêt d'utiliser la polymyxine afin d'optimiser l'aPDT, grâce à une synergie entre ce peptide et les différents PS. En plus d'une perméabilisation membranaire qui offre une meilleure activité de la part des ROS, ce peptide permet de vectoriser le PS vers les bactéries Gram négatif. Ces travaux rejoignent d'anciennes études qui encourageaient déjà l'utilisation d'AMP afin d'optimiser l'aPDT. A partir de l'ensemble de ces travaux, nous pouvons maintenant affirmer que la fragilisation des parois bactériennes par divers agents offre une opportunité unique d'améliorer l'efficacité de l'aPDT. En effet, l'activité antibactérienne des ROS a pu atteindre un niveau proche à celle des antibiotiques grâce à l'utilisation de peptides modifiés (ou mimétiques), fixés ou à de faible concentration. A l'instar de la PDT et la chimiothérapie, qui sont devenus complémentaires, nous pensons que l'association de l'aPDT et la prophylaxie antibiotique peut offrir des résultats prometteurs dans la lutte contre les souches bactériennes résistantes, de par ses résultats et de par aussi, son introduction plus faisable sur le marché.

En ce qui concerne les travaux de cette thèse, différentes perspectives sont possibles. Le conjugué présentant une polymyxine active et les nanocristaux biosourcés sont de très bons candidats pour des études plus approfondies, comme l'utilisation de modèle 3D ou *in vivo*. En effet, au-delà de leur propriété photobactéricide intéressante, ces composés disposent encore d'une activité antibiotique ce qui pourrait permettre une potentielle introduction sur le marché, étant donné la place immuable des antibiotiques dans la croyance collective. L'utilisation de composés reposant simultanément sur l'aPDT et la prophylaxie antibiotique offre de nombreux avantages. En plus d'un large spectre d'activité, l'efficacité des composés est garantie quel que soit l'environnement lumineux d'un patient. De plus, la probabilité de voir apparaître une souche résistante est diminuée car l'aPDT participe à l'effet bactéricide. Néanmoins, si une de ces souches venait à émerger, un apport de lumière adéquate pourrait permettre d'inhiber cette dernière et permettrait de prolonger la durée d'efficacité de l'antibiotique.

Enfin, le conjugué portant un peptide faiblement actif offre une occasion d'unique de défier les limites de l'aPDT. En effet, alors que son effet bactéricide est induit par la production de ROS, il est néanmoins optimisé par l'interaction de la partie peptidique. Alors que certains spécialistes de l'aPDT s'accordent à dire que le développement d'une résistance bactérienne n'est pas inimaginable²⁶⁷, cette question est particulièrement pertinente pour les composés utilisant des vecteurs. En effet, une étude approfondie de ce genre de composé devrait révéler si les bactéries peuvent évoluer pour perdre leur interaction, alors que l'effet bactéricide n'est induit que par l'aPDT.

Partie expérimentale

I. Chapitre 3

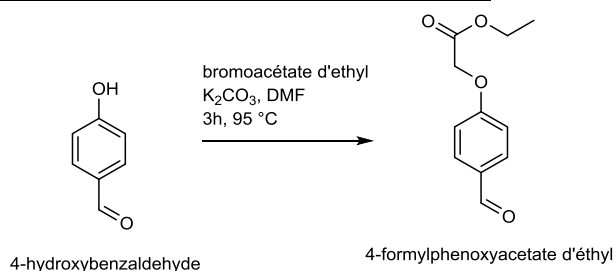
I.1. Procédures générales

L'ensemble des réactifs, solvants et milieux nutritifs ont été obtenus par l'intermédiaire de différents fournisseurs (Acros Organics, Alfa Aesar, Grosseron, Sigma-Aldrich, TCI). Pour les mesures d'absorption et les caractérisations photophysiques, des solvants de qualité spectroscopique ont été utilisés et stockés à l'abri de la lumière. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silices Merck 60F254, et une silice Merck (60 ACC, 15- 40 μm) a été utilisée pour les purifications par chromatographie. Les chromatographies en phase inverse ont été réalisées à l'aide de colonnes RediSep®Rf C18 (43g), montées sur un appareil Interchim® puriFlash™ 430. Les éluants utilisés sont l'acétonitrile (qualité HPLC +0.1% TFA) et l'eau distillée (+0.1% TFA). La phase mobile est triée selon son absorbance à $\lambda = 418 \text{ nm}$ (bande Soret des porphyrines).

Les analyses RMN (^1H et ^{13}C) ont été obtenues à partir d'échantillons parfaitement dissous dans des solvants deutérés, à l'aide d'un spectromètre Bruker DPX 400 et 500. Les déplacements chimiques (δ en ppm) ont été calculés à partir de l'étalon interne (tétraméthylsilane, TMS). Les profils ont été décrits selon le code suivant : s= singulet, d= doublet, t=triplet, q= quadruplet et enfin m= multiplet. Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées par ionisation en électrobulbion positif (ESI+) sur un Sciex 4000 Q-TRAP®, contrôlé sous Sciex Analyst 1.6.2.

I.2. Synthèse

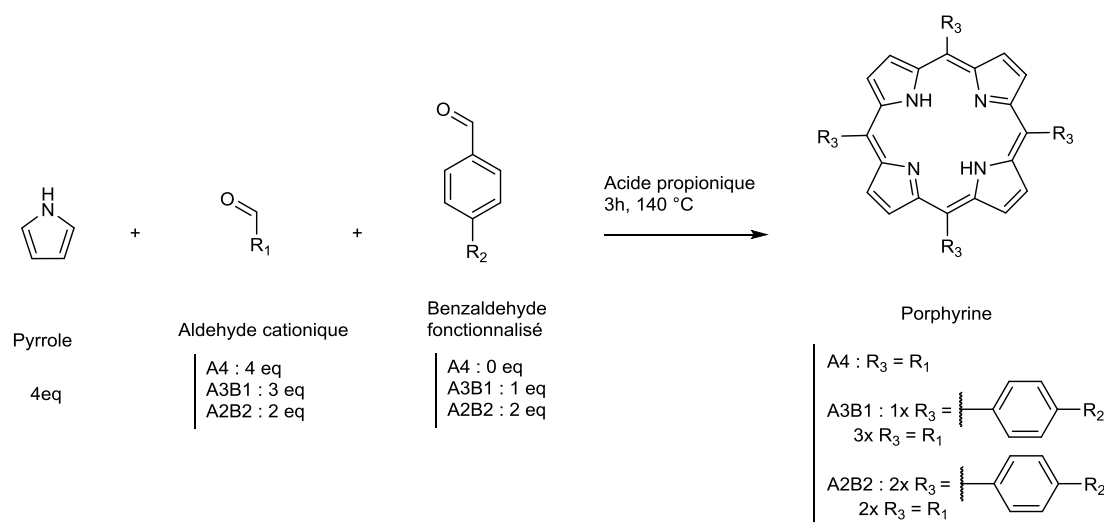
I.2.1. Synthèse du 4-formylphenoxyacetate d'éthyle



Une solution de DMF contenant du 4-hydroxybenzaldehyde (1,00 g, 8,20 mmol, 1 eq), du bromoacétate d'éthyle (0,90 mL, 8,20 mmol, 1 eq) et du carbonate de potassium (3 g), est agitée pendant 3 heures à 95°C . Après évaporation du solvant, le produit est dissous dans du chloroforme. La phase organique est lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après séchage sur MgSO_4 , le solvant est évaporé afin d'obtenir le produit final sous forme de poudre jaunâtre, avec 90% de rendement (1,53 g, 7,38 mmol).

- CCM (Hexane/Acétate d'éthyle, 7/3, v/v) : $R_f = 0,57$

1.2.2. Procédure générale pour la synthèse de porphyrines



Du pyrrole distillé (6,66 mL, 96,0 mmol, 4 eq) est déposé goutte à goutte, via une ampoule de coulée, dans une solution en reflux d'acide propionique (120 mL) contenant :

➤ L'aldéhyde cationique :

- 4-pyridylcarboxaldehyde ou 4-imidazolebenzaldehyde ou *N*-méthyl-4-imidazolecarboxaldehyde
- 4 eq pour obtenir une porphyrine A4, 3 eq pour une A3B, et 2 eq pour une A2B2.

➤ Le benzaldéhyde fonctionnalisé :

- 4-formylbenzoate de méthyle ou 4-acetamidobenzaldehyde ou 4-formylphenoxyacetate d'éthyle
- 1 eq pour obtenir une porphyrine A3B, et 2 eq pour une A2B2

Après 3 heures à reflux et sous agitation, l'acide propionique est évaporé et le brut est solubilisé dans du chloroforme pour être filtré à travers de la silice, qui est lavée avec un mélange $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (90/10, v/v). Après évaporation du solvant, les porphyrines protégées sont purifiées par chromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (98/2, v/v)) avec les rendements suivants :

- Porphyrines A4 : 10% pour **1a**, 15% pour **3a**, 2% pour **5a**
- Porphyrines A3B1 : 5% pour **1b**, 2% pour **1d**, 13% pour **3b**, 10 pour **3c**, 5% pour **5b**
- Porphyrines A2B2 : 5% pour **5e**

1a :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) : 9,06 (d, $J = 6,0$ Hz, 8H, Ho-py), 8,87 (s, 8H, Hpyrr), 8,16 (d, $J = 6,0$ Hz, 8H, Hm-py), -2,90 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+)** : $[\text{C}_{40}\text{H}_{26}\text{N}_8]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 310,11 calculée, 310,31 trouvée

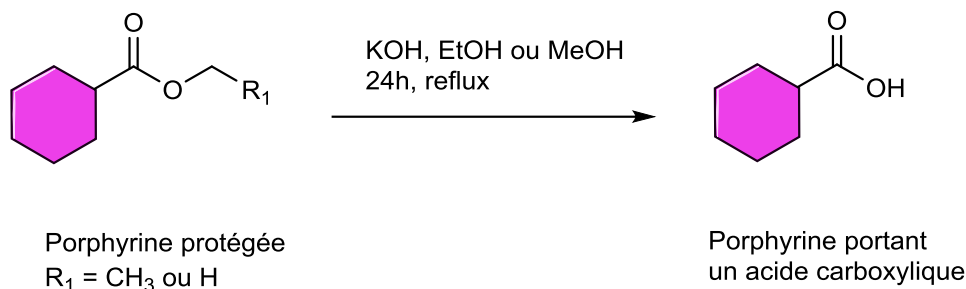
3a :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 9/1 MeOD, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,92 (s, 8H, Hpyrr), 8,36 (d, $J = 8,3$ Hz, 8H, Ho-phe), 8,26 (s, 4H, Him-2), 7,86 (d, $J = 8,3$ Hz, 8H, Hm-phe), 7,67 (s, 4H, Him-5), 7,34 (s, 4H, Him-4), -2,96 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+)** : $[\text{C}_{56}\text{H}_{38}\text{N}_{12}]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 440,16 calculée, 440,04 trouvée

5a :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 9/1 MeOD, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,88 (m, 8H, Hpyrr), 7,67 (m, 4H, Him-5), 7,51 (d, 4H, Him-4), 3,45 (m, 12H, N-CH_3), -2,92 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+)** : $[\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_{12}]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 316,13 calculée, 316,26 trouvée

1.2.3. Saponification des esters



Les esters des porphyrines A3B sont saponifiés dans une solution en reflux d'éthanol (pour les esters de méthyl) ou de méthanol (pour les esters d'éthyl) contenant de l'hydroxyde de potassium (2 mL, 2 mol/L), pendant 24 heures. Après évaporation du solvant, un excès d'acide chlorhydrique est ajouté au brut réactionnel jusqu'à l'apparition d'une coloration verte. Les porphyrines déprotégées sont ensuite extraites de la phase aqueuse par des lavages avec un mélange CHCl_3 /Triéthylamine (99/1, v/v). Après séchage sur MgSO_4 , les porphyrines portant un acide carboxylique sont purifiées par chromatographie (CHCl_3 /EtOH (80/20, v/v)) avec un rendement de 90%.

1b :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 9/1 MeOD, 500 MHz) : δ (ppm) : 9,40 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H, Ho-py), 8,98 – 8,86 (m, 8H, Hpyrr), 8,92 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H, Hm-py), 8,58 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ho-phe), 8,42 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Hm-phe), -2,80 (s, 2H, NH)
- MS (ESI+) : $[\text{C}_{42}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_2]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 331,61 calculée, 331,64 trouvée

3b :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 9/1 MeOD, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,90 (s, 8H, Hpyrr), 8,46 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, Ho-phe_{COOH}), 8,35 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, Hm-phe_{COOH}), 8,30 (d, $J = 8,3$ Hz, 6H, Ho-phe), 8,24 (s, 3H, Him-2), 7,86 (d, $J = 8,3$ Hz, 6H, Hm-phe), 7,68 (s, 3H, Him-5), 7,34 (s, 3H, Him-4), -2,91 (s, 2H, NH)
- MS (ESI+) : $[\text{C}_{54}\text{H}_{36}\text{N}_{10}\text{O}_2]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 429,15 calculée, 429,03 trouvée

3c :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 9/1 MeOD, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,88 (m, 8H, Hpyrr), 8,31 (d, $J = 8,1$ Hz, 6H, Ho-phe), 8,19 (s, 3H, Him-2), 8,14 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Ho-phe_o), 7,78 (d, $J = 8,1$ Hz, 6H, Hm-phe), 7,59 (s, 3H, Him-5), 7,38 (s, 3H, Him-4), 7,31 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Hm-phe_o), 4,77 (s, 2H, O-CH₂-), -2,75 (s, 2H, NH)
- MS (ESI+) : $[\text{C}_{55}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_3]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 444,15 calculée, 444,17 trouvée

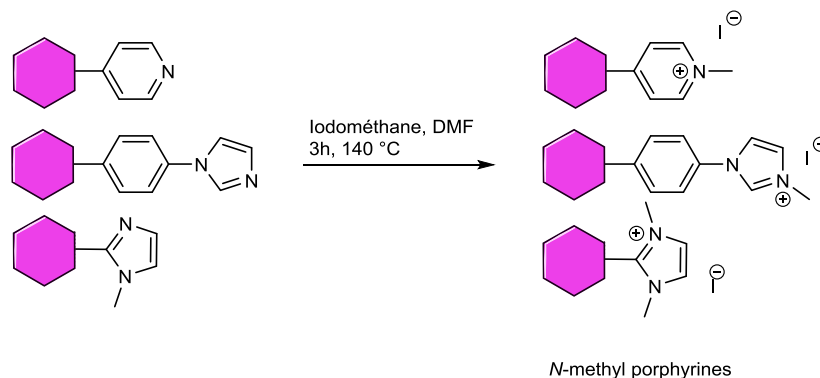
5b :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 9/1 MeOD, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,88 (m, 8H, Hpyrr), 8,42 (m, 2H, Ho-phe_{COOH}), 8,19 (m, 2H, Hm-phe_{COOH}), 7,65 (m, 3H, Him-5), 7,51 (m, 3H, Him-4), 3,45 (m, 9H, N-CH₃), -2,96 (s, 2H, NH)
- MS (ESI+) : $[\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_2]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 336,13 calculée, 336,15 trouvée

5e :

- $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) : 8,85 (m, 8H, Hpyrr), 8,43 (m, 4H, Ho-phe_{COOH}), 8,19 (m, 4H, Hm-phe_{COOH}), 7,67 (s, 2H, Him-5), 7,47 (s, 2H, Him-4), 3,44 (m, 6H, N-CH₃), -2,78 (m, 2H, NH) ppm ;
- MS (ESI+) : $[\text{C}_{42}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}_4]$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 356,12 calculée, 356,16 trouvée

1.2.4. N-méthylation des porphyrines



Un excès d'iodométhane (60 eq pour les porphyrines A4, 45 eq pour les A3B ou 30 eq pour les A2B2) est introduit dans une solution de DMF anhydre (25 mL) contenant la porphyrine (1eq). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures à reflux (140 °C). Après évaporation du solvant et de l'excès d'iodométhane, la porphyrine *N*-méthylée est récupérée de façon quantitative.

2a :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 9,51 (d, J = 6,6 Hz, 8H, *Ho*-py), 9,18 (s, 8H, *Hpyrr*), 9,00 (d, J = 6,6 Hz, 8H, *Hm*-py), 4,74 (s, 12H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$), -3,08 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{I}_4\text{N}_8]$, $[\text{M}+\text{H}]^{4+}$ 169,83 calculée, 169,81 trouvée

2b :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 9,49 (d, J = 6,5 Hz, 6H, *Ho*-py), 9,15 – 8,99 (m, 8H, *Hpyrr*), 9,01 (d, J = 6,5 Hz, 6H, *Hm*-py), 8,41 (m, 4H, *Hphe*), 4,73 (s, 9H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$), -2,99 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{I}_3\text{N}_7\text{O}_2]$, $[\text{M}]^{2+}$ 353,14 calculée, 352,65 trouvée

4a :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 10,13 (s, 4H, *Him*-2), 8,93 (s, 8H, *Hpyrr*), 8,65 (s, 4H, *Him*-4), 8,53 (d, J = 8,3 Hz, 8H, *Ho*-phe), 8,27 (d, J = 8,3 Hz, 8H, *Hm*-phe), 8,14 (s, 4H, *Him*-5), 4,10 (s, 12H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$), -2,88 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{60}\text{H}_{50}\text{I}_4\text{N}_{12}]$, $[\text{M}]^{4+}$ 234,60 calculée, 234,70 trouvée

4b :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 10,13 (s, 3H, *Him*-2), 8,93 (s, 8H, *Hpyrr*), 8,65 (s, 3H, *Him*-4), 8,54 (d, J = 8,2 Hz, 6H, *Ho*-phe), 8,42 (d, J = 8,1 Hz, 2H, *Ho*-phe_{COOH}), 8,36 (d, J = 8,1 Hz, 2H, *Hm*-phe_{COOH}), 8,26 (d, J = 8,3 Hz, 6H, *Hm*-phe), 8,14 (s, 3H, *Him*-4), 4,10 (s, 9H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$), -2,88 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{57}\text{H}_{45}\text{I}_3\text{N}_{10}\text{O}_2]$, $[\text{M}]^{3+}$ 300,47 calculée, 300,41 trouvée

4c :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 10,13 (s, 3H, *Him*-2), 8,92 (m, 8H, *Hpyrr*), 8,65 (s, 3H, *Him*-4), 8,54 (d, J = 8,3 Hz, 6H, *Ho*-phe), 8,26 (d, J = 8,3 Hz, 6H, *Hm*-phe), 8,15 (d, J = 8,6 Hz, 2H, *Ho*-phe_o), 8,14 (s, 3H, *Him*-5), 7,40 (d, J = 8,6 Hz, 2H, *Hm*-phe_o), 4,99 (s, 2H, *O*-CH₂-), 4,10 (s, 9H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$), -2,87 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{58}\text{H}_{47}\text{I}_3\text{N}_{10}\text{O}_3]$, $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ 310,79 calculée, 310,75 trouvée

6a :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 9,40 (s, 8H, *Hpyrr*), 8,55 (s, 8H, *Him*), 3,75 (s, 24H, N-CH_3), -3,22 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{I}_4\text{N}_{12}]$, $[\text{M}]^{4+}$ 172,59 calculée, 172,54 trouvée

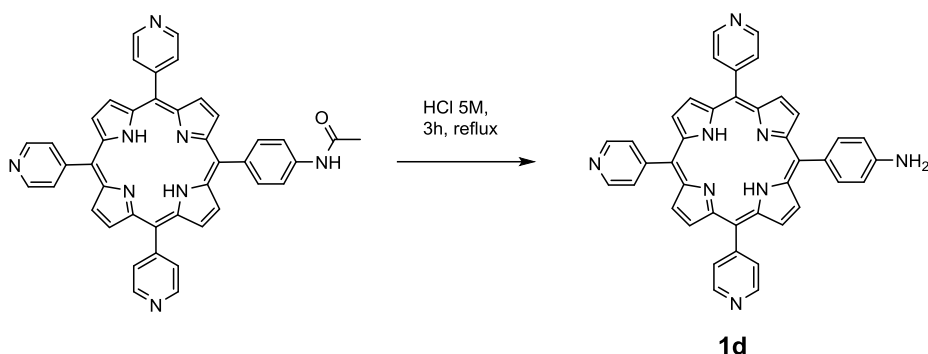
6b :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 9,23 (m, 8H, *Hpyrr*), 8,52 (s, 6H, *Him*), 8,47 (d, J = 8,2 Hz, 2H, *Ho*-phe_{COOH}), 8,39 (d, J = 8,2 Hz, 2H, *Hm*-phe_{COOH}), 3,75 (m, 18H, N-CH_3), -3,00 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{42}\text{H}_{39}\text{I}_3\text{N}_{10}\text{O}_2]$, $[\text{M}]^{3+}$ 238,44 calculée, 238,50 trouvée

6e :

- **^1H RMN (DMSO_{d6} , 500 MHz) : δ (ppm) :** 9,15 (m, 8H, Hpyrr), 8,51 (s, 4H, Him), 8,43 (d, $J = 8,1$ Hz, 4H, Ho-phe_{COOH}), 8,38 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, Hm-phe_{COOH}), 3,75 (s, 12H, N-CH₃), -2,81 (s, 2H, NH ;
- **MS (ESI+) :** $[\text{C}_{44}\text{H}_{36}\text{I}_2\text{N}_8\text{O}_4], [\text{M}]^{2+}$ 370,14 calculée, 370,04 trouvée

I.2.5. Synthèse de la 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)-21H,23H-porphyrine (1d)

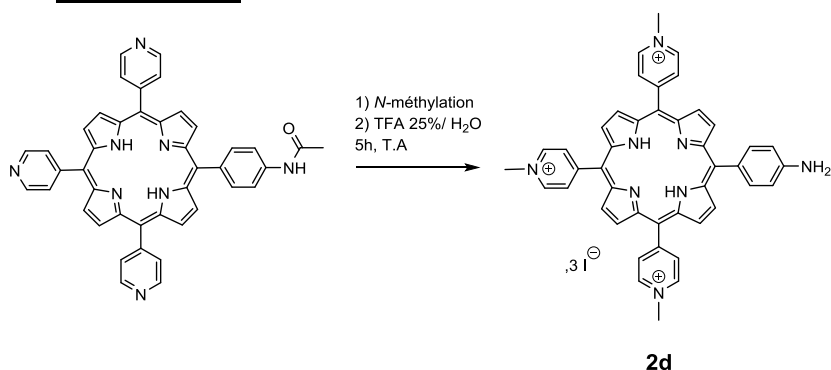


De la 5-(4-acetamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)-21H,23H-porphyrine (250 mg, 0,373 mmol) est mise à reflux dans une solution d'acide chlorhydrique concentrée (5M, 250 mL) pendant 3 heures. Après évaporation du solvant, le produit est extrait de la phase aqueuse par des lavages à l'aide d'un mélange CHCl₃/TEA (90/10, v/v). Après séchage sur MgSO₄, le solvant est évaporé afin de récupérer la porphyrine **1d** de façon quantitative.

1d :

- **¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) :** 9,02 (d, J= 5,5 Hz, 6H, Ho-py), 9,02 – 8,80 (m, 8H, Hpyrr), 8,16 (d, J= 5,5 Hz, 6H, Hm-py), 7,98 (d, J= 8,0 Hz, 2H, Ho-phe), 7,08 (d, J= 8,0 Hz, 2H, Hm-phe), - 2,91 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** [C₄₁H₂₈N₈], [M+2H]²⁺ 317,12 calculée, 316,93 trouvée

I.2.6. Synthèse de la 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-N-méthylpyridyl)-21H,23H-porphyrine (2d)



Tout d'abord, la 5-(4-acetamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)-21H,23H-porphyrine est N-méthylée selon le protocole établi précédemment (I.2.4). Ensuite, le produit est directement dissous dans un mélange Eau/TFA (75/25, v/v) et agité pendant 5 heures à température ambiante. La solution aqueuse est évaporée, puis la porphyrine **2d** est récupérée après lyophilisation, avec un rendement quantitatif.

2d :

- **¹H RMN (DMSO-d₆, 500 MHz) : δ (ppm) :** 9,49 (d, J= 6,5 Hz, 6H, Ho-py), 9,11 – 8,80 (m, 8H, Hpyrr), 9,00 (d, J= 6,5 Hz, 6H, Hm-py), 7,94 (d, J= 8,5 Hz, 2H, Ho-phe), 7,15 (d, J= 8,5 Hz, 2H, Hm-phe), 4,73 (s, 9H, N⁺-CH₃), -2,96 (s, 2H, NH)
- **MS (ESI+) :** [C₄₄H₃₇I₃N₈], [M]³⁺ 225,77 calculée, 225,74 trouvée

1.3. Propriétés photophysiques

Les porphyrines cationiques (*N*-méthylées) sont préalablement dissoutes dans un volume de DMSO (100 µL). Puis des dilutions sont effectuées afin d'obtenir toutes les différentes porphyrines dans le même solvant d'intérêt (EtOH) avec des absorptions homogènes ($A \sim 1$ pour la détermination des coefficients d'absorption et $A \sim 0,2$ pour les autres propriétés photophysiques). Les mesures ont été effectuées dans une cuve de 10 mm en quartz.

1.3.1. Détermination des coefficients d'absorption (epsilons)

Les spectres d'absorption ont été enregistrés par un spectromètre SPECORD® 210 à double faisceau. Suites aux dilutions, la concentration en DMSO est toujours en dessous de 1%. Les spectres d'absorption ont été réalisés entre 300 et 800 nm avec des solutions titrées de porphyrines. Les epsilons ont été calculés en suivant la loi de Beer-Lambert :

$$\varepsilon = \frac{A}{l.C}$$

Équation 6. La Loi de Beer-Lambert, avec ε le coefficient d'absorption molaire ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$), A l'absorbance, l la largeur de la cuve (1 cm) et C la concentration en porphyrine ($mol.L^{-1}$)

1.3.2. Fluorescence et production d'oxygène singulet

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés par un spectrofluoromètre Fluorolog FL3-222 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau) équipé d'une lampe Xénon de 450 W, d'un compartiment thermostaté à 25 °C, d'un photomultiplicateur R928 (Hamamatsu Japon) et d'un détecteur infrarouge InGaAs (DSS-16A020L, Electro-Optical System Inc. Phoenixville, PA, USA). Le faisceau d'excitation a été diffracté par un monochromateur SPEX double réseau (1200 raies/mm blisé à 330 nm). Le faisceau d'émission a été diffracté par un monochromateur SPEX double réseau (1200 raies/mm blisé à 500 nm). L'oxygène singulet a été détecté par l'intermédiaire d'un monochromateur SPEX double réseau (600 raies/mm blisé à 1 µm) et un filtre passe-haut (780 nm).

Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'une cuve en quartz à 4 faces. Les rendements quantiques de fluorescence ont été déterminés par comparaison avec la tétraphényl-porphyrine (TPP) diluée dans le toluène ($\phi_F = 0,11$), selon la formule suivante :

$$\phi_F = \phi_{F_0} \frac{I_F}{I_{F_0}} \frac{DO_0}{DO} \left(\frac{n}{n_0} \right)^2$$

Équation 7. Calcul du rendement quantique de fluorescence par rapport à une référence ($_0$) avec, ϕ_F le rendement quantique, I l'intensité de la phosphorescence, DO l'absorption à la longueur d'onde d'excitation et n l'indice de réfraction du solvant.

La production d'oxygène singulet a été mesurée par simple observation de la bande d'émission à 1270 nm (Chapitre 2.II.1.2, page 39). La 5-(4-carboxylphényl)-10,15,20-triphényl-21*H*,23*H*-porphyrine (TPP-COOH) a été utilisée comme référence dans l'éthanol ($\phi_{\Delta} = 0,54$), alors que la TMPyP **2a** fut utilisée pour les analyses dans le D₂O ($\phi_{\Delta} = 0,90$), en suivant l'équation :

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta_0} \frac{I}{I_0} \frac{DO_0}{DO}$$

Équation 8. Calcul du rendement quantique de production d'oxygène singulet par rapport à une référence (ϕ_0) avec, ϕ_{Δ} le rendement quantique, I l'intensité de la phosphorescence et DO l'absorption à la longueur d'onde d'excitation

1.3.3. Temps de vie

L'obtention des temps de vie a été effectuée sous l'excitation d'une diode laser pulsé, à 407 nm (LDH-P-C-400M, FWHM < 70 ps, 1 MHz), couplé à un pilotage PDL 800-D (PicoQuant GmbH, Berlin, Allemagne), à un détecteur photodiode avalanche SPCM-AQR-15 (EG & G, Vaudreuil, Canada) et à un filtre passe-haut de 550 nm. Les acquisitions ont été traitées par un module PicoHarp 300 avec un routeur PHR-800 4 (PicoQuant GmbH, Berlin, Allemagne). Les temps de vie ont été obtenus en considération avec la méthode de mesure des photons. 1000 signaux ont été accumulés et analysés en utilisant le logiciel TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting) (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany), basé sur la reconvolution itérative de l'algorithme de Levensberg-Marquandt.

Les temps de vie de l'oxygène singulet ont été obtenus par un spectrophotomètre TEMPRO-01 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau), composé d'une source pulsé diode (415 nm, SpectraLED-415), d'un monochromateur d'émission (600–2000 nm) et d'un tube photomultiplicateur infrarouge H10330-45 avec un refroidisseur thermoélectrique pour la détection (Hamamatsu, Japan). L'appareillage est contrôlé par un compteur de photons FluoroHub-B, une DataStation et par le logiciel DAS6 (Horiba Jobin Yvon).

I.4. Essais biologiques

I.4.1. Cultures microbiologiques

Les souches bactériennes Gram positif (*S. aureus* CIP76.25) et Gram négatif (*P. aeruginosa* CIP76110 et *E. coli* CIP54.8T) ont été fournis par l'Institut Pasteur (Paris). Ces souches sont cultivées dans un bouillon à base de Tryptone-Soja (extraits de caséine pancréatique 17 g/L, farine de soja clivée par papaïnes 3 g/L, dextrose 2,5 g/L, chlorure de sodium 5 g/L et hydrogénophosphate de potassium 2,5 g/L) et incubées pendant la nuit à 37 °C en condition aérobie.

I.4.2. Photoinactivation de bactéries

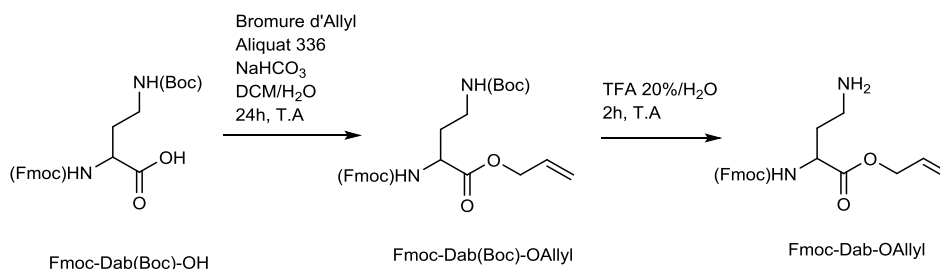
Des solutions de porphyrines (**2a**, **4a** et **6a**) sont préalablement préparées dans du DMSO. Ces dernières sont ensuite diluées dans du milieu de culture, de tel sorte que le DMSO ne dépasse pas 1% en concentration. A partir de ces solutions, des dilutions en série (1 mL, de 100 µM à 156 nM) sont déposées dans une plaque 24 puits. Ensuite, une suspension bactérienne est déposée dans chaque puit (1 mL à 2×10^5 UFC/mL). Une plaque est incubée à 37 °C (Heidolph Unkubator 1000), sous agitation (200 tr/min, plateforme Unimax 1010) et sous l'irradiation lumineuse de LED blanches pendant 20 heures. La puissance lumineuse est de 4,83 mW/cm², soit un travail de 348 J/cm² (Isotech Lightmeter 1335). Une autre plaque est préparée de façon identique, et est incubée dans les mêmes conditions, mais à l'obscurité. Après 20 heures, des dilutions en série au 1/10 sont effectuées à partir de chaque puit, et ces dilutions sontensemencées sur gélose (easySPIRAL®, Interscience). Après 24 heures d'incubation à 37 °C, le décompte des colonies peut être effectué à partir de ces boîtes de Pétri, ce qui permet d'obtenir la concentration de chaque puit en considérant les dilutions effectuées. La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration en molécule pour laquelle 99,99% des bactéries ont été inhibées (réduction de 4 log par rapport au contrôle non traité).

II. Chapitre 4

II.1. Synthèse

Les acides aminés ont été fournis par Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Allemagne). Les composés peptidiques ont été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse à haute résolution (Bruker maXis) par l'équipe ICOA/CBM (FR2708) d'Orléans.

II.1.1. Précurseurs pour la synthèse peptidique : Fmoc-AA-OAllyl

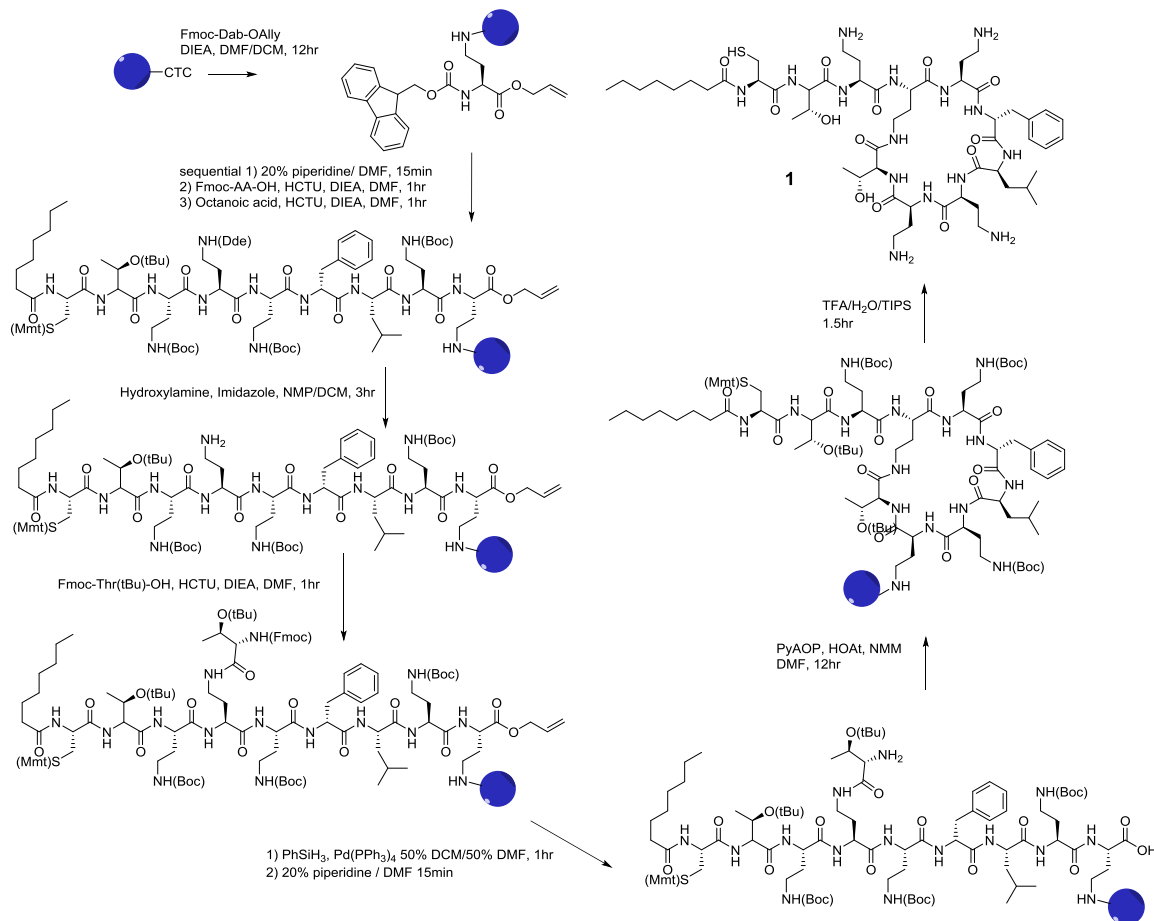


Du Fmoc-Dab(Boc)-OH (1,0450 g, 2,372 mmol, 1 eq) est dissous dans 20 mL d'eau distillée contenant de l'hydrogénocarbonate de sodium (0,2021 g, 2,406 mmol, 1 eq). L'aliquat 336 (0,9 mL) ainsi que l'allyl bromide (1,46 g, 1,04 mL, 12,03 mmol, 5 eq) sont mélangés dans 15 mL de DCM. Ce mélange est ajouté goutte à goutte à la solution aqueuse de Fmoc-Dab(Boc)-OH. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante toute la nuit. Le mélange est directement transféré dans une ampoule à décanter et 90 mL d'eau y sont rajoutés. La phase aqueuse est lavée 3 fois avec 100 mL de DCM, puis la phase organique récupérée est lavée deux fois par de la saumure. Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, le produit est purifié sur colonne chromatographique avec un éluant (EA/PE, 1/1, v/v), afin d'obtenir le produit pur Fmoc-Dab(Boc)-OAllyl. Ensuite, ce dernier est dissous dans 20 mL de DCM contenant 20% de TFA. Le mélange est laissé sous agitation pendant deux heures à température ambiante. Le solvant organique est évaporé et le produit est récupéré par précipitation dans du diethyl éther plusieurs fois. La poudre est mise dans un dessiccateur sous vide pendant une journée, afin de récupérer le produit final pur Fmoc-Dab-OAllyl de façon quantitatif (878 mg, 2,310 mmol).

Un protocole identique a été utilisé afin d'obtenir le précurseur Fmoc-Lys-OAllyl.

- **CCM (Fmoc-Dab(Boc)-OAllyl) (EA/PE, 1/4, v/v) : R_f = 0,17**
- **CCM (Fmoc-Lys(Boc)-OAllyl) (EA/PE, 1/2, v/v) : R_f = 0,30**
- **¹H RMN (Fmoc-Dab(Boc)-OAllyl) (500 MHz; DMSO_{d6}) : δ (ppm) :** 7,90 (d, J= 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 7,80 (d, J= 7,5 Hz, 1H, NH(Fmoc)) ; 7,71 (dd, J= 2,5 et 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 7,42 (t, J= 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 7,34 (dt, J= 2,5 et 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 6,84 (t, J= 5 Hz, 1H, NH(Boc)) ; 5,88 (m, 1H, Hallyl) ; 5,31 (dq, J=1,5 (x2) et 17,0 Hz, 1H, Hallyl_{term}) ; 5,19 (dd, J=1,5 et 10,5 Hz, 1H, Hallyl_{term}) ; 4,57 (dd, J=1,5 et 5,5 Hz, 2H, Hα-allyl) ; 4,29 - 4,21 (m, 3H, Halkyl_{Fmoc}) ; 4,10 (m, 1H, H_A) ; 3,00 (m, 2H, H_B) ; 1,87 (m, 1H, H_C) ; 1,70 (m, 1H, H_C) ; 1,39 (s, 9H, CH₃-Boc)
- **¹H RMN (Fmoc-Dab-OAllyl) (500 MHz; DMSO_{d6}) : δ (ppm) :** 7,90 (d, J= 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 7,81 (s, 4H, NH(Fmoc) et NH₃) ; 7,71 (dd, J= 2,5 et 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 7,43 (t, J= 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 7,34 (dt, J= 2,5 et 7,5 Hz, 2H, H_{Fmoc}) ; 6,84 (t, J= 5 Hz, 1H, NH(Boc)) ; 5,88 (m, 1H, Hallyl) ; 5,31 (dq, J=1,5 (x2) et 17,0 Hz, 1H, Hallyl_{term}) ; 5,20 (dd, J=1,5 et 10,5 Hz, 1H, Hallyl_{term}) ; 4,60 (dd, J=1,5 et 5,5 Hz, 2H, Hα-allyl) ; 4,40 - 4,22 (m, 4H, Halkyl_{Fmoc} et H_A) ; 2,88 (m, 2H, H_B) ; 2,05 (m, 1H, H_C) ; 1,95 (m, 1H, H_C)
- **MS (ESI+) (Fmoc-Dab-OAllyl) : [M+H]⁺ 381,17 attendue, 381,22 trouvée.**

II.1.2. Synthèse des peptides **1** (PMB-SH) et **1Lys** (PMBLys-SH)

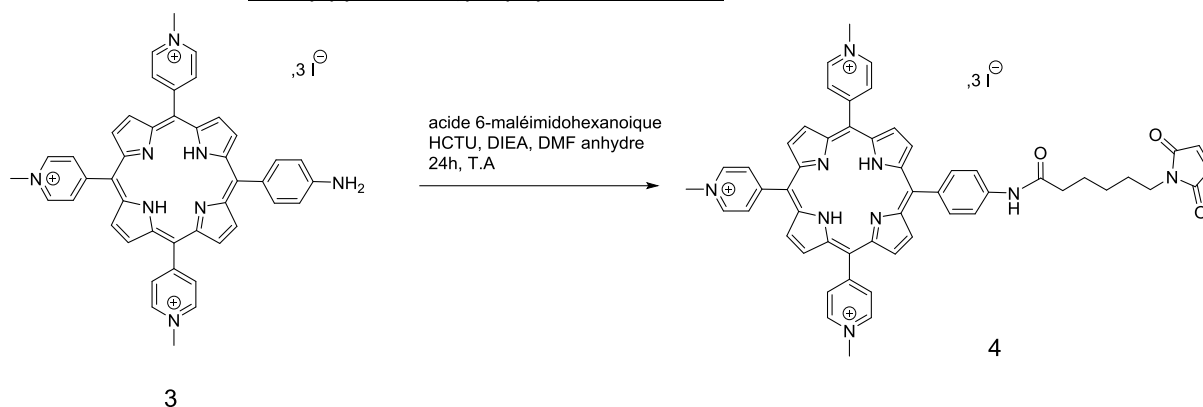


La résine 2chloro-trityle (0,22 g, loading théorique= 0,91 mmol/g), placée dans une colonne avec fritté, est tout d'abord « humidifiée » au contact d'une solution de DCM/DMF (50/50, v/v) afin qu'elle puisse gonfler. Lors de la première étape, du Fmoc-Dab-Oallyl (1,2 mmol, 6 eq) et du DIEA (12 eq) sont dissous dans du DMF anhydre, puis la solution est mise au contact de la résine sous agitation pendant 12 heures. Pour chaque étape de la synthèse, le réacteur est mis sous agitation mécanique à 200 tr/min. Chaque étape est suivie d'un rinçage effectué avec du chloroforme puis avec du DMF. Le capping de la résine est réalisé à l'aide de DMF (5 mL) contenant 200 µL de méthanol. La solution est introduite pendant 15 minutes au contact de la résine. Pour réaliser le couplage des neuf autres acides aminés, chaque étape requiert 6 eq. de Fmoc-AA-OH, 6 eq. de HCTU et 12 eq. de DIEA dissous dans du DMF anhydre à température ambiante. Chaque couplage nécessite une durée d'agitation de 1 heure. La déprotection du Fmoc s'effectue avec une solution de DMF contenant 20% de pipéridine et une agitation de 15 minutes. Tous les deux acides aminés couplés, de l'anhydride acétique pur est injecté dans la colonne et mis à agiter 10 minutes, afin d'assurer le capping des amines n'ayant pas réagi. Par la suite, une solution de *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) (6ml) /CHCl₃ (0,8 mL) contenant de l'imidazole (0,918 g) et de l'hydroxylamine hydrochloride (1,25 g) est introduite dans le réacteur, qui est ensuite agité pendant 3 heures. Après couplage de la Fmoc-Thr(tBu)-OH, une suspension de PhSiH₃ (0,4 mmol, 10 eq) et de Pd(PPh₃)₄ (2,28 mmol, 2 eq) dans un mélange DCM/DMF (50/50, v/v) est injecté. Après 3 heures, le rinçage de la résine est effectué avec du DCM, une solution de DMF contenant 0,5% de diethyldithiocarbamate puis par du DMF. Ensuite la résine, au contact de 7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyOAP) (1,2 mmol, 6 eq), 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) (1,19 mmol, 6 eq) et du *N*-méthylmorpholine (NMM) (2,6

mmol, 12 eq) dissous dans du DMF anhydre, est agitée pendant 12 heures. Enfin, une solution TFA/eau/triisopropylsilane (95/2,5/2,5, v/v/v), après 1H30 d'agitation, permet de récupérer le produit dans le filtrat. Pour finir, ce dernier est dilué dans 200ml d'eau, avant d'être lyophilisé. Le peptide est finalement purifié par chromatographie en phase inverse avec une détection à 214 nm.

- **MS (ESI+) 1 (PMB-SH) :** $[C_{54}H_{93}N_{15}O_{13}S]$, $[M+2H]^{2+}$ 596,84 attendue, 596,66 trouvée.
- **MS (ESI+) 1Lys (PMBLys-SH) :** $[C_{62}H_{109}N_{15}O_{13}S]$, $[M+2H]^{2+}$ 652.90 attendue, 652.72 trouvée.
- **1H RMN 1 (PMB-SH) :** Chapitre 4.I.3.2, page 119
- **1H RMN 1Lys (PMBLys-SH) :** Chapitre 4.II.3.2, page 141

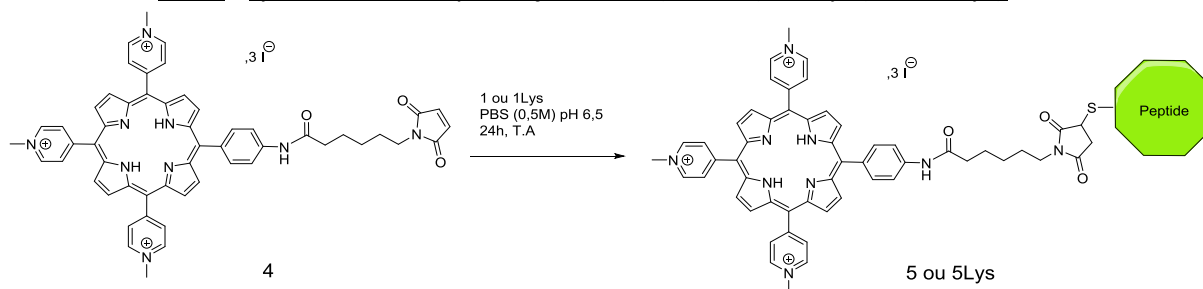
II.1.3. Synthèse de la 5-(4-(maleimidohexanoamidophényl)-10,15,20-tri(4-N-méthylpyridinium)porphyrin triiodide : 4



La porphyrine 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-N-méthylpyridinium)porphyrine (**3**) a été préparée en suivant le protocole établi dans le chapitre 3 (I.2.6, page 192). Une solution de DMF contenant la porphyrine **3** (373,3 mg, 0,353 mmol, 1 eq), l'acide 6-maléimidohexanoïque (223,7 mg, 1,059 mmol, 3 eq), du HCTU (404,3 mg, 0,977 mmol, 2.8 eq) et du DIEA (0.150 mL, 0.880 mmol, 2.5 eq) est agité pendant 24 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie en phase inverse. Le composé **4** est récupéré après lyophilisation sous forme de poudre marron, avec un rendement de 30% (132,5 mg, 0,106 mmol)

- **UV/Vis (MeOH), λ_{max} (nm) ($\epsilon \log \text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)** : 428 (5.26), 519 (4.06), 556 (3.78), 593 (3.65), 650 (3.28).
- **^1H RMN (DMSO-d_6 , 500 MHz) : δ (ppm)** : 10,42 (s, 1H, NH_{amide}) ; 9,49 (d, $J = 6,5$ Hz, Ho-py) ; 9,10 (m, 8H, Hpyr) ; 9,00 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H, Hm-py) ; 8,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ho-phe) ; 8,11 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Hm-phe) ; 7,05 (s, 2H, $\text{CH}_{\text{maleimide}}$) ; 4,72 (s, 9H, $\text{N}^+\text{-CH}_3$) ; 3,48 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}$) ; 2,50 – 1,40 (m, 8H, $-\text{CH}_2-$) ; -2,97 (s, 2H, NH) (Chapitre 4.I.3.5, page 122)
- **MS (ESI+)** : $[\text{C}_{54}\text{H}_{48}\text{I}_3\text{N}_9\text{O}_3]$, $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ 290,46 calculée, 290.53 trouvée.

II.1.4. Synthèse des complexes finales : 5 (P^+ -PMB) et 5Lys (P^+ -PMBLys)



Les composés conjugués **5** et **5Lys** ont été obtenus en utilisant le même protocole. Le composé **4** (41,6 mg, 33,2 μmol , 1 eq) et le peptide **1** (39,6 mg, 33,2 μmol , 1 eq) sont dissous dans du tampon de PBS à pH 6,5 (0,5M). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le produit est directement purifié par chromatographie en phase inverse. Le produit final est récupéré après lyophilisation sous forme de poudre marron avec un rendement de 72% (58,3 mg, 23,8 μmol).

5 :

- **UV/vis (MeOH), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ ($\epsilon \log \text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$):** 427 (5,33), 519 (4,24), 556 (3,95), 594 (3,83), 650 (3,45).
- **HRMS (ESI+)** : $[\text{C}_{108}\text{H}_{141}\text{I}_3\text{N}_{24}\text{O}_{16}\text{S}]$, $[\text{M}]^{3+}$ 687,3554 calculée, 687,3569 trouvée.
- **^1H RMNs** : Chapitre 4.I.3.7, page 124-126

5Lys :

- **UV/vis (MeOH), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ ($\epsilon \log \text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$):** 427 (5,31), 519 (4,14), 556 (3,86), 594 (3,73), 650 (3,36).
- **HRMS (ESI+)** : $[\text{C}_{116}\text{H}_{157}\text{I}_3\text{N}_{24}\text{O}_{16}\text{S}]$, $[\text{M}]^{3+}$ 724,7305 calculée, 724,7334 trouvée.
- **^1H RMNs** : Chapitre 4.II.3.4, page 143-145

II.2. Essais biologiques

Les souches bactériennes et le protocole permettant de déterminer les CMB de chaque composé sont les identiques à ceux du chapitre 3 (Partie exp. Chapitre 3.I.4, page 195).

II.2.1. Photoinactivation de bactéries selon la fluence lumineuse

Pour *S. aureus* et *E. coli*, $\sim 5 \times 10^9$ UFC sont récupérées par centrifugation (10 000 tr/min pendant 3 minutes) et lavées une fois à l'aide de PBS 1X. Pour *P. aeruginosa*, seulement $\sim 2 \times 10^8$ UFC sont récupérées afin d'éviter l'excès de matrice extracellulaire. Ensuite, les bactéries sont incubées en présence de chaque PS dans un volume final de 1 mL (10 μ M pour *S. aureus* et *E. coli*, et 1 μ M pour *P. aeruginosa*) dans du PBS 1X pendant 30 minutes à 37 °C. Ensuite, les suspensions bactériennes sont centrifugées à 10 000 tr/min pendant 3 minutes à température ambiante. Le culot de bactéries est lavé 3 fois à l'aide de PBS 1X. Après leur homogénéisation, les suspensions sont transférées dans une plaque 96 puits. La plaque est irradiée à 37 °C par la même source lumineuse que précédemment (LED blanches, 4,83 mW/cm²). La concentration bactérienne est régulièrement déterminée, et le taux de survie est calculé en comparant la concentration initiale et celle après l'irradiation d'une certaine quantité de lumière. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition.

II.2.2. Cytométrie en flux

10^7 UFC de chaque souche bactérienne sont incubés en présence de chaque PS dans un volume final de 1 mL à une concentration de 1 μ M dans du PBS 1X pendant 30 minutes à 37 °C. Ensuite, les suspensions bactériennes sont centrifugées à 10 000 tr/min pendant 3 minutes à température ambiante. Le culot de bactéries est lavé à l'aide d'une solution d'eau physiologique. Les bactéries sont resuspendues dans 500 μ L de PBS, après un ou trois lavages successifs. Avant analyse par cytométrie en flux, 10 μ L d'iodure de propidium (PI) (0,5 mg/mL) est ajouté à la suspension. Les émissions de fluorescence sont enregistrées par un trieur de cellule BD FACS Aria™ III (BD Biosciences, France). Les porphyrines cationiques sont excitées par un laser violet à 407 nm et leurs émissions de fluorescence sont détectées par un filtre BV711 (710/50 nm). Le PI est excité par un laser jaune-vert à 561 nm et ses émissions de fluorescence sont détectées par un filtre BV605 (610/20 nm). Pour les souches *S. aureus* et *E. coli*, 10 000 événements ont été enregistrés pour chaque analyse, et 50 000 événements pour celles avec *P. aeruginosa*.

II.2.3. Microscopie confocale

10^7 UFC de chaque souche bactérienne sont incubés en présence de chaque PS dans un volume final de 1mL à une concentration de 1 μ M dans PBS 1X pendant 30 minutes à 37 °C. Les suspensions bactériennes sont ensuite centrifugées à 10 000 tr/min pendant 3 minutes à température ambiante. Le culot de bactéries est lavé à l'aide d'une solution d'eau physiologique. Les bactéries sont resuspendues dans 500 μ L de PBS, après trois lavages successifs. La suspension bactérienne est transférée dans une chambre de culture 8 puits (NUNC™ Lab-Tek™ II). La porphyrine est excitée par une diode UV à 405 nm, et son émission de fluorescence est observée entre 595 et 750 nm. Les émissions de fluorescence sont analysées par un microscope confocal à balayage laser LSM880 (Zeiss, Allemagne). Les acquisitions sont traitées par le logiciel Zeiss Zen Lite. Les images sont obtenues avec un agrandissement 100X.

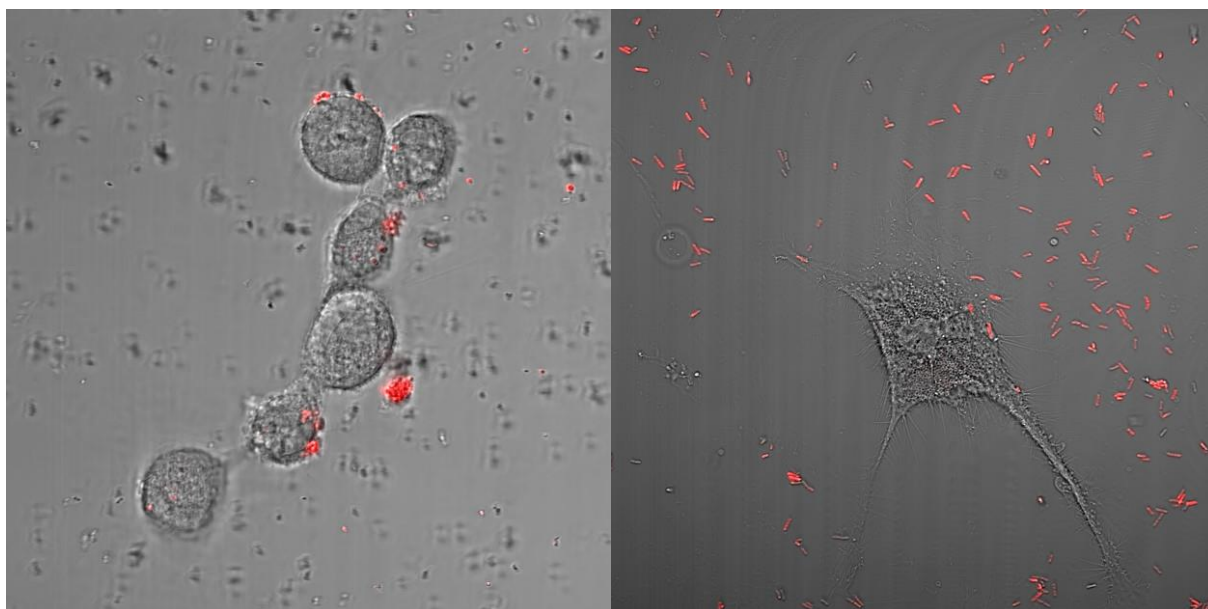
II.2.4. Fibroblastes

Les fibroblastes humains normaux (NHDF, Normal Human Dermal Fibroblasts) sont issus du derme humain adulte (Lonza) et sont cultivée dans du milieu de culture pour fibroblastes (FBM), supplémenté de 2% de sérum bovin foetal (FBS), 0,1% d'insuline, 0,1% de gentamicine-amphotéricine (GA 1000), 0,1% de facteurs de croissance pour fibroblaste. Les cellules NHDF sont maintenues en culture à 37 °C, dans une atmosphère constituée à 95% d'humidité et à 5% de CO₂.

II.2.5. Photosensibilisation de fibroblastes

La cytotoxicité des différents composés a été évaluée via une méthode utilisant du 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). 100 μ L d'une culture ($0,5 \times 10^5$ cellules/mL dans du FBM) sont introduits dans chaque puit d'une plaque 96 puits, puis sont cultivés pendant 48 heures. Ensuite, le milieu est retiré afin de pouvoir d'introduire les différentes solutions de produits actifs, à des concentrations situées entre 5 nM et 5000nM (dans du PBS 1X). Après 2 heures d'incubation à 37 °C à l'obscurité, les cellules sont lavées trois fois à l'aide de PBS 1X, puis 100 μ L du milieu de culture sont rajoutés. Une plaque est incubée à 37 °C et sous l'irradiation lumineuse de LED blanches pendant 2 heures (4,83 mW/cm², 35 J/cm²). Après 24 heures à 37 °C à l'obscurité, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0,5 mg/mL dans chaque puits, puis la plaque est incubée pendant 2 heures à 37 °C. Enfin, le milieu de culture est retiré et remplacé par 100 μ L de DMSO, afin de dissoudre les critères de formazan. L'absorbance de chaque puit est mesurée à 595 nm par un lecteur de plaque Bio-Rad iMark™.

II.2.6. Imagerie avec les fibroblastes



5000 cellules sontensemencées dans une chambre de culture 8 puits (NUNC™ Lab-Tek™ II) à 37 °C, 48h avant expérimentation. Après avoir lavé les fibroblastes avec du PBS 1X, 10^7 UFC préalablement lavées trois fois avec du PBS 1X, sont ajoutés dans chaque puit. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, le surnageant est délicatement enlevé, et les puits sont lavés une fois avec du PBS 1X. Ensuite, les solutions de PS (500 μ L, 1 μ M dans le PBS 1X) sont introduites dans les puits. Après 30 minutes à 37 °C, les puits sont lavés trois fois à l'aide de PBS, puis les analyses en microscopie confocale sont réalisées selon les réglages précédents (II.2.3) avec un zoom 40X

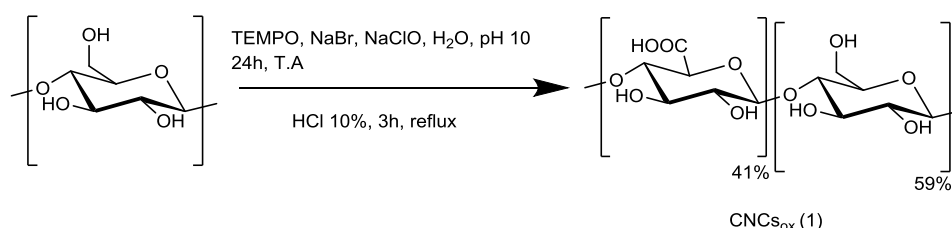
III. Chapitre 5

Les dialyses ont été réalisées à l'aide de membranes en cellulose régénérée de seuil de coupure 6-8 kDa (Spectrum-Labs). Les spectres infrarouges ont été obtenus à l'aide d'un photomètre Perkin Elmer Spectrum 1000 et de pastilles de bromure de potassium. La mesure des potentiels zeta a été effectuée par un appareil Malvern Zetasizer Nanoseries à l'aide de cellules DTS1070. Le dosage conductimètre a été suivi à l'aide d'un Thermo Scientific Orion Star A112.

Les analyses élémentaires ont été réalisées sur un Fisons Instrument Thermoquest Flash EA 1112 CHNS, sous une atmosphère à base d'hélium (Alphagaz 2) et d'oxygène (Alphagaz 2). Une méthode CHNS a été utilisée avec du BBOT en tant qu'étalon. Les données retranscrites sont issues de six analyses indépendantes et répétables, effectuées à l'Université d'Artois.

III.1. Synthèse

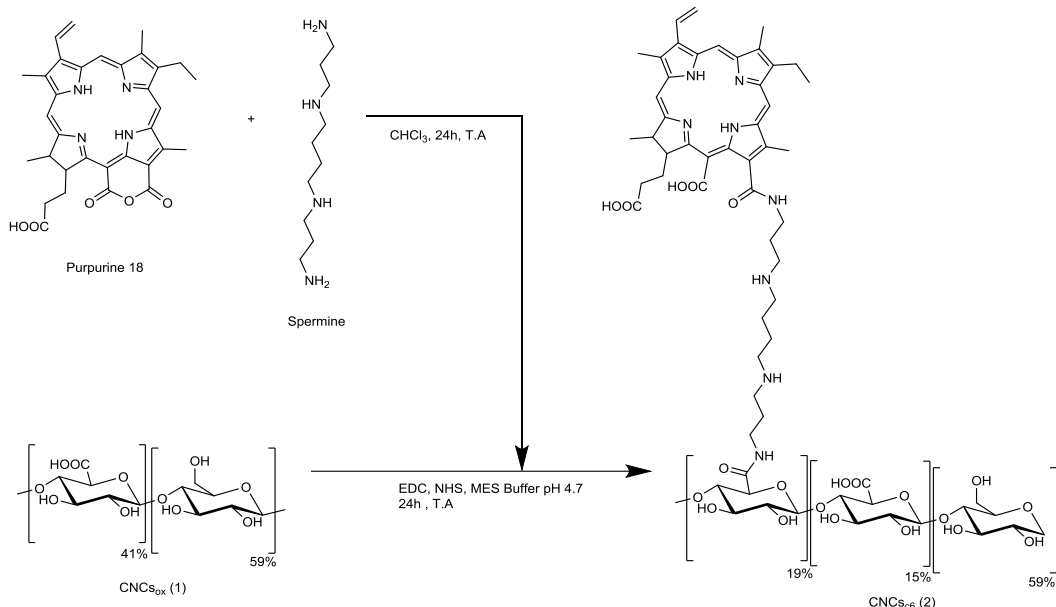
III.1.1. Préparation des nanocristaux de cellulose : $CNCs_{ox}$ (1)



Des morceaux de coton commercial (6 g) sont introduits dans une solution aqueuse (600 mL) contenant du (2,2,6,6-tetraméthylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) (100 mg, 0,64 mmol) et du bromure de sodium (900 mg, 8,75 mmol). Après avoir ajusté le pH à 10 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (0,5 M), une solution à 11% en hypochlorite de sodium (12,5 mL, 1,65 g, 22,2 mmol) est introduite dans la suspension de coton, sous agitation. Régulièrement de l'hydroxyde de sodium est ajouté afin de stabiliser le pH à environ 10. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, la suspension est directement dialysée à l'aide de membrane de dialyse en cellulose régénérée de seuil de coupure de 6-8 kDa. Ensuite, le coton oxydé est récupéré, et de l'acide chlorhydrique à 37% est directement ajouté afin que le volume final comprenne 10% d'acide. Le coton oxydé est hydrolysé en chauffant à reflux pendant 3 heures, puis la suspension est de nouveau dialysée. A l'aide de centrifugation successive (10 min à 3700 rpm), les nanocristaux de cellulose sont récupérés dans le surnageant. La densité finale est obtenue en mesurant la masse d'un échantillon lyophilisé de la suspension (100 mL). La concentration en acide carboxylique et le degré d'oxydation sont mesurés par un dosage conductimétrie (III.2.1).

- **Degré d'oxydation** : 41% (2,3 mmol d'acide carboxylique par g de cellulose)
- **IR (cm⁻¹)** : 3286 (νOH) ; 2899 (νC_{sp³}-H); 1732 (νC=O); 1430 – 1368 (δC_{sp³}-H); 1335 – 1050 (δC-OH)
- **Potentiel Zeta (ζ) [± 1 mV]** : - 30 mV
- **DLS** : 122 ± 2 nm (PDI : 0.257 ± 0.04)
- **Analyse élémentaire** : 40,13 %C, 0% N, 6,04%H

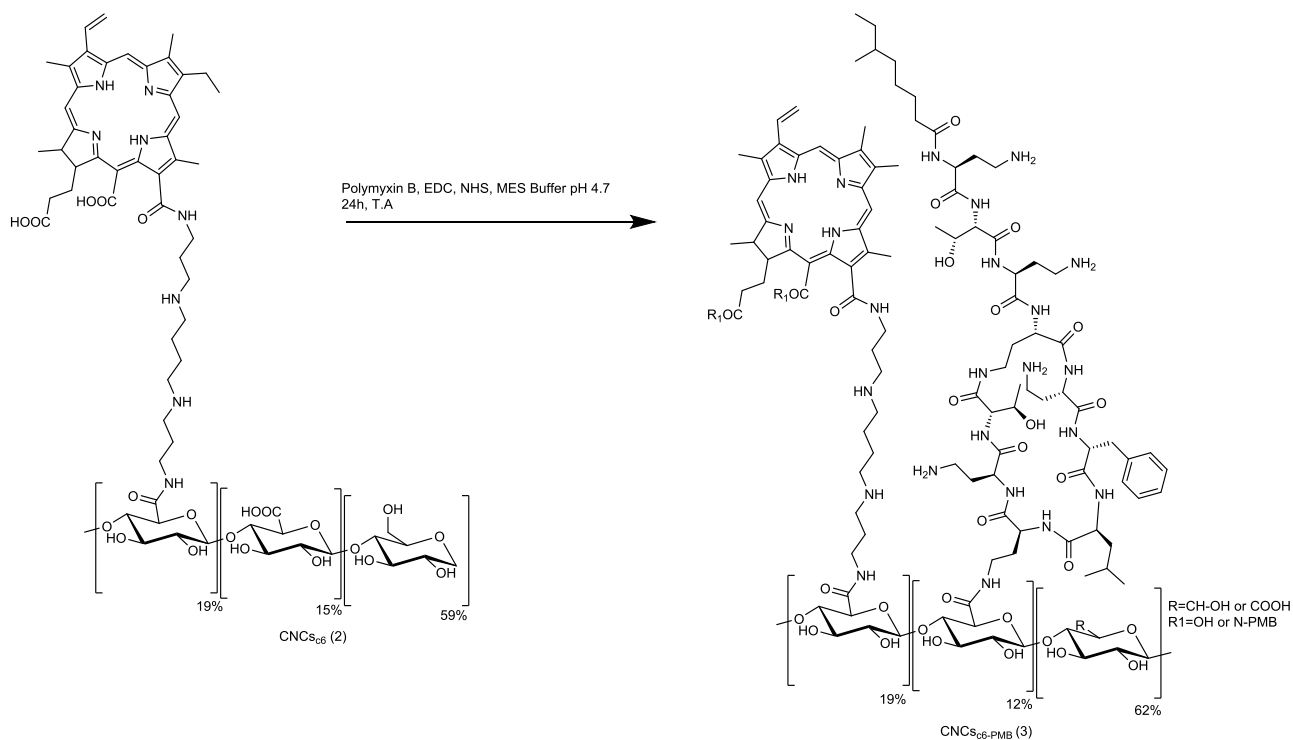
III.1.2. Fixation de la chlorine-e6 : $CNCs_{c6}$ (2)



De la purpurine-18 est extraite de l'algue *Spirulina maxima*, selon le protocole établi par le laboratoire.¹⁸³ La purpurine-18 (131,3 mg, 0,23 mmol, 1 eq) est dissoute dans du chloroforme, puis la solution est ajoutée goutte à goutte à une autre solution de chloroforme contenant de la spermine (47,1 mg, 0,23 mmol, 1 eq). L'ouverture de la fonction anhydride d'acide chez la purpurine-18 (par la spermine) entraîne un changement de couleur, ce qui permet de suivre la réaction par spectroscopie UV/Vis. La disparition totale de la bande d'absorption à 706 nm indique la fin de la réaction. Après l'évaporation du solvant, le brut est directement redissous dans de l'eau, puis transféré dans une solution tampon de MES (pH 4,7) contenant du 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (70 μ L, 80 mg, 0,5 mmol), du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (50,2 mg, 0,44 mmol), et des nanocristaux de cellulose oxydée $CNCs_{ox}$ (1) (200 mg, 0,464 mmol d'acide carboxylique). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, la suspension est dialysée comme précédemment afin de récupérer les nanocristaux de couleur verte ($CNCs_{c6}$ (2)). L'analyse élémentaire permet d'estimer la quantité de chlorine greffée (III.2.2).

- **Degré de substitution** : 19% (92% de rendement)
- **IR (cm^{-1})** : 2930 ($\nu_{C_{sp^2}-H}$); 1600 ($\nu_{C=C}$)
- **Potentiel Zeta (ζ) [$\pm$ 1 mV]** : - 12 mV
- **Analyse élémentaire** : 51,25 %C, 3,05% N, 7,19 %H
- **UV/Vis (Chlorine-e6-spermine dans chloroforme) (nm)** : 402 (Soret), 503, 532, 610, 668

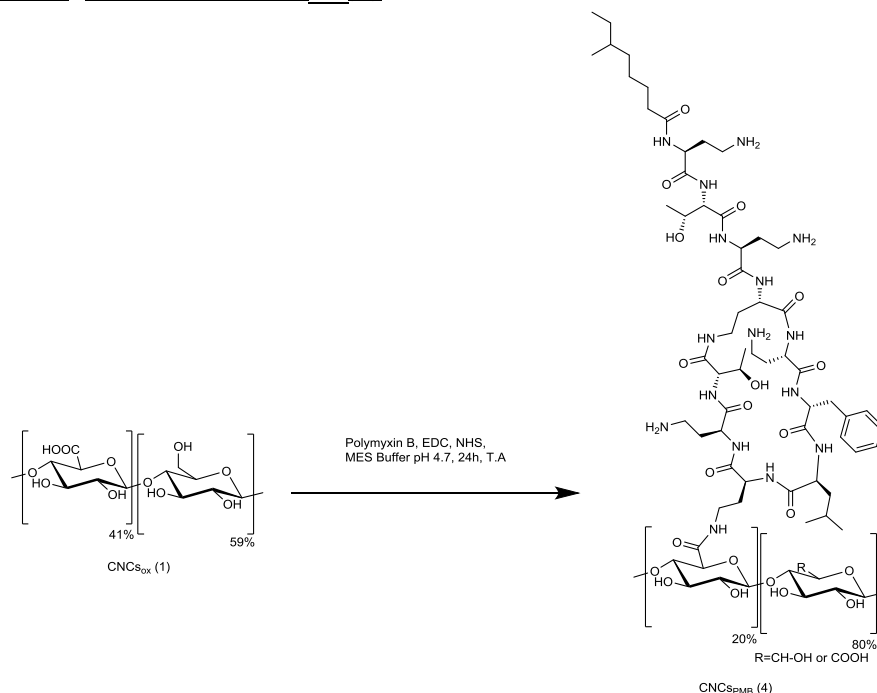
III.1.3. Greffage de la polymyxine B sur les nanocristaux : **CNCs_{c6-PMB} (3)**



Du sulfate de polymyxine B (151,8 mg, 0,117 mmol) est directement ajouté à une solution tampon de MES (pH 4,7) contenant de l'EDC (35 μ L, 40 mg, 0.3 mmol), du NHS (24.7 mg, 0.21 mmol), et les nanocristaux CNCs_{c6} (2) (0,232 mmol théorique d'acide carboxylique). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, la suspension est de nouveau dialysée afin d'obtenir les nanocristaux finaux (**CNCs_{c6-PMB} (3)**).

- **Degré de substitution** : 12% (75% de rendement)
- **IR (cm⁻¹)** : 2930 ($\nu_{\text{C-H}}$); 1650 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1600 ($\nu_{\text{C=C}}$)
- **Potentiel Zeta (ζ) [$\pm$ 1 mV]** : - 1 mV
- **Analyse élémentaire** : 48,49 %C, 4,79% N, 6,89 %H

III.1.4. Obtention de CNCs_{PMB} (4)



Du sulfate de polymyxine B (151,8 mg, 0,117 mmol) est directement ajouté à une solution tampon de MES (pH 4,7) contenant de l'EDC (35 μL , 40 mg, 0.3 mmol), du NHS (24.7 mg, 0.21 mmol), et des nanocristaux de cellulose oxydée CNCs_{ox} (1) (200 mg, 0,464 mmol d'acide carboxylique). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, la suspension est de nouveau dialysée afin d'obtenir les nanocristaux recouverts de polymyxine B (CNCs_{PMB} (4)).

- **Degré de substitution** : 20% (95% de rendement)
- **IR (cm^{-1})** : 1650 ($\nu\text{C=O}$)
- **Potentiel Zeta (ζ) [$\pm 1 \text{ mV}$]** : - 3 mV
- **Analyse élémentaire** : 39,09 %C, 4,05% N, 5,37 %H

III.2. Analyses

III.2.1. Dosage conductimétrique de CNCs_{ox} (1)

Des nanocristaux de cellulose oxydée CNCs_{ox} (1) ($w=70,3$ mg) sont dispersés dans une solution d'acide chlorhydrique (70 mL, 0,01M) et agités pendant 10 minutes. La conductivité de la suspension est suivie pendant l'ajout régulier d'une solution titrée d'hydroxyde de sodium ($c=0,0109$ M). Les anions hydroxyles HO^- vont tout d'abord réagir avec l'excès d'oxonium H_3O^+ , ce qui entraîne une diminution linéaire de la conductivité jusqu'à un volume appelé V_1 . Au-delà de ce volume, les anions hydroxyles réagissent avec les acides carboxyliques des nanocristaux, ce qui n'entraîne aucune variation de conductivité. Au-delà d'un volume appelé V_2 , les anions seront en excès, entraînant une nouvelle augmentation linéaire de la conductivité. En traçant la conductivité en fonction du volume de soude et les différentes tangentes associées, on obtient les valeurs V_1 et V_2 (Figure 153).

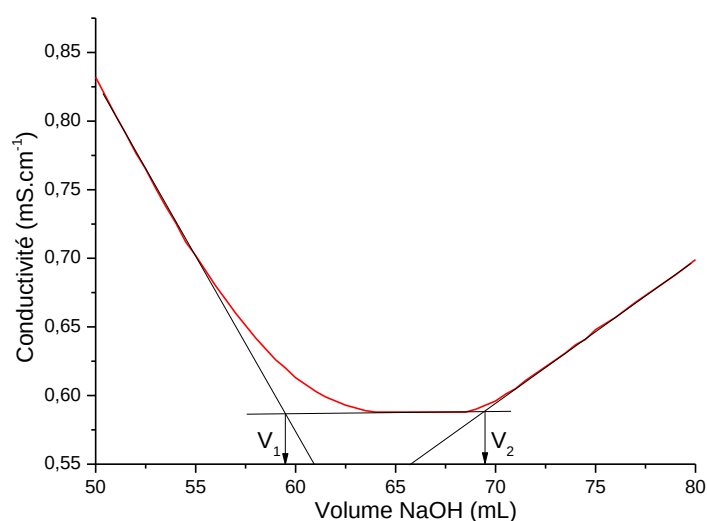


Figure 153. Dosage conductimétrique des nanocristaux de cellulose oxydée par de l'hydroxyde de sodium

Finalement, le degré d'oxydation (D.O) et la quantité d'acide carboxylique (n_{acide}) sont obtenus par les formules suivantes³⁵⁸ :

$$D.O = \frac{162(V_2 - V_1)c}{w - 36(V_2 - V_1)c} \quad n_{\text{acide}} = \frac{c(V_2 - V_1)}{w}$$

Équation 9. Calcul du degré d'oxydation (D.O) et de la quantité d'acide carboxylique (n_{acide} en mmol/g) pour CNCs_{ox} (1)

III.2.2. Estimations des degrés de substitution

En prenant en compte les quantités de matière utilisées lors des greffages, les degrés de substitutions (DS) maximum sont calculés et présentés dans le Tableau 2. L'excès d'EDC entraîne l'apparition des produits secondaires de type *N*-acylisourée, ne permettant que d'obtenir des estimations des différents degrés de substitutions.

Tableau 2. Composition maximum possible pour chaque nanocristaux (DS théoriques). Chaque abréviation représente un différent monomère : « COOH » pour les monomères portant un acide carboxylique, « OH » pour ceux portant un hydroxyle, « c6 » pour ceux portant une chlorine-e6-spermine, « PMB » pour ceux portant une polymyxine et enfin « N-acyl » pour les produits secondaires.

	COOH	OH	c6	PMB	N-acyl	somme
CNCs_{ox} (1)	0,41	0,59	0	0	0	1
CNCs_{c6} (2)	0,15	0,59	0,21	0	0,05	1
CNCs_{c6-PMB} (3)	0	0,59	0,21	0,15	0,05	1
CNCs_{PMB} (4)	0,15	0,59	0	0,21	0,05	1

A partir de ces DS théoriques, des analyses élémentaires sont calculées (Tableau 3)

Tableau 3. Analyses élémentaires théoriques des différents nanocristaux (calculées avec ChemBioDraw®)

	C	H	N	O
CNCs_{ox} (1)	43,0	5,5	0,000	51,4
CNCs_{c6} (2)	48,4	6,2	3,306	42,1
CNCs_{c6-PMB} (3)	50,3	6,7	5,610	37,4
CNCs_{PMB} (4)	46,5	6,4	4,217	42,9

Enfin, les estimations des DS sont obtenues en utilisant la formule suivante :

$$DS = \text{maximun DS} \times \frac{\text{Gain en azote (expérimental)}}{\text{Gain en azote (théorique)}}$$

Équation 10. Calcul des DS

Tableau 4. Estimations finales des DS

	c6	PMB
CNCs_{c6} (2)	0,19	0
CNCs_{c6-PMB} (3)	0,19	0,12
CNCs_{PMB} (4)	0	0,20

III.2.3. Production d'oxygène singlet suivie par photooxydation du diméthylanthracène

Les nanocristaux sont suspendus dans une solution de DMF de qualité spectroscopique (3 mL) (**CNCs_{ox} (1)**: 0,164 mg/mL ; **CNCs_{c6} (2)**: 0,129 mg/mL ; **CNCs_{c6-PMB} (3)**: 0,191 mg/mL ; **CNCs_{PMB} (4)**: 0,164 mg/mL). 60 μ L d'une solution fraîche de diméthylanthracène (DMA) dans du DMF (4,85 mM) est placé dans une cuve en quartz avec la suspension de nanocristaux. La photooxydation du DMA est suivie en observant l'absorbance (A) de la bande à 380 nm au cours du temps, sous irradiation lumineuse (850 LUX, λ = 400 – 690 nm) et sous vive agitation. Enfin, la production d'oxygène singlet est observée en traçant la courbe $\ln(A_0/A)$ au cours du temps, ainsi que les régressions linéaires associées.

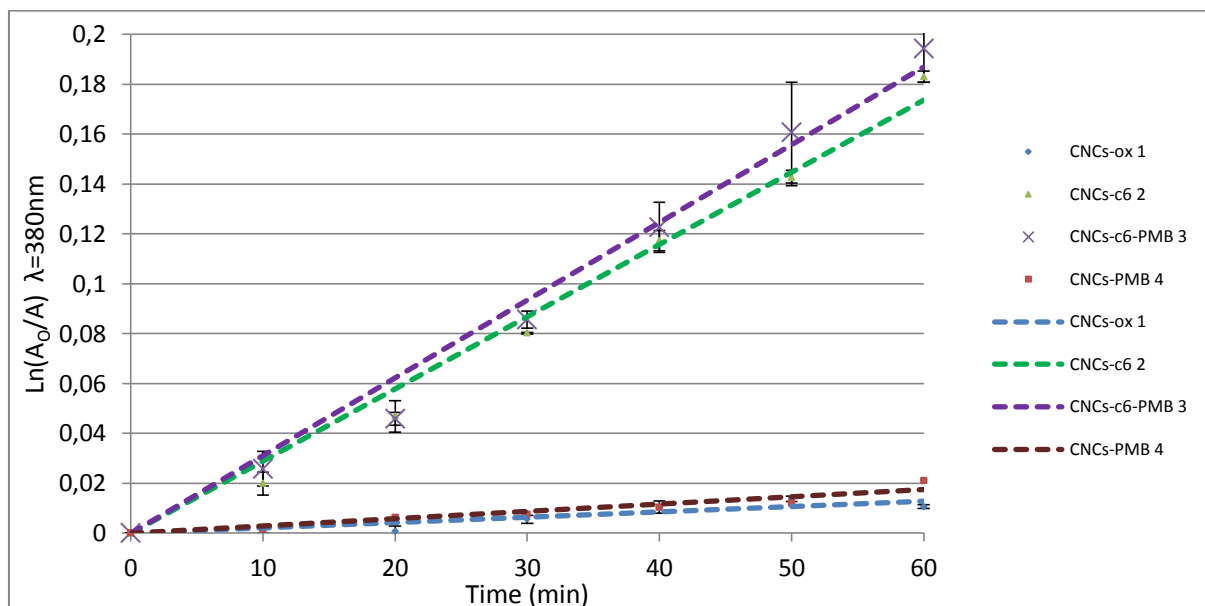


Figure 154. Photooxydation du diméthylanthracène (DMA, 95 μ M) sous irradiation lumineuse (850 LUX) et au contact des différents nanocristaux dans le DMF: **CNCs_{ox} 1** (0,164 mg/mL), or **CNCs_{c6} 2** (0,129 mg/mL), or **CNCs_{c6-PMB} 3** (0,191 mg/mL), or **CNCs_{PMB} 4** (0,164 mg/mL). Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition.

III.3. Essais biologiques

Les souches bactériennes utilisées sont identiques aux chapitres précédents (Chapitre 3.I.4.1, page 195). Pour ces expériences, une souche de *S. epidermidis* (ICP109562, Institut Pasteur) a été rajoutée.

III.3.1. Test de diffusion

Une suspension de *P. aeruginosa* (1mL à $\sim 2.10^5$ UFC/mL) est déposée et étalée sur une gélose à base de bouillon Tryptone Soja et d'Agar, dans une boîte de Pétri. Après imprégnation de la gélose, des puits sont formés sous le poste de sécurité microbiologique (PSM). Les suspensions de nanocristaux portant de la polymyxine B (100 μ L) sont déposées dans les puits. La boîte de Pétri est placée à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures. Contrairement à la polymyxine B fixée, le peptide libre contenu dans les puits diffuse à travers l'agar et inhibe les bactéries à la surface. Ainsi, si un puit contient de la polymyxine à l'état libre, un halo clair apparaît autour du puit, alors que l'absence de ce halo indique la fixation du peptide sur les nanocristaux.

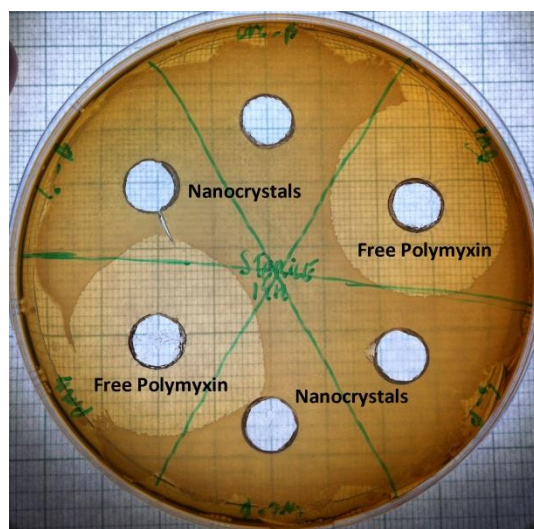


Figure 155. Exemple d'un test de diffusion.

III.3.2. Incubation de bactéries en contact avec les nanocristaux

Avant toute utilisation, les suspensions de nanocristaux sont pasteurisées dans une étuve à 70 °C pendant la nuit. Cette exposition à la chaleur ne semble pas entraîner de relargage de la polymyxine B (test de diffusion). Des suspensions bactériennes ($750 \mu\text{L}$ à 10^5 UFC/mL pour *P. aeruginosa*, et à $2 \cdot 10^4$ UFC/mL pour *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis*) sont déposées dans les puits d'une plaque 24-puits (BD Falcon). $250 \mu\text{L}$ de suspension des différents nanocristaux est ajouté aux puits. Différentes concentrations ont été utilisées : 0,062 mg/mL, 0,026 mg/mL, et 0,006 mg/mL de **CNCs_{ox} (1)**, 0,129 mg/mL, 0,054 mg/mL, et 0,013 mg/mL de **CNCs_{c6} (2)**, 0,191 mg/mL, 0,080 mg/mL, et 0,019 mg/mL de **CNCs_{c6-PMB} (3)**, 0,102 mg/mL, 0,043 mg/mL, et 0,010 mg/mL de **CNCs_{PMB} (4)**, 0,062 mg/mL, 0,026 mg/mL, et 0,006 mg/mL de PMB libre. Une plaque est incubée à 37 °C sous une faible agitation (200 tr/min) et sous irradiation lumineuse de LED blanche pendant 15 heures. La puissance de l'irradiation est de $0,8 \text{ mW/cm}^2$ (soit un travail de $43,2 \text{ J/cm}^2$). Une plaque identique est préparée et incubée dans les mêmes conditions, mais à l'obscurité. Après le temps d'incubation, des dilutions en série sont préparées à partir de chaque puit de chaque plaque. Ces dilutions sont ensemencées sur des géloses à base de bouillon Tryptone Soja et d'Agar. Après une incubation à 37 °C pendant 24 heures, les colonies présentes sur chaque gélose sont dénombrées, afin de calculer la concentration initiale de chaque puit (UFC/mL). Etant donné le protocole utilisé, la plus faible concentration observable est de 300 UFC/mL. Pour chaque condition, six expériences indépendantes ont été réalisées.

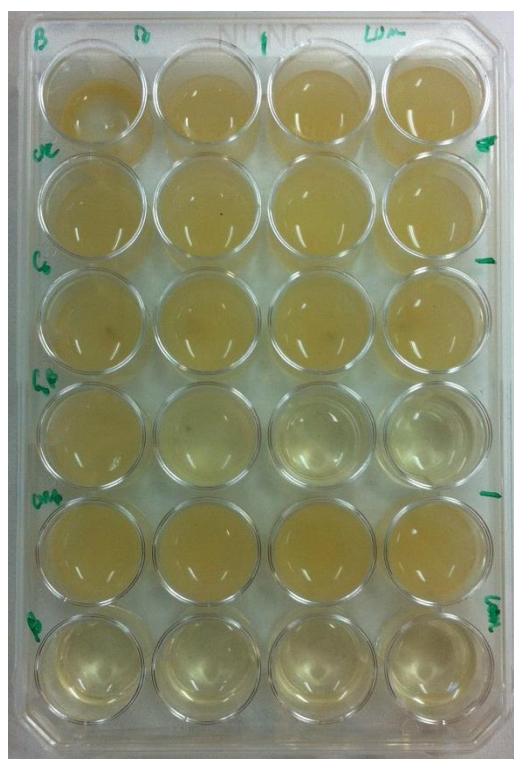


Figure 156. Exemple d'une plaque 24-puits, après incubation

III.3.3. Microscopie confocale

200 μ L de suspension sont ajoutés à 1 mL de suspension bactérienne dans de l'eau physiologique ($\sim 10^7$ UFC/mL). Les concentrations utilisées sont : 0,006 mg/mL pour **CNCs_{ox} (1)**, 0,013 mg/mL pour **CNCs_{c6} (2)**, 0,019 mg/mL pour **CNCs_{c6-PMB} (3)**, 0,010 mg/mL pour **CNCs_{PMB} (4)**, 0,006 mg/mL pour la PMB libre. Ensuite, 3,6 μ L d'un mélange fraîchement préparé de LIVE/DEAD® BacLight™ sont directement ajoutés à la suspension. Après 15 minutes à température ambiante, la suspension est transférée dans un NUNC™ Lab-Tek™ II. Le fluorochrome SYTO9 (inclus dans le mélange) est excité par un laser à 488 nm, et son émission de fluorescence est observée entre 499 et 570 nm. L'iodure de propidium est excité par un laser jaune à 561 nm, et son émission de fluorescence est observée entre 596 et 712 nm. Les émissions sont analysées par un microscope confocal à balayage laser LSM880 (Zeiss, Allemagne). Les acquisitions sont traitées par le logiciel Zeiss Zen Lite. Les images sont obtenues avec un agrandissement 100X.

Références bibliographiques

- (1) Prescott, L. M.; Willey, J.; Sherwood, L.; Woolverton, C. J. *Microbiologie*, 4th ed.; De Boeck, 2013.
- (2) Cabral, C.; Ingram, J.; Lucas, P. J.; Redmond, N. M.; Kai, J.; Hay, A. D.; Horwood, J. Influence of Clinical Communication on Parents' Antibiotic Expectations for Children with Respiratory Tract Infections. *Ann. Fam. Med.* **2016**, *14* (2), 141–147.
- (3) Bologna, J. L.; Jorizzo, J. L.; Schaffer, J. V. *Dermatology: 2-Volume Set, 3rd Edition*, United States of America.; Saunders Elsevier, 2012.
- (4) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm. Ther.* **2015**, *40* (4), 277–283.
- (5) 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* (2), e49–e55.
- (6) O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. **2016**.
- (7) Tavares, A.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Gomes, N. C. M.; Alves, E.; Almeida, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (1), 91–105.
- (8) 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.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Strategies Centered around Reactive Oxygen Species – Bactericidal Antibiotics, Photodynamic Therapy, and Beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37* (6), 955–989.
- (9) Fu, X.; Fang, Y.; Yao, M. Antimicrobial Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infection. *BioMed Res. Int.* **2013**, 2013.
- (10) Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. How Does Photodynamic Therapy Work? *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55* (1), 145–157.
- (11) Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (16), 3897–3915.
- (12) Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J. H.; Brown, S. B. Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane Of Escherichia Coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (3), 522–527.
- (13) Reddi, E.; Ceccon, M.; Valduga, G.; Jori, G.; Bommer, J. C.; Elisei, F.; Latterini, L.; Mazzucato, U. Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-Substituted Cationic Porphyrins. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75* (5), 462–470.
- (14) Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Almeida, A. Charge Effect on the Photoinactivation of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria by Cationic Meso-Substituted Porphyrins. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 70.
- (15) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korblick, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90* (12), 889–905.
- (16) Hamblin, M. R.; Dai, T. Can Surgical Site Infections Be Treated by Photodynamic Therapy? *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, *7* (2), 134.

- (17) Choi, S.-K.; Park, S.-Y.; Kim, R.; Kim, S.-B.; Lee, C.-H.; Kim, J. F.; Park, S.-H. Identification of a Polymyxin Synthetase Gene Cluster of *Paenibacillus Polymyxa* and Heterologous Expression of the Gene in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (10), 3350–3358.
- (18) Zavascki, A. P.; Goldani, L. Z.; Li, J.; Nation, R. L. Polymyxin B for the Treatment of Multidrug-Resistant Pathogens: A Critical Review. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60* (6), 1206–1215.
- (19) Velkov, T.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Li, J. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 1898–1916.
- (20) Dall, C. US first: E coli resistant to both colistin, carbapenems <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2016/08/us-first-e-coli-resistant-both-colistin-carbapenems> (accessed Feb 15, 2017).
- (21) Nitzan, Y.; Gutterman, M.; Malik, Z.; Ehrenberg, B. Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Photosensitized Porphyrins. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55* (1), 89–96.
- (22) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*
- (23) *Site Internet : Wikipedia.Org.*
- (24) Royet, J.; Dziarski, R. Peptidoglycan Recognition Proteins: Pleiotropic Sensors and Effectors of Antimicrobial Defences. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5* (4), 264–277.
- (25) Dedet, J.-P. *La microbiologie, des ses origines aux maladies émergentes*; Dunod: Paris, 2007.
- (26) Cuny, H. *Louis Pasteur et Le Mystère de La Vie*; Seghers, 1963.
- (27) Darmon, P. *Pasteur*; Fayard, 1995.
- (28) Dubos, R. *La Leçon de Pasteur*; Albin Michel, 1987.
- (29) Dubos, R. *Louis Pasteur, Franc-Tireur de La Science*; La Découverte, 1995.
- (30) Bretey, J. *Robert Koch et Son Bacille*; Bull. Acad. Nat. Méd, 1982.
- (31) Brock, T. D. *Robert Koch. A Life in Medicine and Bacteriology*; Springer-Verlag, 1988.
- (32) Besredka, A. *Histoire d'une Idée : L'oeuvre de E.Metchnikoff*; Masson, 1921.
- (33) Cressac, M. *Le Docteur Roux, Mon Oncle*; L'Arche, 1950.
- (34) Carter, K. C.; Carter, B.R. Childbed Fever. A Scientific Biography of Ignaz Semmelweis. Greenwood Press. 1994.
- (35) Tuazon, C. U.; Miller, H.; Shamsuddin, D. Antimicrobial Activity of Street Heroin. *J. Infect. Dis.* **1980**, *142* (6), 944.
- (36) Blayac, J. P.; Vagnon, F.; Hillaire-Buys, D. *Les Quinquinas et La Quinine : Petites Histoires d'une Grande Découverte*; Nunc Monspelienis Hippocrates, 1997.
- (37) Greenwood, D. The Quinine Connection. *J. Antimicrob. Chemother.* **1992**, *30* (4), 417–427.
- (38) Goodwin, L. G. Pentostam (Sodium Stibogluconate); a 50-Year Personal Reminiscence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *89* (3), 339–341.
- (39) Bäumlér, E. *Paul Ehrlich: Scientist for Life*; Holmes & Meyer, 1984.
- (40) Diggins, F. W. The True History of the Discovery of Penicillin, with Refutation of the Misinformation in the Literature. *Br. J. Biomed. Sci.* **1999**, *56* (2), 83–93.

- (41) Winogradsky, S. *Microbiologie Du Sol. Problèmes et Méthodes. Cinquante Ans de Recherches.*; Masson, Paris., 1949.
- (42) Bêta-Lactamines, Pénicillines et Céphalosporines. *Pharmacorama*, 2016.
- (43) Cyclines <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/cyclines> (accessed Sep 12, 2017).
- (44) Aminosides <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/aminosides> (accessed Sep 12, 2017).
- (45) Macrolides <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/macrolides> (accessed Sep 12, 2017).
- (46) Quinolones <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/quinolones> (accessed Sep 12, 2017).
- (47) Singer, R. S.; Finch, R.; Wegener, H. C.; Bywater, R.; Walters, J.; Lipsitch, M. Antibiotic Resistance—the Interplay between Antibiotic Use in Animals and Human Beings. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, 3 (1), 47–51.
- (48) Kapp, C. WHO Urges Farmers to Cut Use of Antibiotic Growth Agents. *The Lancet* **2003**, 362 (9384), 626.
- (49) Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schäberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V. A.; Cohen, D. R.; Felix, C. R.; Fetterman, K. A.; Millett, W. P.; Nitti, A. G.; Zullo, A. M.; Chen, C.; Lewis, K. A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance. *Nature* **2015**, 517 (7535), 455–459.
- (50) Zipperer, A.; Konnerth, M. C.; Laux, C.; Berscheid, A.; Janek, D.; Weidenmaier, C.; Burian, M.; Schilling, N. A.; Slavetinsky, C.; Marschal, M.; Willmann, M.; Kalbacher, H.; Schitteck, B.; Brötz-Oesterhelt, H.; Grond, S.; Peschel, A.; Krismer, B. Human Commensals Producing a Novel Antibiotic Impair Pathogen Colonization. *Nature* **2016**, 535 (7613), 511–516.
- (51) *Site Internet : Inserm.Fr.*
- (52) Kumarasamy, K. K.; Toleman, M. A.; Walsh, T. R.; Bagaria, J.; Butt, F.; Balakrishnan, R.; Chaudhary, U.; Doumith, M.; Giske, C. G.; Irfan, S.; Krishnan, P.; Kumar, A. V.; Maharjan, S.; Mushtaq, S.; Noorie, T.; Paterson, D. L.; Pearson, A.; Perry, C.; Pike, R.; Rao, B.; Ray, U.; Sarma, J. B.; Sharma, M.; Sheridan, E.; Thirunarayan, M. A.; Turton, J.; Upadhyay, S.; Warner, M.; Welfare, W.; Livermore, D. M.; Woodford, N. Emergence of a New Antibiotic Resistance Mechanism in India, Pakistan, and the UK: A Molecular, Biological, and Epidemiological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, 10 (9), 597–602.
- (53) WHO. Antimicrobial Resistance : Global Report on Surveillance. 2014.
- (54) *Site Internet : Who.Int/Mediacentre/News/Releases/2015/Antibiotic-Resistance-Lacking/Fr/.*
- (55) Rios, A. C.; Moutinho, C. G.; Pinto, F. C.; Del Fiol, F. S.; Jozala, A.; Chaud, M. V.; Vila, M. M. D. C.; Teixeira, J. A.; Balcão, V. M. Alternatives to Overcoming Bacterial Resistances: State-of-the-Art. *Microbiol. Res.* **2016**, 191, 51–80.
- (56) Wright, A.; Hawkins, C. h.; Änggård, E. e.; Harper, D. r. A Controlled Clinical Trial of a Therapeutic Bacteriophage Preparation in Chronic Otitis Due to Antibiotic-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*; a Preliminary Report of Efficacy. *Clin. Otolaryngol.* **2009**, 34 (4), 349–357.

- (57) Wittebole, X.; De Roock, S.; Opal, S. M. A Historical Overview of Bacteriophage Therapy as an Alternative to Antibiotics for the Treatment of Bacterial Pathogens. *Virulence* **2014**, 5 (1), 226–235.
- (58) Daniel, A.; Euler, C.; Collin, M.; Chahales, P.; Gorelick, K. J.; Fischetti, V. A. Synergism between a Novel Chimeric Lysin and Oxacillin Protects against Infection by Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (4), 1603–1612.
- (59) Fischetti, V. A. Bacteriophage Lysins as Effective Antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, 11 (5), 393–400.
- (60) Donnelly, J. J.; Ulmer, J. B.; Shiver, J. W.; Liu, M. A. DNA Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, 15, 617–648.
- (61) Carlet, J. World Alliance against Antibiotic Resistance (WAAR): Safeguarding Antibiotics. *Intensive Care Med.* **2012**, 38 (10), 1723–1724.
- (62) Seo, M.-D.; Won, H.-S.; Kim, J.-H.; Mishig-Ochir, T.; Lee, B.-J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules* **2012**, 17 (10), 12276–12286.
- (63) Okuda, K.; Edwards, G. C.; Winnick, T. BIOSYNTHESIS OF GRAMICIDIN AND TYROCIDINE IN THE DUBOS STRAIN OF *BACILLUS BREVIS* I. *J. Bacteriol.* **1963**, 85 (2), 329–338.
- (64) Storm, D. R.; Rosenthal, K. S.; Swanson, P. E. Polymyxin and Related Peptide Antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, 46, 723–763.
- (65) Skarnes, R. C.; Watson, D. W. ANTIMICROBIAL FACTORS OF NORMAL TISSUES AND FLUIDS. *Bacteriol. Rev.* **1957**, 21 (4), 273–294.
- (66) Anastasi, A.; Erspamer, V.; Bucci, M. Isolation and Structure of Bombesin and Alytesin, 2 Analogous Active Peptides from the Skin of the European Amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* **1971**, 27 (2), 166–167.
- (67) Selsted, M. E.; Szklarek, D.; Lehrer, R. I. Purification and Antibacterial Activity of Antimicrobial Peptides of Rabbit Granulocytes. *Infect. Immun.* **1984**, 45 (1), 150–154.
- (68) Giovannini, M. G.; Poulter, L.; Gibson, B. W.; Williams, D. H. Biosynthesis and Degradation of Peptides Derived from *Xenopus Laevis* Prohormones. *Biochem. J.* **1987**, 243 (1), 113–120.
- (69) Site Internet : [Http://Aps.Unmc.Edu/AP/Main.Php](http://Aps.Unmc.Edu/AP/Main.Php).
- (70) Slaninová, J.; Mlsová, V.; Kroupová, H.; Alán, L.; Tůmová, T.; Monincová, L.; Borovičková, L.; Fučík, V.; Čeřovský, V. Toxicity Study of Antimicrobial Peptides from Wild Bee Venom and Their Analogs toward Mammalian Normal and Cancer Cells. *Peptides* **2012**, 33 (1), 18–26.
- (71) Yount, N. Y.; Yeaman, M. R. Emerging Themes and Therapeutic Prospects for Anti-Infective Peptides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, 52 (1), 337–360.
- (72) Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, 6.
- (73) Brandenburg, L.-O.; Merres, J.; Albrecht, L.-J.; Varoga, D.; Pufe, T. Antimicrobial Peptides: Multifunctional Drugs for Different Applications. *Polymers* **2012**, 4 (1), 539–560.
- (74) Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, 19 (3), 491–511.
- (75) Laverty, G.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12 (10), 6566–6596.

- (76) Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* **2003**, 55 (1), 27–55.
- (77) Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E. W. Mechanism of Interaction of Different Classes of Cationic Antimicrobial Peptides with Planar Bilayers and with the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia Coli* [†]. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, 38 (22), 7235–7242.
- (78) Hara, T.; Mitani, Y.; Tanaka, K.; Uematsu, N.; Takakura, A.; Tachi, T.; Kodama, H.; Kondo, M.; Mori, H.; Otaka, A.; Nobutaka, F.; Matsuzaki, K. Heterodimer Formation between the Antimicrobial Peptides Magainin 2 and PGLa in Lipid Bilayers: A Cross-Linking Study. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, 40 (41), 12395–12399.
- (79) He, K.; Ludtke, S. J.; Worcester, D. L.; Huang, H. W. Neutron Scattering in the Plane of Membranes: Structure of Alamethicin Pores. *Biophys. J.* **1996**, 70 (6), 2659–2666.
- (80) Zasloff, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature* **2002**, 415 (6870), 389–395.
- (81) Cho, J. The Novel Biological Action of Antimicrobial Peptides via Apoptosis Induction. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 22 (11), 1457–1466.
- (82) Kristian, S. A.; Lauth, X.; Victor, N.; Goetz, F.; Neumeister, B.; Peschel, A.; Landmann, R. Alanylation of Teichoic Acids Protects *Staphylococcus Aureus* against Toll-like Receptor 2-Dependent Host Defense in a Mouse Tissue Cage Infection Model. *J. Infect. Dis.* **2003**, 188 (3), 414–423.
- (83) Nizet, V. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Human Bacterial Pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2006**, 8 (1), 11.
- (84) Cao, L.; Dai, C.; Li, Z.; Fan, Z.; Song, Y.; Wu, Y.; Cao, Z.; Li, W. Antibacterial Activity and Mechanism of a Scorpion Venom Peptide Derivative In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* **2012**, 7 (7), e40135.
- (85) Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T. R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; Yu, L.-F.; Gu, D.; Ren, H.; Chen, X.; Lv, L.; He, D.; Zhou, H.; Liang, Z.; Liu, J.-H.; Shen, J. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, 16 (2), 161–168.
- (86) Yoon, J.; Urban, C.; Terzian, C.; Mariano, N.; Rahal, J. J. In Vitro Double and Triple Synergistic Activities of Polymyxin B, Imipenem, and Rifampin against Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48 (3), 753–757.
- (87) Yu, Z.; Qin, W.; Lin, J.; Fang, S.; Qiu, J. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *BioMed Res. Int.* 2015 (ID 679109).
- (88) Chihara, S.; Ito, A.; Yahata, M.; Tobita, T.; Koyama, Y. Chemical Synthesis, Isolation and Characterization of α -N-Fattyacyl Colistin Nonapeptide with Special Reference to the Correlation between Antimicrobial Activity and Carbon Number of Fattyacyl Moiety. *Agric. Biol. Chem.* **1974**, 38 (3), 521–529.
- (89) Okimura, K.; Ohki, K.; Sato, Y.; Ohnishi, K.; Sakura, N. Semi-Synthesis of Polymyxin B (2-10) and Colistin (2-10) Analogs Employing the Trichloroethoxycarbonyl (Troc) Group for Side Chain Protection of α,γ -Diaminobutyric Acid Residues. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2007**, 55 (12), 1724–1730.
- (90) Velkov, T.; Roberts, K. D.; Thompson, P. E.; Li, J. Polymyxins: A New Hope in Combating Gram-Negative Superbugs? *Future Med. Chem.* **2016**, 8 (10), 1017–1025.

- (91) Witzke, N. M.; Heding, H. Broad-Spectrum Derivatives of Polymyxin B and Colistin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1976**, 29 (12), 1349–1350.
- (92) Weinstein, J.; Afonso, A.; Moss, E.; Miller, G. H. Selective Chemical Modifications of Polymyxin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8 (23), 3391–3396.
- (93) Kanazawa, K.; Sato, Y.; Ohki, K.; Okimura, K.; Uchida, Y.; Shindo, M.; Sakura, N. Contribution of Each Amino Acid Residue in Polymyxin B3 to Antimicrobial and Lipopolysaccharide Binding Activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2009**, 57 (3), 240–244.
- (94) Davis, S. D.; Iannetta, A.; Wedgwood, R. J. Activity of Colistin against *Pseudomonas Aeruginosa*: Inhibition by Calcium. *J. Infect. Dis.* **1971**, 124 (6), 610–612.
- (95) Clausell, A.; Garcia-Subirats, M.; Pujol, M.; Busquets, M. A.; Rabanal, F.; Cajal, Y. Gram-Negative Outer and Inner Membrane Models: Insertion of Cyclic Cationic Lipopeptides. *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111 (3), 551–563.
- (96) Cajal, Y.; Rogers, J.; Berg, O. G.; Jain, M. K. Intermembrane Molecular Contacts by Polymyxin B Mediate Exchange of Phospholipids. *Biochemistry (Mosc.)* **1996**, 35 (1), 299–308.
- (97) Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Hayete, B.; Lawrence, C. A.; Collins, J. J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* **2007**, 130 (5), 797–810.
- (98) Yeom, J.; Imlay, J. A.; Park, W. Iron Homeostasis Affects Antibiotic-Mediated Cell Death in *Pseudomonas* Species. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (29), 22689–22695.
- (99) Sampson, T. R.; Liu, X.; Schroeder, M. R.; Kraft, C. S.; Burd, E. M.; Weiss, D. S. Rapid Killing of *Acinetobacter Baumannii* by Polymyxins Is Mediated by a Hydroxyl Radical Death Pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, 56 (11), 5642–5649.
- (100) Romsang, A.; Leesukon, P.; Duangnkern, J.; Vattanaviboon, P.; Mongkolsuk, S. Mutation of the Gene Encoding Monothiol Glutaredoxin (GrxD) in *Pseudomonas Aeruginosa* Increases Its Susceptibility to Polymyxins. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, 45 (3), 314–318.
- (101) Kaihami, G. H.; Almeida, J. R. F. de; Santos, S. S. dos; Netto, L. E. S.; Almeida, S. R. de; Baldini, R. L. Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. *PLOS Pathog.* **2014**, 10 (10), e1004442.
- (102) Deris, Z. Z.; Akter, J.; Sivanesan, S.; Roberts, K. D.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Li, J.; Velkov, T. A Secondary Mode of Action of Polymyxins against Gram-Negative Bacteria Involves the Inhibition of NADH-Quinone Oxidoreductase Activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2014**, 67 (2), 147–151.
- (103) Moskowitz, S. M.; Ernst, R. K.; Miller, S. I. PmrAB, a Two-Component Regulatory System of *Pseudomonas Aeruginosa* That Modulates Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and Addition of Aminoarabinose to Lipid A. *J. Bacteriol.* **2004**, 186 (2), 575–579.
- (104) Kato, A.; Chen, H. D.; Latifi, T.; Groisman, E. A. Reciprocal Control between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of Its Lipopolysaccharide. *Mol. Cell* **2012**, 47 (6), 897–908.
- (105) Moffatt, J. H.; Harper, M.; Harrison, P.; Hale, J. D. F.; Vinogradov, E.; Seemann, T.; Henry, R.; Crane, B.; Michael, F. S.; Cox, A. D.; Adler, B.; Nation, R. L.; Li, J.; Boyce, J. D. Colistin Resistance in *Acinetobacter Baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (12), 4971–4977.

- (106) Schweizer, H. P. Efflux as a Mechanism of Resistance to Antimicrobials in *Pseudomonas Aeruginosa* and Related Bacteria: Unanswered Questions. *Genet Mol Res* **2003**, 2 (1), 48–62.
- (107) Padilla, E.; Llobet, E.; Doménech-Sánchez, A.; Martínez-Martínez, L.; Bengoechea, J. A.; Albertí, S. *Klebsiella Pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (1), 177–183.
- (108) Warner, D. M.; Levy, S. B. Different Effects of Transcriptional Regulators MarA, SoxS and Rob on Susceptibility of *Escherichia Coli* to Cationic Antimicrobial Peptides (CAMPs): Rob-Dependent CAMP Induction of the MarRAB Operon. *Microbiology* **2010**, 156 (2), 570–578.
- (109) Macfarlane, E. L. A.; Kwasnicka, A.; Ochs, M. M.; Hancock, R. E. W. PhoP–PhoQ Homologues in *Pseudomonas Aeruginosa* Regulate Expression of the Outer-Membrane Protein OprH and Polymyxin B Resistance. *Mol. Microbiol.* **1999**, 34 (2), 305–316.
- (110) Jeannin, P.; Magistrelli, G.; Goetsch, L.; Haeuw, J.-F.; Thieblemont, N.; Bonnefoy, J.-Y.; Delneste, Y. Outer Membrane Protein A (OmpA): A New Pathogen-Associated Molecular Pattern That Interacts with Antigen Presenting Cells—impact on Vaccine Strategies. *Vaccine* **2002**, 20, Supplement 4, A23–A27.
- (111) Llobet, E.; Tomás, J. M.; Bengoechea, J. A. Capsule Polysaccharide Is a Bacterial Decoy for Antimicrobial Peptides. *Microbiology* **2008**, 154 (12), 3877–3886.
- (112) Division of thoracic surgery NYU <https://med.nyu.edu/cvsurgery/physicians/treatment-technologies/photodynamic-therapy-pdt> (accessed Jul 11, 2017).
- (113) ONCO-THAI - Thérapies Laser Assistées par l'Image pour l'Oncologie <http://www.onco-thai.fr/index.php?lang=fr> (accessed Jul 11, 2017).
- (114) St. Luke's - Photodynamic Therapy for Age-Related Macular Degeneration <http://www.stluke.com.ph/photodynamic-therapy-for-age-related-macular-degeneration.html> (accessed Jul 11, 2017).
- (115) Ethirajan, M.; Chen, Y.; Joshi, P.; Pandey, R. K. The Role of Porphyrin Chemistry in Tumor Imaging and Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 40 (1), 340–362.
- (116) Vogel, A.; Venugopalan, V. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (2), 577–644.
- (117) Grosjean, P.; Wagnieres, G.; Fontollet, C.; van den Bergh, H.; Monnier, P. Clinical Photodynamic Therapy for Superficial Cancer in the Oesophagus and the Bronchi: 514 Nm Compared with 630 Nm Light Irradiation after Sensitization with Photofrin II. *Br. J. Cancer* **1998**, 77 (11), 1989–1995.
- (118) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, 61 (4), 250–281.
- (119) Jeffes, E. W.; McCullough, J. L.; Weinstein, G. D.; Kaplan, R.; Glazer, S. D.; Taylor, J. R. Photodynamic Therapy of Actinic Keratoses with Topical Aminolevulinic Acid Hydrochloride and Fluorescent Blue Light. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2001**, 45 (1), 96–104.
- (120) Dai, T.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Localized Infections—State of the Art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2009**, 6 (3–4), 170–188.

- (121) Yin, R.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22* (18), 2159–2185.
- (122) Taylor, M. N.; Gonzalez, M. L. The Practicalities of Photodynamic Therapy in Acne Vulgaris. *Br. J. Dermatol.* **2009**, *160* (6), 1140–1148.
- (123) Morton, C. A. Photodynamic Therapy in Acne: Can We Achieve Therapeutic Gain without Pain?: Commentaries. *Br. J. Dermatol.* **2011**, *165* (5), 932–933.
- (124) Neugebauer, J.; Jozsa, M.; Kübler, A. [Antimicrobial photodynamic therapy for prevention of alveolar osteitis and post-extraction pain]. *Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie MKG* **2004**, *8* (6), 350–355.
- (125) Jablonski, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
- (126) Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24* (2), 259–268.
- (127) Wilson, B. C.; Van Lier, J. E. Radiolabelled Photosensitizers for Tumour Imaging and Photodynamic Therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **1989**, *3* (3), 459.
- (128) Mathai, S.; Smith, T. A.; Ghiggino, K. P. Singlet Oxygen Quantum Yields of Potential Porphyrin-Based Photosensitisers for Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6* (9), 995.
- (129) Ellis, J. W.; Kneser, H. O. A Combination Relation in the Absorption Spectrum of Liquid Oxygen. *Phys. Rev.* **1933**, *44* (5), 420–420.
- (130) Stallivieri, A.; Le Guern, F.; Vanderesse, R.; Meledje, E.; Jori, G.; Frochot, C.; Acherar, S. Synthesis and Photophysical Properties of the Photoactivatable Cationic Porphyrin 5-(4-N-Dodecylpyridyl)-10,15,20-Tri(4-N-Methylpyridyl)-21H,23H-Porphyrin Tetraiodide for Anti-Malaria PDT. *Photochem Photobiol Sci* **2015**, *14* (7), 1290–1295.
- (131) Dysart, J. S.; Patterson, M. S. Characterization of Photofrin Photobleaching for Singlet Oxygen Dose Estimation during Photodynamic Therapy of MLL Cells in Vitro. *Phys. Med. Biol.* **2005**, *50* (11), 2597–2616.
- (132) Davies, M. J. Singlet Oxygen-Mediated Damage to Proteins and Its Consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305* (3), 761–770.
- (133) Epstein, J. H. Phototherapy and Photochemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *322* (16), 1149–1151.
- (134) Raab, O. Z. *Biol.* **1900**, *39*, 524–526.
- (135) Jodlbauer, A.; Tappeiner, H. V. Das Photochemische Verhalten Des Quecksilberoxalats (Eder'sche Lösung) Bei Abwesenheit von Sauerstoff Und Bei Anwesenheit Gewisser Fluorescirender Stoffe. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38* (3), 2602–2609.
- (136) Wallis, C.; Melnick, J. L. Photodynamic Inactivation of Animal Viruses*: A Review. *Photochem. Photobiol.* **1965**, *4* (2), 159–170.
- (137) Brockmann, H.; Pohl, F.; Maier, K.; Haschad, M. N. Über Das Hypericin, Den Photodynamischen Farbstoff Des Johanniskrautes (*Hypericum Perforatum*). *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1942**, *553* (1), 1–52.
- (138) Avato, P.; Raffo, F.; Guglielmi, G.; Vitali, C.; Rosato, A. Extracts from St John's Wort and Their Antimicrobial Activity. *Phytother. Res. PTR* **2004**, *18* (3), 230–232.
- (139) Engelhardt, V.; Krammer, B.; Plaetzer, K. Antibacterial Photodynamic Therapy Using Water-Soluble Formulations of Hypericin or MTHPC Is Effective in Inactivation of

Staphylococcus Aureus. Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. **2010**, 9 (3), 365–369.

- (140) Pathak, M. A.; Daniels, F.; Fitzpatrick, T. B. The Presently Known Distribution of Furocoumarins (Psoralens) in Plants. *J. Invest. Dermatol.* **1962**, 39 (3), 225–239.
- (141) El-Mofty, A.; El-Mofty, A. M.; Abdelal, H.; El-Hawary, M. F. S. Studies on the Mode of Action of Psoralen Derivatives. *J. Invest. Dermatol.* **1959**, 32 (6), 645–649.
- (142) Stallivieri, A. Synthèse de Systèmes à Base de Photosensibilisateurs Pour l'amélioration de La Sélectivité Tumorale En Thérapie Photodynamique, Université de Lorraine, 2015.
- (143) Margolis-Nunno, H.; Williams, B.; Rywkin, S.; Geacintov, N.; Horowitz, B. Virus Sterilization in Platelet Concentrates with Psoralen and Ultraviolet A Light in the Presence of Quenchers. *Transfusion (Paris)* **1992**, 32 (6), 541–547.
- (144) Ciaravino, V.; McCullough, T.; Cimino, G.; Sullivan, T. Preclinical Safety Profile of Plasma Prepared Using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sang.* **2003**, 85 (3), 171–182.
- (145) Ruby, A. J.; Kuttan, G.; Dinesh Babu, K.; Rajasekharan, K. N.; Kuttan, R. Anti-Tumour and Antioxidant Activity of Natural Curcuminoids. *Cancer Lett.* **1995**, 94 (1), 79–83.
- (146) Chignell, C. F.; Bilskj, P.; Reszka, K. J.; Motten, A. G.; Sik, R. H.; Dahl, T. A. Spectral and Photochemical Properties of Curcumin. *Photochem. Photobiol.* **1994**, 59 (3), 295–302.
- (147) Paschoal, M. A.; Lin, M.; Santos-Pinto, L.; Duarte, S. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on *Streptococcus Mutans* Using Curcumin and Toluidine Blue Activated by a Novel LED Device. *Lasers Med. Sci.* **2015**, 30 (2), 885–890.
- (148) Tovsen, M. L.; Bruzell, E.; Ferrari, E.; Saladini, M.; Gaware, V. S.; Másson, M.; Kristensen, S.; Tønnesen, H. H. Antibacterial Phototoxic Effects of Synthetic Asymmetric and Glycosylated Curcuminoids in Aqueous Formulations. *J. Photochem. Photobiol. B* **2014**, 140, 150–156.
- (149) Thakuri, P. S.; Joshi, R.; Basnet, S.; Pandey, S.; Tadjale, S. D.; Mishra, N. Antibacterial Photodynamic Therapy on *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa* In-Vitro. *Nepal Med. Coll. J. NMCJ* **2011**, 13 (4), 281–284.
- (150) O'Rourke, J. F.; Dowds, B. C. Dye-Mediated Photodynamic Inactivation of *Bacillus Subtilis*. *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, 20 (1), 76S.
- (151) Flors, C.; Nonell, S. Light and Singlet Oxygen in Plant Defense Against Pathogens: Phototoxic Phenalenone Phytoalexins. *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39 (5), 293–300.
- (152) Oliveros, E.; Suardi-Murasecco, P.; Aminian-Saghafi, T.; Braun, A. M.; Hansen, H.-J. 1H-Phenalen-1-One: Photophysical Properties and Singlet-Oxygen Production. *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74 (1), 79–90.
- (153) Nonell, S.; González, M.; Trull, F. R. 1H-Phenalen-1-One-2-Sulfonic Acid: An Extremely Efficient Singlet Molecular Oxygen Sensitizer for Aqueous Media. *Afinidad* **1993**, 445–450.
- (154) Cieplik, F.; Späth, A.; Regensburger, J.; Gollmer, A.; Tabenski, L.; Hiller, K.-A.; Bäuml, W.; Maisch, T.; Schmalz, G. Photodynamic Biofilm Inactivation by SAPYR—An Exclusive Singlet Oxygen Photosensitizer. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 65, 477–487.
- (155) Spaeth, A.; Leibl, C.; Cieplik, F.; Lehner, K.; Regensburger, J.; Hiller, K.-A.; Bäuml, W.; Schmalz, G.; Maisch, T. Improving Photodynamic Inactivation of Bacteria in

- Dentistry: Highly Effective and Fast Killing of Oral Key Pathogens with Novel Tooth-Colored Type-II Photosensitizers. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (12), 5157–5168.
- (156) Wainwright, M.; Crossley, K. B. Methylene Blue--a Therapeutic Dye for All Seasons? *J. Chemother. Florence Italy* **2002**, 14 (5), 431–443.
- (157) Tang, W.; Xu, H.; Park, E. J.; Philbert, M. A.; Kopelman, R. Encapsulation of Methylene Blue in Polyacrylamide Nanoparticle Platforms Protects Its Photodynamic Effectiveness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 369 (2), 579–583.
- (158) Schäfer, F.; Nicholson, J. A.; Gerritsen, N.; Wright, R. L.; Gillam, D. G.; Hall, C. The Effect of Oral Care Feed-Back Devices on Plaque Removal and Attitudes towards Oral Care. *Int. Dent. J.* **2003**, 53 (6 Suppl 1), 404–408.
- (159) Wood, S. Erythrosine Is a Potential Photosensitizer for the Photodynamic Therapy of Oral Plaque Biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, 57 (4), 680–684.
- (160) Bellin, J. S.; Lutwick, L.; Jonas, B. Effects of Photodynamic Action on E. Coli. *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, 132 (1), 157–164.
- (161) Bezman, S. A.; Burtis, P. A.; Izod, T. P.; Thayer, M. A. PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF E. COLI BY ROSE BENGAL IMMOBILIZED ON POLYSTYRENE BEADS. *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28, 325–329.
- (162) Shrestha, A.; Hamblin, M. R.; Kishen, A. Photoactivated Rose Bengal Functionalized Chitosan Nanoparticles Produce Antibacterial/Biofilm Activity and Stabilize Dentin-Collagen. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, 10 (3), 491–501.
- (163) Topaloglu, N.; Gulsoy, M.; Yuksel, S. Antimicrobial Photodynamic Therapy of Resistant Bacterial Strains by Indocyanine Green and 809-Nm Diode Laser. *Photomed. Laser Surg.* **2013**, 31 (4), 155–162.
- (164) George, S.; Hamblin, M. R.; Kishen, A. Uptake Pathways of Anionic and Cationic Photosensitizers into Bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **2009**, 8 (6), 788–795.
- (165) Kim, B. J.; Lee, H. G.; Woo, S. M.; Youn, J. I.; Suh, D. H. Pilot Study on Photodynamic Therapy for Acne Using Indocyanine Green and Diode Laser. *J. Dermatol.* **2009**, 36 (1), 17–21.
- (166) Leite, I. S.; Geralde, M. C.; Salina, A. C.; Medeiros, A. I.; Kurachi, C.; Bagnato, V. S.; Inada, N. M. Photodynamic Inactivation of Microorganisms Which Cause Pulmonary Diseases with Infrared Light: An *in Vitro* Study; Suter, M. J., Lam, S., Brenner, M., Tearney, G. J., Wang, T. D., Eds.; 2014; p 89271A.
- (167) Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. BODIPY Dyes in Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (1), 77–88.
- (168) Caruso, E.; Banfi, S.; Barbieri, P.; Leva, B.; Orlandi, V. T. Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Cationic BODIPY Photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B* **2012**, 114, 44–51.
- (169) Gouterman, M. Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, 6, 138–163.
- (170) Gouterman, M.; Wagnière, G. H.; Snyder, L. C. Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1963**, 11 (1), 108–127.
- (171) Rezazgui, O. Towards a Bio-Inspired Photoherbicide: Synthesis and Studies of Fluorescent Tagged or Water-Soluble Porphyrins, from Solution to Plant Cells, Limoges, 2015.
- (172) Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Gonsalves, A. M. d'A. R.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. Photoacoustic Measurements of Porphyrin Triplet-State Quantum Yields and Singlet-Oxygen Efficiencies. *Chem. – Eur. J.* **1998**, 4 (11), 2299–2307.

- (173) Gouterman, M.; Khalil, G.-E. Porphyrin Free Base Phosphorescence. *J. Mol. Spectrosc.* **1974**, 53 (1), 88–100.
- (174) Seybold, P. G.; Gouterman, M. Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1969**, 31 (1), 1–13.
- (175) Zenkevich, E.; Sagun, E.; Knyukshto, V.; Shulga, A.; Mironov, A.; Efremova, O.; Bonnett, R.; Songca, S. P.; Kassem, M. Photophysical and Photochemical Properties of Potential Porphyrin and Chlorin Photosensitizers for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B* **1996**, 33 (2), 171–180.
- (176) Gentemann, S.; Medforth, C. J.; Forsyth, T. P.; Nurco, D. J.; Smith, K. M.; Fajer, J.; Holten, D. Photophysical Properties of Conformationally Distorted Metal-Free Porphyrins. Investigation into the Deactivation Mechanisms of the Lowest Excited Singlet State. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116 (16), 7363–7368.
- (177) Figueiredo, T. L. C.; Johnstone, R. A. W.; Sørensen, A. M. P. S.; Burget, D.; Jacques, P. Determination of Fluorescence Yields, Singlet Lifetimes and Singlet Oxygen Yields of Water-Insoluble Porphyrins and Metalloporphyrins in Organic Solvents and in Aqueous Media. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69 (5), 517–528.
- (178) Fischer, H. *Org Synth* **1941**, 51, 53.
- (179) Labbe, R. F.; Nishida, G. A New Method of Hemin Isolation. *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, 26 (2), 437.
- (180) Thudichum, J. L. W. *Rep Med Privy Counc.* **1867**, 10 (Appendix 7), 152.
- (181) Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D.; Mittleman, A. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Res.* **1978**, 38 (8), 2628–2635.
- (182) Jubert, C.; Bailey, G. Isolation of Chlorophylls a and b from Spinach by Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1140 (1–2), 95–100.
- (183) Drogat, N.; Barrière, M.; Granet, R.; Sol, V.; Krausz, P. High Yield Preparation of Purpurin-18 from *Spirulina Maxima*. *Dyes Pigments* **2011**, 88 (1), 125–127.
- (184) Drogat, N.; Gady, C.; Granet, R.; Sol, V. Design and Synthesis of Water-Soluble Polyaminated Chlorins and Bacteriochlorins – With near-Infrared Absorption. *Dyes Pigments* **2013**, 98 (3), 609–614.
- (185) Gossauer, A.; Engel, N. Chlorophyll Catabolism — Structures, Mechanisms, Conversions. *J. Photochem. Photobiol. B* **1996**, 32 (3), 141–151.
- (186) Pallenberg, A. J.; Dobhal, M. P.; Pandey, R. K. Efficient Synthesis of Pyropheophorbide-a and Its Derivatives. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, 8 (2), 287–290.
- (187) Vicente, M. da G. H.; Smith, K. M. Syntheses and Functionalizations of Porphyrin Macrocycles. *Curr. Org. Synth.* **2014**, 11 (1), 3–28.
- (188) Rothmund, P. Porphyrin Studies. III.1 The Structure of the Porphine² Ring System. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61 (10), 2912–2915.
- (189) Rothmund, P.; Menotti, A. R. Porphyrin Studies. IV.1 The Synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63 (1), 267–270.
- (190) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. A Simplified Synthesis for Meso-Tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.* **1967**, 32 (2), 476–476.
- (191) Little, R. G.; Anton, J. A.; Loach, P. A.; Ibers, J. A. The Synthesis of Some Substituted Tetraarylporphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, 12 (2), 343–349.

- (192) Lindsey, J. S. The Synthesis of Meso-Substituted Porphyrins. In *Metalloporphyrins Catalyzed Oxidations*; Montanari, F., Casella, L., Eds.; Catalysis by Metal Complexes; Springer Netherlands, 1994; pp 49–86.
- (193) Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. Rothmund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions. *J. Org. Chem.* **1987**, 52 (5), 827–836.
- (194) Leznoff, C. C.; Svirskaya, P. I. The Synthesis of Unsymmetrical Tetraarylporphyrins on Solid Phases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, 17 (12), 947–947.
- (195) Nascimento, B. F. O.; Pineiro, M.; Rocha Gonsalves, A. M. d'A.; Ramos Silva, M.; Matos Beja, A.; Paixão, J. A. Microwave-Assisted Synthesis of Porphyrins and Metalloporphyrins: A Rapid and Efficient Synthetic Method. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2007**, 11 (02), 77–84.
- (196) Nascimento, B. F. O.; Rocha Gonsalves, A. M. d'A.; Pineiro, M. MnO₂ Instead of Quinones as Selective Oxidant of Tetrapyrrolic Macrocycles. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, 13 (3), 395–398.
- (197) Boëns, B.; Faugeras, P.-A.; Vergnaud, J.; Lucas, R.; Teste, K.; Zerrouki, R. Iodine-Catalyzed One-Pot Synthesis of Unsymmetrical Meso-Substituted Porphyrins. *Tetrahedron* **2010**, 66 (11), 1994–1996.
- (198) Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R. *The Porphyrin Handbook: Synthesis and Organic Chemistry*; Elsevier, 2000.
- (199) Vignaud, Y.; Granet, R.; Krausz, P. An Expedient, Solvent-Free Synthesis of Meso-Arylporphyrins Using Activated Charcoal as a Catalyst. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2006**, 10 (07), 937–941.
- (200) Arsenault, G. P.; Bullock, E.; MacDonald, S. F. Pyrromethanes and Porphyrins Therefrom. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82 (16), 4384–4389.
- (201) Woodward, R. B. The Total Synthesis of Chlorophyll. *Pure Appl. Chem.* **2009**, 2 (3–4), 383–404.
- (202) Ogoshi, H.; Sugimoto, H.; Nishiguchi, T.; Watanabe, T.; Matsuda, Y.; Yoshida, Z. Syntheses of 5-Aryl- and 5,15-Diaryl-2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethylporphines. *Chem. Lett.* **1978**, 7 (1), 29–32.
- (203) Manka, J. S.; Lawrence, D. S. High Yield Synthesis of 5,15-Diarylporphyrins. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30 (50), 6989–6992.
- (204) Montierth, J. M.; Duran, A. G.; Leung, S. H.; Smith, K. M.; Schore, N. E. The Polymer-Supported MacDonald-Type Porphyrin Synthesis: Coupling of Two Dissimilar Dipyrrromethanes. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41 (39), 7423–7426.
- (205) Naik, R.; Joshi, P.; Kaiwar (nee Vakil), S. P.; Deshpande, R. K. Facile Synthesis of Meso-Substituted Dipyrrromethanes and Porphyrins Using Cation Exchange Resins. *Tetrahedron* **2003**, 59 (13), 2207–2213.
- (206) Temelli, B.; Unaleroglu, C. Synthesis of Meso-Tetraphenyl Porphyrins via Condensation of Dipyrrromethanes with N-Tosyl Imines. *Tetrahedron* **2009**, 65 (10), 2043–2050.
- (207) Evstigneeva, R. P. Advances and Perspectives of Porphyrin Synthesis. *Pure Appl. Chem.* **1981**, 53 (6), 1129–1140.
- (208) Paine, J.; Chang, C.; Dolphin, D. SYNTHESIS OF PORPHYRINS VIA DIPYRRROMETHENES. *Heterocycles* **1977**, 7, 831–838.

- (209) Paine, J. B.; Hiom, J.; Dolphin, D. Bromination of Dipyrromethenes for Porphyrin Synthesis. *J. Org. Chem.* **1988**, 53 (12), 2796–2802.
- (210) Taniguchi, S.; Taniguchi, S.; Hasegawa, H.; Nishimura, M.; Takahashi, M. A Facile Route to Tripyrrane from 2,5-Bis(Hydroxymethyl)Pyrrole and the Improved Synthesis of Porphine by The. *Synlett* **1999**, 1999 (01), 73–74.
- (211) Hatscher, S.; Senge, M. O. Synthetic Access to 5,10-Disubstituted Porphyrins. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (1), 157–160.
- (212) Senge, M. O.; Shaker, Y. M.; Pintea, M.; Ryppa, C.; Hatscher, S. S.; Ryan, A.; Sergeeva, Y. Synthesis of Meso-Substituted ABCD-Type Porphyrins by Functionalization Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010 (2), 237–258.
- (213) Dogutan, D. K.; Zaidi, S. H. H.; Thamyongkit, P.; Lindsey, J. S. New Route to ABCD-Porphyrins via Bilanes. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (20), 7701–7714.
- (214) Eisner, U. 690. Some Novel Hydroporphyrins. *J. Chem. Soc.* **1957**, No. 0, 3461–3469.
- (215) Schlesinger, W.; Corwin, A. H.; Sargent, L. J. Synthetic Chlorins and Dihydrochlorins_{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72 (7), 2867–2871.
- (216) Whitlock, H. W.; Hanauer, R.; Oester, M. Y.; Bower, B. K. Diimide Reduction of Porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91 (26), 7485–7489.
- (217) Varamo, M.; Loock, B.; Maillard, P.; Grierson, D. S. Development of Strategies for the Regiocontrolled Synthesis of Meso-5,10,20-Triaryl-2,3-Chlorins. *Org. Lett.* **2007**, 9 (23), 4689–4692.
- (218) Bonnett, R.; Dimsdale, M. J.; Stephenson, G. F. The Meso-Reactivity of Porphyrins and Related Compounds. Part IV. Introduction of Oxygen Functions. *J. Chem. Soc. C* **1969**, No. 4, 564–570.
- (219) Callot, H. J. Stereochimie de l'addition de Carbenes Sur La Meso-Tetraphenylporphine. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 13 (11), 1011–1014.
- (220) Brückner, C.; Dolphin, D. 2,3-Vic-Dihydroxy-Meso-Tetraphenylchlorins from the Osmium Tetroxide Oxidation of Meso-Tetraphenylporphyrin. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (19), 3295–3298.
- (221) Crossley, M. J.; King, L. G. A New Method for Regiospecific Deuteration and Reduction of 5,10,15,20-Tetraphenylporphyrins: Nucleophilic Reaction of Borohydride Ion with 2-Nitro-5,10,15,20-Tetraphenylporphyrins. *J. Org. Chem.* **1993**, 58 (16), 4370–4375.
- (222) Shea, K. M.; Jaquinod, L.; Smith, K. M. Dihydroporphyrin Synthesis: New Methodology. *J. Org. Chem.* **1998**, 63 (20), 7013–7021.
- (223) Snow, R. J.; Fookes, C. J. R.; Battersby, A. R. Synthetic Routes to C-Methylated Chlorins. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, No. 11, 524–526.
- (224) Jacobi, P. A.; Lanz, S.; Ghosh, I.; Leung, S. H.; Löwer, F.; Pippin, D. A New Synthesis of Chlorins. *Org. Lett.* **2001**, 3 (6), 831–834.
- (225) Burns, D. H.; Caldwell, T. M.; Burden, M. W. A Rational Step-by-Step Preparation of a Chlorin from Linear Tetrapyrroles. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34 (18), 2883–2886.
- (226) Braun, A.; Tcherniac, J. Über Die Produkte Der Einwirkung von Acetanhydrid Auf Phthalamid. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, 40 (2), 2709–2714.
- (227) Linstead, R. P. 212. Phthalocyanines. Part I. A New Type of Synthetic Colouring Matters. *J. Chem. Soc.* **1934**, No. 0, 1016–1017.

- (228) Daziano, J.-P. Potentiel Des Phthalocyanines En Photothérapie Dynamique : Synthèse, Propriétés Photophysiques et Activité Biologique Sur Cellules Leucémiques: Étude de La Sélectivité Tumorale, Aix-Marseille, 1996.
- (229) Dumoulin, F.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T. Synthetic Pathways to Water-Soluble Phthalocyanines and Close Analogs. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254 (23–24), 2792–2847.
- (230) Makhseed, S.; Machacek, M.; Alfadly, W.; Tuhl, A.; Vinodh, M.; Simunek, T.; Novakova, V.; Kubat, P.; Rudolf, E.; Zimcik, P. Water-Soluble Non-Aggregating Zinc Phthalocyanine and in Vitro Studies for Photodynamic Therapy. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (95), 11149–11151.
- (231) Hanack, M.; Crucius, G.; Calvete, M.; Ziegler, T. Glycosylated Metal Phthalocyanines. *Curr. Org. Synth.* **2014**, 11 (1), 59–66.
- (232) Hamblin, M. R.; Huang, Y.-Y. *Handbook of Photomedicine*, CRC Press.; 2013.
- (233) Svanberg, K.; Bendsoe, N.; Axelsson, J.; Andersson-Engels, S.; Svanberg, S. Photodynamic Therapy: Superficial and Interstitial Illumination. *J. Biomed. Opt.* **2010**, 15 (4), 041502-041502-10.
- (234) Auler, H.; Banzer, G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z. Für Krebsforsch.* **1942**, 53 (2), 65–68.
- (235) Senge, M. O.; Brandt, J. C. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)Chlorin)—A Second-Generation Photosensitizer†,‡. *Photochem. Photobiol.* **2011**, 87 (6), 1240–1296.
- (236) Lamarche, F. Synthèse et Evaluation Biologique de Porphyrines-Polyamines En Vue de Leur Application En Photothérapie Dynamique Des Cancers, Limoges, 2004.
- (237) Tanaka, M.; Kinoshita, M.; Yoshihara, Y.; Shinomiya, N.; Seki, S.; Nemoto, K.; Hamblin, M. R.; Morimoto, Y. Photodynamic Therapy Using Intra-Articular Photofrin for Murine MRSA Arthritis: Biphasic Light Dose Response for Neutrophil-Mediated Antibacterial Effect. *Lasers Surg. Med.* **2011**, 43 (3), 221–229.
- (238) Malik, Z.; Ladan, H.; Nitzan, Y. Photodynamic Inactivation of Gram-Negative Bacteria: Problems and Possible Solutions. *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, 14 (3), 262–266.
- (239) Hamblin, M. R.; O'Donnell, D. A.; Murthy, N.; Rajagopalan, K.; Michaud, N.; Sherwood, M. E.; Hasan, T. Polycationic Photosensitizer Conjugates: Effects of Chain Length and Gram Classification on the Photodynamic Inactivation of Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49 (6), 941–951.
- (240) Ferro, S.; Ricchelli, F.; Monti, D.; Mancini, G.; Jori, G. Efficient Photoinactivation of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by a Novel Porphyrin Incorporated into a Poly-Cationic Liposome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39 (5), 1026–1034.
- (241) Sol, V.; Branland, P.; Chaleix, V.; Granet, R.; Guilloton, M.; Lamarche, F.; Verneuil, B.; Krausz, P. Amino Porphyrins as Photoinhibitors of Gram-Positive and -Negative Bacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14 (16), 4207–4211.
- (242) Sharma, M.; Visai, L.; Bragheri, F.; Cristiani, I.; Gupta, P. K.; Speziale, P. Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Effects on Staphylococcal Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52 (1), 299–305.
- (243) Sbarra, M. S.; Arciola, C. R.; Di Poto, A.; Saino, E.; Rohde, H.; Speziale, P.; Visai, L. The Photodynamic Effect of Tetra-Substituted N-Methyl-Pyridyl-Porphine Combined with the Action of Vancomycin or Host Defense Mechanisms Disrupts Staphylococcus Epidermidis Biofilms. *Int. J. Artif. Organs* **2009**, 32 (9), 574–583.

- (244) Ooi, N.; Miller, K.; Hobbs, J.; Rhys-Williams, W.; Love, W.; Chopra, I. XF-73, a Novel Antistaphylococcal Membrane-Active Agent with Rapid Bactericidal Activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, 64 (4), 735–740.
- (245) Ooi, N.; Miller, K.; Randall, C.; Rhys-Williams, W.; Love, W.; Chopra, I. XF-70 and XF-73, Novel Antibacterial Agents Active against Slow-Growing and Non-Dividing Cultures of *Staphylococcus Aureus* Including Biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, 65 (1), 72–78.
- (246) Müller, T.; Walter, B.; Wirtz, A.; Burkovski, A. Ammonium Toxicity in Bacteria. *Curr. Microbiol.* **2006**, 52 (5), 400–406.
- (247) Dosselli, R.; Tampieri, C.; Ruiz-González, R.; De Munari, S.; Ragàs, X.; Sánchez-García, D.; Agut, M.; Nonell, S.; Reddi, E.; Gobbo, M. Synthesis, Characterization, and Photoinduced Antibacterial Activity of Porphyrin-Type Photosensitizers Conjugated to the Antimicrobial Peptide Apidaecin 1b. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (3), 1052–1063.
- (248) Dosselli, R.; Ruiz-González, R.; Moret, F.; Agnolón, V.; Compagnin, C.; Mognato, M.; Sella, V.; Agut, M.; Nonell, S.; Gobbo, M.; Reddi, E. Synthesis, Spectroscopic, and Photophysical Characterization and Photosensitizing Activity toward Prokaryotic and Eukaryotic Cells of Porphyrin-Magainin and -Bofurin Conjugates. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (4), 1403–1415.
- (249) Liu, F.; Soh Yan Ni, A.; Lim, Y.; Mohanram, H.; Bhattacharjya, S.; Xing, B. Lipopolysaccharide Neutralizing Peptide–Porphyrin Conjugates for Effective Photoinactivation and Intracellular Imaging of Gram-Negative Bacteria Strains. *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23 (8), 1639–1647.
- (250) Kranz, S.; Guellmar, A.; Völpe, A.; Gitter, B.; Albrecht, V.; Sigusch, B. W. Photodynamic Suppression of *Enterococcus Faecalis* Using the Photosensitizer MTHPC. *Lasers Surg. Med.* **2011**, 43 (3), 241–248.
- (251) Yang, K.; Gitter, B.; Rüger, R.; Albrecht, V.; Wieland, G. D.; Fahr, A. Wheat Germ Agglutinin Modified Liposomes for the Photodynamic Inactivation of Bacteria†. *Photochem. Photobiol.* **2012**, 88 (3), 548–556.
- (252) Tegos, G. P.; Anbe, M.; Yang, C.; Demidova, T. N.; Satti, M.; Mroz, P.; Janjua, S.; Gad, F.; Hamblin, M. R. Protease-Stable Polycationic Photosensitizer Conjugates between Polyethyleneimine and Chlorin(E6) for Broad-Spectrum Antimicrobial Photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50 (4), 1402–1410.
- (253) Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Soncin, M.; Magaraggia, M.; Ferro, S.; Jori, G. Synthesis and Antibacterial Activity of New Poly-S-Lysine–Porphyrin Conjugates. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (26), 6649–6652.
- (254) Wu, M.-F.; Deichelbohrer, M.; Tschernig, T.; Laschke, M. W.; Szentmáry, N.; Hüttenberger, D.; Foth, H.-J.; Seitz, B.; Bischoff, M. Chlorin E6 Mediated Photodynamic Inactivation for Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Keratitis in Mice in Vivo. *Sci. Rep.* **2017**, 7.
- (255) Sigusch, B. W.; Pfitzner, A.; Albrecht, V.; Glockmann, E. Efficacy of Photodynamic Therapy on Inflammatory Signs and Two Selected Periodontopathogenic Species in a Beagle Dog Model. *J. Periodontol.* **2005**, 76 (7), 1100–1105.
- (256) Huang, L.; Huang, Y.-Y.; Mroz, P.; Tegos, G. P.; Zhiyentayev, T.; Sharma, S. K.; Lu, Z.; Balasubramanian, T.; Krayner, M.; Ruzié, C.; Yang, E.; Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Diers, J. R.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R. Stable Synthetic Cationic Bacteriochlorins as Selective Antimicrobial Photosensitizers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (9), 3834–3841.

- (257) Schastak, S.; Ziganshyna, S.; Gitter, B.; Wiedemann, P.; Claudepierre, T. Efficient Photodynamic Therapy against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using THPTS, a Cationic Photosensitizer Excited by Infrared Wavelength. *PLOS ONE* **2010**, 5 (7), e11674.
- (258) Soncin, M.; Fabris, C.; Buseti, A.; Dei, D.; Nistri, D.; Roncucci, G.; Jori, G. Approaches to Selectivity in the Zn(II)–phthalocyanine-Photosensitized Inactivation of Wild-Type and Antibiotic-Resistant Staphylococcus Aureus. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1 (10), 815–819.
- (259) Simonetti, O.; Cirioni, O.; Orlando, F.; Alongi, C.; Lucarini, G.; Silvestri, C.; Zizzi, A.; Fantetti, L.; Roncucci, G.; Giacometti, A.; Offidani, A.; Provinciali, M. Effectiveness of Antimicrobial Photodynamic Therapy with a Single Treatment of RLP068/CI in an Experimental Model of Staphylococcus Aureus Wound Infection. *Br. J. Dermatol.* **2011**, 164 (5), 987–995.
- (260) Vecchio, D.; Dai, T.; Huang, L.; Fantetti, L.; Roncucci, G.; Hamblin, M. R. Antimicrobial Photodynamic Therapy with RLP068 Kills Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Improves Wound Healing in a Mouse Model of Infected Skin Abrasion. *J. Biophotonics* **2013**, 6 (9), 733–742.
- (261) Johnson, G. A.; Muthukrishnan, N.; Pellois, J.-P. Photoinactivation of Gram Positive and Gram Negative Bacteria with the Antimicrobial Peptide (KLAKLAK) 2 Conjugated to the Hydrophilic Photosensitizer Eosin Y. *Bioconjug. Chem.* **2012**, 24 (1), 114–123.
- (262) Deris, Z. Z.; Swarbrick, J. D.; Roberts, K. D.; Azad, M. A. K.; Akter, J.; Horne, A. S.; Nation, R. L.; Rogers, K. L.; Thompson, P. E.; Velkov, T.; Li, J. Probing the Penetration of Antimicrobial Polymyxin Lipopeptides into Gram-Negative Bacteria. *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25 (4), 750–760.
- (263) Azad, M. A. K.; Yun, B.; Roberts, K. D.; Nation, R. L.; Thompson, P. E.; Velkov, T.; Li, J. Measuring Polymyxin Uptake by Renal Tubular Cells: Is BODIPY-Polymyxin B an Appropriate Probe? *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58 (10), 6337–6338.
- (264) Xu, W.-L.; Cui, A.-L.; Hu, X.-X.; You, X.-F.; Li, Z.-R.; Zheng, J.-S. A New Strategy for Total Solid-Phase Synthesis of Polymyxins. *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56 (33), 4796–4799.
- (265) Tsubery, H.; Ofek, I.; Cohen, S.; Fridkin, M. Structure-Function Studies of Polymyxin B Nonapeptide: Implications to Sensitization of Gram-Negative Bacteria. *J. Med. Chem.* **2000**, 43 (16), 3085–3092.
- (266) Thomas, C. J.; Surolia, A. Kinetics of the Interaction of Endotoxin with Polymyxin B and Its Analogs: A Surface Plasmon Resonance Analysis. *FEBS Lett.* **1999**, 445 (2–3), 420–424.
- (267) Maisch, T. Resistance in Antimicrobial Photodynamic Inactivation of Bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, 14 (8), 1518–1526.
- (268) Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. A Review of the Biomaterials Technologies for Infection-Resistant Surfaces. *Biomaterials* **2013**, 34 (34), 8533–8554.
- (269) Lv, W.; Luo, J.; Deng, Y.; Sun, Y. Biomaterials Immobilized with Chitosan for Rechargeable Antimicrobial Drug Delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, 101A (2), 447–455.
- (270) Arciola, C. R.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L.; Costerton, J. W. Biofilm Formation in Staphylococcus Implant Infections. A Review of Molecular Mechanisms and Implications for Biofilm-Resistant Materials. *Biomaterials* **2012**, 33 (26), 5967–5982.

- (271) Speziale, P.; Pietrocola, G.; Rindi, S.; Provenzano, M.; Provenza, G.; Di Poto, A.; Visai, L.; Arciola, C. R. Structural and Functional Role of Staphylococcus Aureus Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules of the Host. *Future Microbiol.* **2009**, *4* (10), 1337–1352.
- (272) Campoccia, D.; Speziale, P.; Ravaioli, S.; Cangini, I.; Rindi, S.; Pirini, V.; Montanaro, L.; Arciola, C. R. The Presence of Both Bone Sialoprotein-Binding Protein Gene and Collagen Adhesin Gene as a Typical Virulence Trait of the Major Epidemic Cluster in Isolates from Orthopedic Implant Infections. *Biomaterials* **2009**, *30* (34), 6621–6628.
- (273) J M Patti; B L Allen; M J McGavin, and; Hook, M. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003101> **2003**.
- (274) Nagaoki, S.; Kawakami, H. Inhibition of Bacterial Adhesion and Biofilm Formation by a Hepatinized Hydrophilic Polymer. *ASAIO J.* **1995**.
- (275) Leckband, D.; Sheth, S.; Halperin, A. Grafted Poly(Ethylene Oxide) Brushes as Nonfouling Surface Coatings. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, *10* (10), 1125–1147.
- (276) Hirota, K.; Murakami, K.; Nemoto, K.; Miyake, Y. Coating of a Surface with 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine (MPC) Co-Polymer Significantly Reduces Retention of Human Pathogenic Microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *248* (1), 37–45.
- (277) Webster, T. J.; Patel, A. A.; Rahaman, M. N.; Sonny Bal, B. Anti-Infective and Osteointegration Properties of Silicon Nitride, Poly(Ether Ether Ketone), and Titanium Implants. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (12), 4447–4454.
- (278) Mitik-Dineva, N.; Wang, J.; Truong, V. K.; Stoddart, P.; Malherbe, F.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Escherichia Coli, Pseudomonas Aeruginosa, and Staphylococcus Aureus Attachment Patterns on Glass Surfaces with Nanoscale Roughness. *Curr. Microbiol.* **2009**, *58* (3), 268–273.
- (279) Bellantone, M.; Coleman, N. J.; Hench, L. L. Bacteriostatic Action of a Novel Four-Component Bioactive Glass. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51* (3), 484–490.
- (280) Muzzarelli, R.; Tarsi, R.; Filippini, O.; Giovanetti, E.; Biagini, G.; Varaldo, P. E. Antimicrobial Properties of N-Carboxybutyl Chitosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34* (10), 2019–2023.
- (281) Gordon, O.; Slenters, T. V.; Brunetto, P. S.; Villaruz, A. E.; Sturdevant, D. E.; Otto, M.; Landmann, R.; Fromm, K. M. Silver Coordination Polymers for Prevention of Implant Infection: Thiol Interaction, Impact on Respiratory Chain Enzymes, and Hydroxyl Radical Induction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (10), 4208–4218.
- (282) Heidenau, F.; Mittelmeier, W.; Detsch, R.; Haenle, M.; Stenzel, F.; Ziegler, G.; Gollwitzer, H. A Novel Antibacterial Titania Coating: Metal Ion Toxicity and in Vitro Surface Colonization. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, *16* (10), 883–888.
- (283) Albers, C. E.; Hofstetter, W.; Siebenrock, K. A.; Landmann, R.; Klenke, F. M. In Vitro Cytotoxicity of Silver Nanoparticles on Osteoblasts and Osteoclasts at Antibacterial Concentrations. *Nanotoxicology* **2013**, *7* (1), 30–36.
- (284) Zhang, W.; Chu, P. K.; Ji, J.; Zhang, Y.; Liu, X.; Fu, R. K. Y.; Ha, P. C. T.; Yan, Q. Plasma Surface Modification of Poly Vinyl Chloride for Improvement of Antibacterial Properties. *Biomaterials* **2006**, *27* (1), 44–51.
- (285) Popelka, A.; Novák, I.; Lehocký, M.; Chodák, I.; Sedláčik, J.; Gajtanska, M.; Sedláčiková, M.; Vesel, A.; Junkar, I.; Kleinová, A.; Špírková, M.; Bílek, F. Anti-

- Bacterial Treatment of Polyethylene by Cold Plasma for Medical Purposes. *Molecules* **2012**, *17* (1), 762–785.
- (286) Rothenburger, S.; Spangler, D.; Bhende, S.; Burkley, D. In Vitro Antimicrobial Evaluation of Coated VICRYL* Plus Antibacterial Suture (Coated Polyglactin 910 with Triclosan) Using Zone of Inhibition Assays. *Surg. Infect.* **2002**, *3* (s1), s79–s87.
 - (287) Kim, B. H.; Seo, H. S.; Jung, S. C.; Ohk, S. H.; Kim, K. H.; Cho, D. L.; Ko, Y. M. Study in Bactericidal Properties of Chlorhexidine Grafting on the Modified Titanium. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11* (2), 1530–1533.
 - (288) Tebbs, S. E.; Elliott, T. S. J. Modification of Central Venous Catheter Polymers to Prevent in Vitro Microbial Colonisation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1994**, *13* (2), 111–117.
 - (289) Willcox, M. d. p.; Hume, E. b. h.; Aliwarga, Y.; Kumar, N.; Cole, N. A Novel Cationic-Peptide Coating for the Prevention of Microbial Colonization on Contact Lenses. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105* (6), 1817–1825.
 - (290) Pfeufer, N. Y.; Hofmann-Peiker, K.; Mühle, M.; Warnke, P. H.; Weigel, M. C.; Kleine, M. Bioactive Coating of Titanium Surfaces with Recombinant Human α -Defensin-2 (RHu α -Defensin-2) May Prevent Bacterial Colonization in Orthopaedic Surgery. *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.* **2011**, *93* (9), 840–846.
 - (291) Mohorčič, M.; Jerman, I.; Zorko, M.; Butinar, L.; Orel, B.; Jerala, R.; Friedrich, J. Surface with Antimicrobial Activity Obtained through Silane Coating with Covalently Bound Polymyxin B. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21* (10), 2775–2782.
 - (292) Salton, M. R. Lytic Agents, Cell Permeability, and Monolayer Penetrability. *J. Gen. Physiol.* **1968**, *52* (1), 227Suppl–52s.
 - (293) Williams, J. F.; Worley, D. Infection-Resistant Nonleachable Materials for Urologic Devices. *J. Endourol.* **2000**, *14* (5), 395–400.
 - (294) Bieser, A. M.; Tiller, J. C. Mechanistic Considerations on Contact-Active Antimicrobial Surfaces with Controlled Functional Group Densities. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11* (4), 526–534.
 - (295) Schaer, T. P.; Stewart, S.; Hsu, B. B.; Klibanov, A. M. Hydrophobic Polycationic Coatings That Inhibit Biofilms and Support Bone Healing during Infection. *Biomaterials* **2012**, *33* (5), 1245–1254.
 - (296) Mei, L.; Ren, Y.; Loontjens, T. J. A.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. Contact-Killing of Adhering Streptococci by a Quaternary Ammonium Compound Incorporated in an Acrylic Resin. *Int. J. Artif. Organs* **2012**, *35* (10), 854–863.
 - (297) Cen, L.; Neoh, K. G.; Kang, E. T. Antibacterial Activity of Cloth Functionalized with N-Alkylated Poly(4-Vinylpyridine). *J. Biomed. Mater. Res. A* **2004**, *71A* (1), 70–80.
 - (298) Abel, T.; Cohen, J. I.; Engel, R.; Filshtinskaya, M.; Melkonian, A.; Melkonian, K. Preparation and Investigation of Antibacterial Carbohydrate-Based Surfaces. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337* (24), 2495–2499.
 - (299) Lin, J.; Qiu, S.; Lewis, K.; Klibanov, A. M. Mechanism of Bactericidal and Fungicidal Activities of Textiles Covalently Modified with Alkylated Polyethylenimine. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83* (2), 168–172.
 - (300) Palermo, E. F.; Vemparala, S.; Kuroda, K. Cationic Spacer Arm Design Strategy for Control of Antimicrobial Activity and Conformation of Amphiphilic Methacrylate Random Copolymers. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (5), 1632–1641.

- (301) Murata, H.; Koepsel, R. R.; Matyjaszewski, K.; Russell, A. J. Permanent, Non-Leaching Antibacterial Surfaces—2: How High Density Cationic Surfaces Kill Bacterial Cells. *Biomaterials* **2007**, 28 (32), 4870–4879.
- (302) Cao, Z.; Sun, Y. N-Halamine-Based Chitosan: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Function. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, 85A (1), 99–107.
- (303) Liang, J.; Chen, Y.; Ren, X.; Wu, R.; Barnes, K.; Worley, S. D.; Broughton, R. M.; Cho, U.; Kocer, H.; Huang, T. S. Fabric Treated with Antimicrobial N-Halamine Epoxides. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, 46 (20), 6425–6429.
- (304) Luo, J.; Sun, Y. Acyclic N-Halamine-Based Biocidal Tubing: Preparation, Characterization, and Rechargeable Biofilm-Controlling Functions. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, 84A (3), 631–642.
- (305) Friedman, A.; Friedman, J. New Biomaterials for the Sustained Release of Nitric Oxide: Past, Present and Future. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, 6 (10), 1113–1122.
- (306) Nablo, B. J.; Prichard, H. L.; Butler, R. D.; Klitzman, B.; Schoenfisch, M. H. Inhibition of Implant-Associated Infections via Nitric Oxide Release. *Biomaterials* **2005**, 26 (34), 6984–6990.
- (307) Carpenter, A. W.; Worley, B. V.; Slomberg, D. L.; Schoenfisch, M. H. Dual Action Antimicrobials: Nitric Oxide Release from Quaternary Ammonium-Functionalized Silica Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (10), 3334–3342.
- (308) Riccio, D. A.; Dobmeier, K. P.; Hetrick, E. M.; Privett, B. J.; Paul, H. S.; Schoenfisch, M. H. Nitric Oxide-Releasing S-Nitrosothiol-Modified Xerogels. *Biomaterials* **2009**, 30 (27), 4494–4502.
- (309) Chopra, I. The Increasing Use of Silver-Based Products as Antimicrobial Agents: A Useful Development or a Cause for Concern? *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, 59 (4), 587–590.
- (310) Jee, R.; Nel, L.; Gnanakumaran, G.; Williams, A.; Eren, E. Four Cases of Anaphylaxis to Chlorhexidine Impregnated Central Venous Catheters: A Case Cluster or the Tip of the Iceberg? *BJA Br. J. Anaesth.* **2009**, 103 (4), 614–615.
- (311) Pascual, A. Pathogenesis of Catheter-Related Infections: Lessons for New Designs. *Clin. Microbiol. Infect.* **2002**, 8 (5), 256–264.
- (312) Raad, I.; Hanna, H. Intravascular Catheters Impregnated with Antimicrobial Agents: A Milestone in the Prevention of Bloodstream Infections. *Support. Care Cancer* **1999**, 7 (6), 386–390.
- (313) Darouiche, R. O.; Fowler, V. G.; Adal, K.; Kielhofner, M.; Mansouri, D.; Reller, L. B. Antimicrobial Activity of Prosthetic Heart Valve Sewing Cuffs Coated With Minocycline and Rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46 (2), 543–545.
- (314) Stewart, S.; Barr, S.; Engiles, J.; Hickok, N. J.; Shapiro, I. M.; Richardson, D. W.; Parvizi, J.; Schaer, T. P. Vancomycin-Modified Implant Surface Inhibits Biofilm Formation and Supports Bone-Healing in an Infected Osteotomy Model in Sheep: A Proof-of-Concept Study. *J. Bone Jt. Surg.-Am. Vol.* **2012**, 94 (15), 1406–1415.
- (315) Neut, D.; Dijkstra, R. J. B.; Thompson, J. I.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J. Antibacterial Efficacy of a New Gentamicin-Coating for Cementless Prostheses Compared to Gentamicin-Loaded Bone Cement. *J. Orthop. Res.* **2011**, 29 (11), 1654–1661.
- (316) Foster, H. A.; Ditta, I. B.; Varghese, S.; Steele, A. Photocatalytic Disinfection Using Titanium Dioxide: Spectrum and Mechanism of Antimicrobial Activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 90 (6), 1847–1868.

- (317) Hashimoto, K.; Irie, H.; Fujishima, A. TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, *44* (12R), 8269.
- (318) Cheng, C.-L.; Sun, D.-S.; Chu, W.-C.; Tseng, Y.-H.; Ho, H.-C.; Wang, J.-B.; Chung, P.-H.; Chen, J.-H.; Tsai, P.-J.; Lin, N.-T.; Yu, M.-S.; Chang, H.-H. The Effects of the Bacterial Interaction with Visible-Light Responsive Titania Photocatalyst on the Bactericidal Performance. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 7.
- (319) Gumy, D.; Morais, C.; Bowen, P.; Pulgarin, C.; Giraldo, S.; Hajdu, R.; Kiwi, J. Catalytic Activity of Commercial of TiO₂ Powders for the Abatement of the Bacteria (E. Coli) under Solar Simulated Light: Influence of the Isoelectric Point. *Appl. Catal. B Environ.* **2006**, *63* (1–2), 76–84.
- (320) Pratap Reddy, M.; Venugopal, A.; Subrahmanyam, M. Hydroxyapatite-Supported Ag–TiO₂ as Escherichia Coli Disinfection Photocatalyst. *Water Res.* **2007**, *41* (2), 379–386.
- (321) Jiménez-Hernández, M. E.; Manjón, F.; García-Fresnadillo, D.; Orellana, G. Solar Water Disinfection by Singlet Oxygen Photogenerated with Polymer-Supported Ru(II) Sensitizers. *Sol. Energy* **2006**, *80* (10), 1382–1387.
- (322) Sakakibara, K.; Nakatsubo, F.; French, A. D.; Rosenau, T. Chiroptical Properties of an Alternatingly Functionalized Cellotriose Bearing Two Porphyrin Groups. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (62), 7672–7674.
- (323) Perni, S.; Prokopovich, P.; Parkin, I. P.; Wilson, M.; Pratten, J. Prevention of Biofilm Accumulation on a Light-Activated Antimicrobial Catheter Material. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (39), 8668–8673.
- (324) Perni, S.; Piccirillo, C.; Kafizas, A.; Uppal, M.; Pratten, J.; Wilson, M.; Parkin, I. P. Antibacterial Activity of Light-Activated Silicone Containing Methylene Blue and Gold Nanoparticles of Different Sizes. *J. Clust. Sci.* **2010**, *21* (3), 427–438.
- (325) Piccirillo, C.; Perni, S.; Gil-Thomas, J.; Prokopovich, P.; Wilson, M.; Pratten, J.; Parkin, I. P. Antimicrobial Activity of Methylene Blue and Toluidine Blue O Covalently Bound to a Modified Silicone Polymer Surface. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (34), 6167–6171.
- (326) Ismail, S.; Perni, S.; Pratten, J.; Parkin, I.; Wilson, M. Efficacy of a Novel Light-Activated Antimicrobial Coating for Disinfecting Hospital Surfaces. *Infect. Control Amp Hosp. Epidemiol.* **2011**, *32* (11), 1130–1132.
- (327) Naik, A. J. T.; Ismail, S.; Kay, C.; Wilson, M.; Parkin, I. P. Antimicrobial Activity of Polyurethane Embedded with Methylene Blue, Toluidene Blue and Gold Nanoparticles against Staphylococcus Aureus; Illuminated with White Light. *Mater. Chem. Phys.* **2011**, *129* (1–2), 446–450.
- (328) Perni, S.; Prokopovich, P.; Piccirillo, C.; Pratten, J.; Parkin, I. P.; Wilson, M. Toluidine Blue-Containing Polymers Exhibit Potent Bactericidal Activity When Irradiated with Red Laser Light. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (18), 2715–2723.
- (329) Cahan, R.; Schwartz, R.; Langzam, Y.; Nitzan, Y. Light-Activated Antibacterial Surfaces Comprise Photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87* (6), 1379–1386.
- (330) Wilson, M. Light-Activated Antimicrobial Coating for the Continuous Disinfection of Surfaces. *Infect. Control Amp Hosp. Epidemiol.* **2003**, *24* (10), 782–784.
- (331) Decraene, V.; Pratten, J.; Wilson, M. Cellulose Acetate Containing Toluidine Blue and Rose Bengal Is an Effective Antimicrobial Coating When Exposed to White Light. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (6), 4436–4439.

- (332) Decraene, V.; Pratten, J.; Wilson, M. Novel Light-Activated Antimicrobial Coatings Are Effective Against Surface-Deposited *Staphylococcus Aureus*. *Curr. Microbiol.* **2008**, 57 (4), 269.
- (333) Schaap, A. P.; Thayer, A. L.; Blossey, E. C.; Neckers, D. C. Polymer-Based Sensitizers for Photooxidations. II. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97 (13), 3741–3745.
- (334) Bezman, S. A.; Burtis, P. A.; Izod, T. P. J.; Thayer, M. A. Photodynamic Inactivation of *E. Coli* by Rose Bengal Immobilized on Polystyrene Beads. *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28 (3), 325–329.
- (335) Guo, Y.; Rogelj, S.; Zhang, P. Rose Bengal-Decorated Silica Nanoparticles as Photosensitizers for Inactivation of Gram-Positive Bacteria. *Nanotechnology* **2010**, 21 (6), 065102.
- (336) Shrestha, A.; Kishen, A. Polycationic Chitosan-Conjugated Photosensitizer for Antibacterial Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2012**, 88 (3), 577–583.
- (337) Osifeko, O. L.; Nyokong, T. Applications of Lead Phthalocyanines Embedded in Electrospun Fibers for the Photoinactivation of *Escherichia Coli* in Water. *Dyes Pigments* **2014**, 111, 8–15.
- (338) Mosinger, J.; Lang, K.; Kubát, P.; Sýkora, J.; Hof, M.; Plíštil, L.; Mosinger, B. Photofunctional Polyurethane Nanofabrics Doped by Zinc Tetraphenylporphyrin and Zinc Phthalocyanine Photosensitizers. *J. Fluoresc.* **2009**, 19 (4), 705–713.
- (339) Anaya-Plaza, E.; van de Winckel, E.; Mikkilä, J.; Malho, J.-M.; Ikkala, O.; Gulías, O.; Bresolí-Obach, R.; Agut, M.; Nonell, S.; Torres, T.; Kostianen, M. A.; de la Escosura, A. Photoantimicrobial Biohybrids by Supramolecular Immobilization of Cationic Phthalocyanines onto Cellulose Nanocrystals. *Chem. - Eur. J.* **2017**, 23, 4320–4326.
- (340) Bonnett, R.; Krysteva, M. A.; Lalov, I. G.; Artarsky, S. V. Water Disinfection Using Photosensitizers Immobilized on Chitosan. *Water Res.* **2006**, 40 (6), 1269–1275.
- (341) Lucas, R.; Granet, R.; Sol, V.; Le, M. C.; Policar, C.; Rivière, E.; Krausz, P. Synthesis and Cellular Uptake of Superparamagnetic Dextran-Nanoparticles with Porphyrinic Motifs Grafted by Esterification. *E-Polym.* **2013**, 7 (1), 1031–1038.
- (342) Bonnett, R.; Galia, A. Photobactericidal Films Based on Regenerated Cellulose. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **1994**, 8 (1), 68–74.
- (343) Krouit, M.; Granet, R.; Branland, P.; Verneuil, B.; Krausz, P. New Photoantimicrobial Films Composed of Porphyrinated Lipophilic Cellulose Esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (6), 1651–1655.
- (344) Krouit, M.; Granet, R.; Krausz, P. Photobactericidal Films from Porphyrins Grafted to Alkylated Cellulose – Synthesis and Bactericidal Properties. *Eur. Polym. J.* **2009**, 45 (4), 1250–1259.
- (345) Krouit, M.; Granet, R.; Krausz, P. Photobactericidal Plastic Films Based on Cellulose Esterified by Chloroacetate and a Cationic Porphyrin. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16 (23), 10091–10097.
- (346) Ringot, C.; Sol, V.; Granet, R.; Krausz, P. Porphyrin-Grafted Cellulose Fabric: New Photobactericidal Material Obtained by “Click-Chemistry” Reaction. *Mater. Lett.* **2009**, 63 (21), 1889–1891.
- (347) Ringot, C.; Naima, S.; Granet, R.; Bressollier, P.; Sol, V.; Krausz, P. Meso-Functionalized Aminoporphyrins as Efficient Agents for Photo-Antibacterial Surfaces. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2010**, 14 (11), 925–931.

- (348) Mbakidi, J.-P.; Herke, K.; Alvès, S.; Chaleix, V.; Granet, R.; Krausz, P.; Leroy-Lhez, S.; Ouk, T.-S.; Sol, V. Synthesis and Photobiocidal Properties of Cationic Porphyrin-Grafted Paper. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *91* (1), 333–338.
- (349) Nzambe Ta Keki, J. K.; Ouk, T.-S.; Zerrouki, R.; Faugeras, P.-A.; Sol, V.; Brouillette, F. Synthesis and Photobactericidal Properties of a Neutral Porphyrin Grafted onto Lignocellulosic Fibers. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *62*, 61–67.
- (350) Carpenter, B. L.; Feese, E.; Sadeghifar, H.; Argyropoulos, D. S.; Ghiladi, R. A. Porphyrin-Cellulose Nanocrystals: A Photobactericidal Material That Exhibits Broad Spectrum Antimicrobial Activity. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88* (3), 527–536.
- (351) Feese, E.; Sadeghifar, H.; Gracz, H. S.; Argyropoulos, D. S.; Ghiladi, R. A. Photobactericidal Porphyrin-Cellulose Nanocrystals: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Properties. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3528–3539.
- (352) Drogat, N.; Granet, R.; Le Morvan, C.; Bégaud-Grimaud, G.; Krausz, P.; Sol, V. Chlorin-PEI-Labeled Cellulose Nanocrystals: Synthesis, Characterization and Potential Application in PDT. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (11), 3648–3652.
- (353) Lin, N.; Huang, J.; Dufresne, A. Preparation, Properties and Applications of Polysaccharide Nanocrystals in Advanced Functional Nanomaterials: A Review. *Nanoscale* **2012**, *4* (11), 3274–3294.
- (354) Araki, J.; Wada, M.; Kuga, S.; Okano, T. Birefringent Glassy Phase of a Cellulose Microcrystal Suspension. *Langmuir* **2000**, *16* (6), 2413–2415.
- (355) Azizi Samir, M. A. S.; Alloin, F.; Dufresne, A. Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 612–626.
- (356) Miki, K.; Inoue, T.; Kobayashi, Y.; Nakano, K.; Matsuoka, H.; Yamauchi, F.; Yano, T.; Ohe, K. Near-Infrared Dye-Conjugated Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivatives as a Dual Contrast Agent for In Vivo Optical and Photoacoustic Tumor Imaging. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (1), 219–227.
- (357) Zhou, J.; Butchosa, N.; Jayawardena, H. S. N.; Park, J.; Zhou, Q.; Yan, M.; Ramström, O. Synthesis of Multifunctional Cellulose Nanocrystals for Lectin Recognition and Bacterial Imaging. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (4), 1426–1432.
- (358) da Silva Perez, D.; Montanari, S.; Vignon, M. R. TEMPO-Mediated Oxidation of Cellulose III. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (5), 1417–1425.

Annexes

I.	TABLE DES FIGURES	238
II.	TABLE DES TABLEAUX ET EQUATIONS	245
III.	ABREVIATIONS.....	246

I. Table des figures

Figure 1. Exemple de photosensibilisateur cationique, la tetrakis(4-N-méthylpyridyl)-21H,23H-porphyrine (TMPyP)	2
Figure 2. Structure générale des polymyxines.	3
Figure 3. Photos de bactéries au microscope électronique.	6
Figure 4. Composition générale d'une bactérie	6
Figure 5. La croissance bactérienne : Nombre de bactéries en fonction du temps	7
Figure 6. Cycle de formation d'un biofilm.	8
Figure 7. Structure d'un phospholipide.....	9
Figure 8. Structure du peptidoglycane	9
Figure 9. Modélisation d'une paroi bactérienne Gram positif.....	10
Figure 10. Modélisation d'une membrane bactérienne Gram négatif	10
Figure 11. Les différentes voies de la résistance bactérienne	13
Figure 12. Chronologie des premières avancées en Bactériologie	14
Figure 13. Louis Pasteur à gauche ³² et Robert Koch à droite ³³	14
Figure 14. Chronologie des travaux de Pasteur et Koch	15
Figure 15. Structure de la quinine	19
Figure 16. Formule du Pentostam®	19
Figure 17. Structure du Rouge Trypan.....	19
Figure 18. Formule du Prontosil	20
Figure 19. Formule générale des Pénicillines	20
Figure 20. Structure de la streptomycine	21
Figure 21. Cycle lytique d'un bactériophage	23
Figure 22. Formule de la Daptomycine	25
Figure 23. Représentation 3D de A) la margainine 2 (en hélice α) et B) Défensine β humaine (avec les feuillets β en son centre). Les couleurs indiquent l'hydrophobicité : Rouge pour hydrophile et bleu pour hydrophobe, d'après le Protein Data Bank.	25
Figure 24. Interaction entre les AMP et la paroi bactérienne	26
Figure 25. Les différents modèles de perméabilisation de la membrane bactérienne par les AMP	27
Figure 26. Structure générale des polymyxines	29
Figure 27. Formule de "CB-182,204". Dérivé de polymyxine (synthétisé par Cubist Pharmaceuticals).	30

Figure 28. Complexation de la PMB (en rouge) avec un lipide A (en noir). La conformation de la PMB permet de retrouver une structure similaire au lipide A avec la partie hydrophobe (en jaune) et la tête hydrophile (en bleu). Cette complexation est stabilisée par	31
Figure 29. Modes d'action des polymyxines	32
Figure 30. Modification du lipide A (en noir) par le couplage de Ara4N (rouge) ou de pEtN (en vert) chez E.coli.....	33
Figure 31. Les trois composantes obligatoires pour le fonctionnement de la PDT	35
Figure 32. Spectres d'absorptions des protéines, de la mélanine, du collagène (protéine fibreuse qui constitue les tissus), de l'eau, de l'hémoglobine désoxygénée (Hb) et de l'hémoglobine oxygénée (HbO ₂) selon Vogel et al. ¹¹⁵	35
Figure 33. Propagation de la lumière à travers les différentes couches de l'épiderme humain ¹¹⁷	36
Figure 34. Protocole théorique de la stérilisation d'une plaie infectée, par l'aPDT	37
Figure 35. Structure du bleu de Toluidine	37
Figure 36. Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski du processus photophysique de la création des ROS par un PS sous une irradiation lumineuse adéquate et en présence de dioxygène ¹²⁴	38
Figure 37. Orbitales moléculaires des différents états du dioxygène.....	40
Figure 38. Intensité lumineuse induite par la présence d'oxygène singulet produit par l'excitation de la 5,10,15,20-tetra(pyridyl)-21H,23H-porphyrine dans l'éthanol ¹²⁹	40
Figure 39. Oxydation de la 2-deoxyguanosine par les deux catégories de ROS	41
Figure 40. Structure de l'acridine	42
Figure 41. Structure de l' Hypéricine (A)	42
Figure 42. Différents PS non-tétrapyrroliques naturelles. B : Psoralène, C : Méladinine®	43
Figure 43. Structure de la curcumine (forme kéto à gauche et énol à droite)(D).....	43
Figure 44. Structure de la riboflavine (E).....	43
Figure 45. Différents PS non-tétrapyrroliques naturelles (suite) ; F : Phénalène et SAPYR.....	44
Figure 46. Structure du bleu de méthylène (BM).....	44
Figure 47. Structure de l'érythrosine (E)	44
Figure 48. Structure du Rose de Bengale (RB).....	45
Figure 49. Structure du vert d'indocyanine (ICG).....	45
Figure 50. Structure du cBODIPY	45
Figure 51. Structures de la porphine (à gauche) et de la porphyrine (à droite)	46
Figure 52. Numérotation des positions d'une porphyrine et structure d'une métalloporphyrine	46
Figure 53. Différence entre une porphyrine, une chlorine et une bactériochlorine	47
Figure 54. Spectres d'absorbance d'une porphyrine à base libre (violet) et d'une métalloporphyrine (vert) dans le chloroforme ¹⁶⁹	47

Figure 55. Spectres d'absorbance de la protoporphyrine IX dans le chloroforme (violet), de la chlorine e6 dans l'éthanol (rouge) et de la bactériochlorophylle dans le toluene (orange) (d'après PhotochemCad).....	48
Figure 56. Spectres de fluorescence de la protoporphyrine IX dans le chloroforme (violet), de la chlorine e6 dans l'éthanol (rouge) et de la bactériochlorophylle dans le toluene (orange), d'après PhotochemCad.....	49
Figure 57. Structure de la protohème et de dérivés obtenus après traitement.....	50
Figure 58. Synthèse de la purpurine-18 à partir de la chlorophylle a.....	51
Figure 59. Synthèse de la pyrophéophorbide et de la chlorine e6 à partir de la chlorophylle a	52
Figure 60. Mécanisme réactionnel de la condensation des pyrroles et des aldéhydes en milieu acide	53
Figure 61. Synthèse de la TPP selon Rothmund ¹⁸⁶	53
Figure 62. Synthèse de porphyrine substituée par des groupements aromatiques en meso selon Adler et Longo ¹⁸⁸	54
Figure 63. Synthèse de porphyrine asymétrique selon Little ¹⁸⁹	54
Figure 64. Les différentes porphyrines produites lors d'utilisation d'un mélange de deux aldéhydes	55
Figure 65. Synthèse de porphyrine selon Lindsey ¹⁹¹	56
Figure 66. Synthèse de porphyrines selon Woodward et MacDonald ^{198,199}	57
Figure 67. Synthèse de di-aryl-porphyrines à partir de dipyrrométhanones.....	57
Figure 68. Structure des dipyrrométhènes	57
Figure 69. Synthèse de porphyrines utilisant des dipyrrométhènes selon Paine ²⁰⁷	58
Figure 70. Préparation du tripyrrane et synthèse "3+1" d'après Hatscher et Senge ²⁰⁹	58
Figure 71. Fonctionnalisation d'une porphyrine avec des organolithiens	59
Figure 72. Synthèse d'une porphyrine "ABCD" à partir de bilane d'après Lindsey ²¹¹	59
Figure 73. Réduction de l'octaéthylporphyrine en octaéthylchlorine selon Whitlock. ²¹⁴	60
Figure 74. Différentes chlorines obtenues après traitement de l'octaéthylporphyrine. A : oxochlorine, B : cyclopropylchlorine, C : dihydroxychlorine	60
Figure 75. Exemples de réactifs permettant de former une métallophthalocyanine	61
Figure 76. Spectre d'absorbance de la protoporphyrine IX dans le chloroforme (violet) et de la phthalocyanine dans le chloronaphtalène (bleu), d'après PhotochemCad.	61
Figure 77. Deux molécules autorisées en PDT : Le Photofrin® et l'acide 5-aminolévulinique (ALA).....	62
Figure 78. Les stratégies d'optimisation de l'aPDT	63
Figure 79. Exemples de porphyrines cationiques, de gauche à droite : TMPyP, TriPydMeFPP, XF70...64	64
Figure 80. Quelques chlorines et bactériochlorines antibactériennes, de gauche à droite : Foscan®, dérivés de chlorine-e6, THPTS.....	65

Figure 81. Exemples de phtalocyanines cationiques : Zn-PPC et RLP068	66
Figure 82. Schématisation de la première étude	67
Figure 83. Structures chimiques des différents couplages	68
Figure 84. Structure des nanocristaux finales CNCs _{C6-PMB} (3)	68
Figure 85. Les différentes porphyrines cationiques étudiées	70
Figure 86 (S1). ¹ H NMR analysis of 1a	83
Figure 87 (S2). ¹ H NMR analysis of 1b	84
Figure 88 (S3). ¹ H NMR analysis of 1d	85
Figure 89 (S4). ¹ H NMR analysis of 2a	86
Figure 90 (S5). ¹ H NMR analysis of 2b	87
Figure 91 (S6). ¹ H NMR analysis of 2d	88
Figure 92 (S7). ¹ H NMR analysis of 3a	89
Figure 93 (S8). ¹ H NMR analysis of 3b	90
Figure 94 (S9). ¹ H NMR analysis of 3c	91
Figure 95 (S10). ¹ H NMR analysis of 4a	92
Figure 96 (S11). ¹ H NMR analysis of 4b	93
Figure 97 (S12). ¹ H NMR analysis of 4c	94
Figure 98 (S13). ¹ H NMR analysis of 5a	95
Figure 99 (S14). ¹ H NMR analysis of 5b	96
Figure 100 (S15). ¹ H NMR analysis of 5e	97
Figure 101 (S16). ¹ H NMR analysis of 6a	98
Figure 102 (S17). ¹ H NMR analysis of 6b	99
Figure 103 (S18). ¹ H NMR analysis of 6e	100
Figure 104. Structure chimique du composé final 5 (« P ⁺ -PMB »).....	103
Figure 105 (S1). Synthetic route of 1	118
Figure 106 (S2). MS and ¹ H NMR analysis of 1	119
Figure 107 (S3). MS and ¹ H NMR analysis of 2	120
Figure 108 (S4). MS and ¹ H NMR analysis of 3	121
Figure 109 (S5). MS and ¹ H NMR analysis of 4	122
Figure 110 (S6). HRMS analysis of 5	123
Figure 111 (S7). ¹ H NMR analysis of 5	124
Figure 112 (S8). ¹ H COSY NMR analysis of 5	125

Figure 113 (S9). ^1H TOCSY NMR analysis of 5	126
Figure 114 (S10). Absorbance spectra of 2-5 in MeOH ($[\mathbf{2}] = 4.03 \mu\text{M}$, $[\mathbf{3}] = 3.89 \mu\text{M}$, $[\mathbf{4}] = 3.67 \mu\text{M}$, $[\mathbf{5}] = 4.30 \mu\text{M}$)	127
Figure 115 (S11). Absorbance spectra of 3 , TMPyP and 5 ($25 \mu\text{M}$) in tryptic soy broth (A) and in PBS 1X (B), before and after irradiation (348 J/cm^2 , white LED)	128
Figure 116 (S12). Confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF in different conditions: untreated, after incubation with 3 or 5 . Cells were suspended in a solution of 3 or 5 ($1 \mu\text{M}$) for 30 min at 37°C , then washed 3 times with PBS.	129
Figure 117 (S13). Additional confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF and bacteria (<i>P. aeruginosa</i> and <i>S. aureus</i>) after incubation with 5 . Cells were suspended in a solution of 5 ($1 \mu\text{M}$) for 30 min at 37°C , then washed 3 times with PBS.	130
Figure 118. Images en microscopie confocale de mélanges de bactéries (<i>S. aureus</i> à gauche et <i>P. aeruginosa</i>) et de fibroblastes, après le contact avec le composé 5 (40X)	131
Figure 119. Schématisation des interactions entre le composé finale 5 et les deux catégories de membrane bactérienne.....	132
Figure 120. Structure chimique du nouveau composé 5Lys (« P+-PMBLys »)	133
Figure 121 (S1). Synthetic route of 5Lys based on the previous work (Le Guern et al., 2017). a) Propionic acid, 3 h, 140°C . b) Iodométhane, anhydrous DMF, 1 h, 140°C . c) 25% TFA/ H_2O , 5 h, 100°C . d) 6-maleimidohexanoic acid, HCTU, DIEA, anhydrous DMF, 24 h, RT. e) PBS pH 6.5, 24 h, RT.	140
Figure 122 (S2). MS and ^1H NMR analysis of 1Lys.	141
Figure 123 (S3). HRMS analysis of 5Lys	142
Figure 124 (S4). ^1H NMR analysis of 5Lys	143
Figure 125 (S5). ^1H COSY NMR analysis of 5Lys	144
Figure 126 (S6). ^1H TOCSY NMR analysis of 5Lys	145
Figure 127 (S7). Absorbance spectra of 5Lys and 5 in MeOH ($4.3 \mu\text{M}$)	146
Figure 128 (S8). Absorption (A) ($[\mathbf{TMPyP}] = 13.8 \mu\text{M}$, $[\mathbf{5}] = 16 \mu\text{M}$, $[\mathbf{5Lys}] = 16 \mu\text{M}$), fluorescence (B), and phosphorescence (C) spectra of TMPyP , 5 and 5Lys in D_2O ($\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$, $A_{425} \sim 0.2$).	147
Figure 129 (S9). Confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF after incubation with 5Lys . Cells were suspended in a solution of 5Lys ($1 \mu\text{M}$) for 30 min at 37°C , then washed 3 times with PBS.	148
Figure 130 (S10). Additional confocal laser scanning microscopy imaging of NHDF and bacteria (<i>S. aureus</i> and <i>P. aeruginosa</i>) after incubation with 5Lys . Cells were suspended in a solution of 5Lys ($1 \mu\text{M}$) for 30 min at 37°C , then washed 3 times with PBS.	149
Figure 131. Images en microscopie confocale de mélanges de bactéries (<i>S. aureus</i> à gauche et <i>P. aeruginosa</i> à droite) et de fibroblastes, après contact avec le composé 5Lys(40X)	151
Figure 132. Schématisation d'une surface antiadhésive	153
Figure 133. Schématisation d'une surface intrinsèquement bactéricide	154

Figure 134. Principe du revêtement antibactérien	154
Figure 135. Polymyxine B greffée sur un support solide d'après Mohorcic et coll. ²⁸⁷	155
Figure 136. Différentes surfaces cationiques antibactériennes d'après A: Cen et coll. ²⁹³ B: Abel et coll. ²⁹⁴ C: Palermo et coll. ²⁹⁶	156
Figure 137. Exemples de surfaces actives à base de N-halamine selon A: Cao et coll. ²⁹⁸ B: Liang et coll. ²⁹⁹ C: Luo et coll. ³⁰⁰	157
Figure 138. Utilisation de molécules "NO-donor" fixées à des fins bactéricides selon A: Riccio et coll. ³⁰⁴ B: Carpenter et coll. ³⁰³	158
Figure 139. Complexe de ruthénium photobactéricide « RDP ²⁺ » compris dans des cylindres de silicone, selon Jiménez-Hernández et coll. ³¹⁷	159
Figure 140. Film de polyuréthane imprégné de bleu de méthylène via l'utilisation de nanoparticules d'or, selon Naik et coll. ³²³	160
Figure 141. Nanoparticules de chitosan photobactéricides via le greffage covalent de rose de Bengale, selon Shrestha et coll. ¹⁶⁰	160
Figure 142. Nanocristaux de cellulose imprégnés de phthalocyanine cationique, d'après Anaya-Plaza ³³⁵	161
Figure 143. Différentes surfaces photobactéricides élaborées par le LCSN lors des travaux de, A: Krouit et coll. ³³⁹ B: Ringot et coll. ³⁴² C: Mbakidi et coll. ³⁴⁴	162
Figure 144. Structure des nanocristaux finales CNCs _{C6-PMB} (3)	163
Figure 145 (Fig S1). TEM images of samples dispersed in water: unmodified CNCs (A), CNCs _{ox} 1 (B) and CNCs _{C6-PMB} 3 (C). All samples were stained with uranyl acetate for better contrast.	174
Figure 146 (Fig S2). Thermogravimetric analyses (TGA) and differential thermal analyses (DTA) of dried samples : CNCs _{ox} 1, CNCs _{C6} 2 and CNCs _{C6-PMB} 3.	174
Figure 147 (Fig S3). Photooxidation of 9,10-dimethylanthracene (DMA, 95µM) under light irradiation (850 LUX) in presence of CNCs _{ox} 1 (0.164 mg/mL), CNCs _{C6} 2 (0.129 mg/mL), CNCs _{C6-PMB} 3 (0.191 mg/mL), or CNCs _{PMB} 4 (0.164 mg/mL) in N-N-dimethylformamide. Values represent means ± standard deviation of three separate experiments.	175
Figure 148 (Fig S4). Photooxidation of SOSG (10 µM) under red light irradiation (400 LUX) in presence of CNCs _{ox} 1 (0.164 mg/mL), CNCs _{C6} 2 (0.129 mg/mL), CNCs _{C6-PMB} 3 (0.191 mg/mL), or CNCs _{PMB} 4 (0.164 mg/mL) in DPBS (0.1X) . Values represent means ± standard deviation of three separate experiments.	176
Figure 149 (Fig S5). Confocal laser scanning microscopy imaging of <i>S. aureus</i> in different conditions: untreated, in contact with the different CNCs or free PMB. LIVE/DEAD® BacLight™ was used to observe the viability of bacteria. Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green (SYTO9), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). Images were obtained after 30 min of contact at room temperature.	177
Figure 150 (Fig S6). Confocal laser scanning microscopy imaging of <i>E. coli</i> in different conditions: untreated, in contact with the different CNCs or free PMB. LIVE/DEAD® BacLight™ was used to observe the viability of bacteria. Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green (SYTO9),	

whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). Images were obtained after 30 min of contact at room temperature.	178
Figure 151 (Fig S7). Confocal laser scanning microscopy imaging of <i>P. aeruginosa</i> in different conditions: untreated, in contact with the different CNCs or free PMB. LIVE/DEAD® BacLight™ was used to observe the viability of bacteria. Bacteria with intact cell membranes stain fluorescent green (SYTO9), whereas bacteria with damaged membranes stain fluorescent red (PI). Images were obtained after 30 min of contact at room temperature.....	179
Figure 152. Schématisation de l'interaction entre les nanocristaux CNCs_{C6-PMB} (3) et les bactéries Gram négatif	181
Figure 153. Dosage conductimétrique des nanocristaux de cellulose oxydée par de l'hydroxyde de sodium	208
Figure 154. Photooxydation du diméthylanthracène (DMA, 95 µM) sous irradiation lumineuse (850 LUX) et au contact des différents nanocristaux dans le DMF: CNCs_{ox} 1 (0,164 mg/mL), or CNCs_{C6} 2 (0,129 mg/mL), or CNCs_{C6-PMB} 3 (0,191 mg/mL), or CNCs_{PMB} 4 (0,164 mg/mL). Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition.	210
Figure 155. Exemple d'un test de diffusion.....	211
Figure 156. Exemple d'une plaque 24-puits, après incubation	212

II. Table des tableaux et équations

Tableau 1. Récapitulatif non-exhaustif des PS pour l'aPDT	66
Tableau 2. Composition maximum possible pour chaque nanocristaux (DS théoriques). Chaque abréviation représente un différent monomère : « COOH » pour les monomères portant un acide carboxylique, « OH » pour ceux portant un hydroxyle, « c6 » pour ceux portant une chlorure-e6-spermine, « PMB » pour ceux portant une polymyxine et enfin « N-acyl » pour les produits secondaires.	209
Tableau 3. Analyses élémentaires théoriques des différents nanocristaux (calculées avec ChemBioDraw®)	209
Tableau 4. Estimations finales des DS	209
Équation 1. Réactions primaires de composés photosensibles ¹²⁵	39
Équation 2. Réactions photochimiques de l'oxygène ¹²⁵	39
Équation 3. Réaction du transfert énergétique entre le PS et O ₂	39
Équation 4. Formule du rendement quantique de production d'oxygène singulet sur une même durée	39
Équation 5. Formule du rendement quantique de fluorescence sur une même durée	48
Équation 6. La Loi de Beer-Lambert, avec ϵ le coefficient d'absorption molaire (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹), A l'absorbance, l la largeur de la cuve (1 cm) et C la concentration en porphyrine (mol.L ⁻¹).....	193
Équation 7. Calcul du rendement quantique de fluorescence par rapport à une référence (ϕ_0) avec, ϕ_F le rendement quantique, I l'intensité de la phosphorescence, DO l'absorption à la longueur d'onde d'excitation et n l'indice de réfraction du solvant.	193
Équation 8. Calcul du rendement quantique de production d'oxygène singulet par rapport à une référence (ϕ_0) avec, ϕ_Δ le rendement quantique, I l'intensité de la phosphorescence et DO l'absorption à la longueur d'onde d'excitation	194
Équation 9. Calcul du degré d'oxydation (D.O) et de la quantité d'acide carboxylique (n_{acide} en mmol/g) pour CNCs_{ox} (1)	208
Équation 10. Calcul des DS.....	209

III. Abréviations

CCM	Chromatographie sur couche mince
AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALA	5-acide aminolévulinique
AMP	Antimicrobial peptide
aPDT	Thérapie photodynamique antimicrobienne
c6	Chlorine-e6
CMB	Concentration minimale bactéricide
CNCs	Nanocristaux de cellulose
D.O	Degré d'oxydation
Dab	Acide diaminobutyrique
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropylethylamine
DMA	Diméthylanthracène
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DS	Degré de substitution
EA	Acétate d'éthyle
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Ethanol
FBM	Fibroblast basal medium
HCTU	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium-hexafluorophosphate
IR	Infrarouge
LCSN	Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide téichoïques
Lys	Lysine
MBL	Metallo- β -lactamases
MDR	Multidrug resistant
MeOH	Méthanol
MRSA	Méthicilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Mass spectrometry
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate buffer solution
PDI	Photodynamic inactivation
PDT	Thérapie photodynamique

PE	Ether de pétrole
PEI	Polyethylenimine
PI	Iodure de propidium
PMB	Polymyxine B
PS	Photosensibilisateur
RB	Rose de Bengal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
TFA	Acide trifluoroacétique
TPP	Tetrakis-(phényl)-porphyrine
TMPyP	Tetrakis-(4- <i>N</i> -méthylpyridyl)-porphyrine
UFC	Unité formant colonie
UV/Vis	Spectre d'absorbance des ultraviolets et de la lumière visible

Inhibition de souches bactériennes par de nouveaux composés photosensibles conjugués à la polymyxine B

L'émergence de nouvelles souches bactériennes résistantes a signé la fin de l'« âge d'or » des antibiotiques. L'organisation mondiale de la santé a reconnu l'imminence des problèmes associés à ces nouvelles bactéries, qui engendrent de nouveau une mortalité en augmentation. Afin de palier à ce problème, de nouvelles alternatives aux antibiotiques sont envisagées par les chercheurs à travers le monde. La thérapie photodynamique antimicrobienne est l'une de ces alternatives. Elle a su se démarquer grâce à son incapacité à induire la résistance bactérienne. Alors que les résultats furent initialement très prometteurs contre les bactéries Gram positif, une moins bonne sensibilité fut rapidement observée de la part des bactéries Gram négatif. Afin d'augmenter le potentiel antibactérien de cette technique, diverses stratégies furent élaborées comme l'utilisation de photosensibilisateurs cationiques, l'ajout d'un agent de ciblage, ou la présence d'un agent de perméabilisation membranaire. L'un de ces agents est la polymyxine B, un peptide antimicrobien qui arbore une très bonne affinité avec les bactéries Gram négatif. Dans cette étude, nous avons voulu associer chimiquement différents photosensibilisateurs avec des dérivés de polymyxines B de façon covalente, par l'intermédiaire d'un bras « spacer » ou d'une plateforme. L'association de ces deux familles de molécules a permis d'élaborer de nouveaux composés qui ont démontré une activité photobactéricide accrue contre un large spectre de bactérie. De plus, ces composés ont montré une affinité augmentée pour les bactéries, ce qui permettra de réduire les effets secondaires sur les cellules humaines. Cette étude confirme l'importance d'utiliser des peptides antimicrobiens afin d'améliorer la thérapie photodynamique. Ces travaux seront approfondis afin de permettre la création de nouveaux traitements dermatologiques basés sur cette nouvelle thérapie et efficaces contre un large spectre de souche bactérienne

Mots-clés : thérapie photodynamique antimicrobienne, photosensibilisateur, peptide antimicrobien, bactérie, porphyrine, chlorine, cellulose, nanocrystal, cationique, polymyxine

Bacterial inhibition through innovative photosensitizers conjugated to polymyxin B

Despite advances achieved over the last decade, infections caused by multi-drug resistant bacterial strains are increasingly important societal issues that need to be addressed. New approaches have already been developed in order to overcome this problem. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) could provide an alternative to fight infectious bacteria. Interesting results have been obtained against Gram-positive bacteria, but it also appeared that Gram-negative strains were less sensitive to PACT. Enhanced efficacy against Gram-negative bacteria had been previously obtained following three different strategies, which are respectively the use of cationic photosensitizers, photosensitizers bound to antimicrobial peptides, or a membrane disrupting agent. Polymyxin B is an antimicrobial peptide, known as the "last-line" treatment against Gram-negative resistant strains, which has already been used as a disrupting agent in order to improve PACT. In addition of this enhancement, this peptide is known for its strong interaction for Gram-negative bacteria. Thus, in this work, we designed different compounds, consisting of a photosensitizer covalently attached to derivatives of polymyxin B, through a spacer or a chemical platform. These combinations have led to the creation of novel compounds which have shown highly photobactericidal activities against a wide spectrum of bacteria. Moreover, these compounds present enhanced affinity for bacteria, which should significantly reduce side effects on mammalian cells. This study confirmed the importance of using antimicrobial in order to target bacterial strains. Thus, such results may allow the creation of novel PACT-based dermatological treatments efficient against a wide spectrum of bacterial strains.

Keywords : photodynamic antimicrobial chemotherapy, porphyrin, polymyxin, antimicrobial peptide, photosensitizer, chlorin, cellulose, nanocrystal, cationic, bacteria

