



Thèse

2015

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Inactivation de biofilms d'entérocoques faecalis par exposition répétées à l'éosine Y photo-activée à la lumière bleue

Marinic, Karlo

How to cite

MARINIC, Karlo. Inactivation de biofilms d'entérocoques faecalis par exposition répétées à l'éosine Y photo-activée à la lumière bleue. Doctoral Thesis, 2015. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:75934

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:75934>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:75934](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:75934)

TABLE DES MATIÈRES

I PARTIE FRANÇAISE

Résumé	2
Introduction	4
Matériels et Méthodes	7
Résultats	12
Discussion	14
Conclusion	19

II PARTIE ANGLAISE

Abstract	20
Introduction	21
Materials and Methods	24
Results	28
Discussion	31
Conclusions	34
Tables & figures	36
References	41

Inactivation de biofilms d'entérocoques faecalis par expositions répétées à l'éosine Y photo-activée à la lumière bleue

Résumé

En médecine dentaire, la thérapie photodynamique antibactérienne (a-PDT) a montré des résultats prometteurs dans l'inactivation des biofilms bactériens responsables des maladies endodontiques et parodontales. Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de l'éosine Y activée à la lumière bleue selon 3 protocoles d'irradiation (exposition continue, répétée, intermittente) à inactiver les biofilms d'*E. faecalis*, *in vitro*.

Méthodes

Les biofilms d'*E. faecalis* formés sur des disques d'hydroxyapatite ont été incubés avec l'éosine Y, avant d'être exposés à la lumière bleue selon différents protocoles d'irradiation. Les biofilms irradiés avec une exposition continue ont été incubés 40 min avant la photo-activation de 960 s. Pour l'exposition intermittente, les biofilms ont été exposés à la lumière et au photosensibilisateur avant d'être ré-incubés pendant 10 min et de nouveau photo-activés (4 X 240 s) sans renouveler l'éosine Y. Pour l'exposition répétée, l'énergie lumineuse totale a été délivrée dans une série de 4 périodes d'irradiations séparées par des périodes de stockage à l'obscurité ; le photosensibilisateur a été renouvelé entre les 4 irradiations. Après traitement, les bactéries ont été immédiatement marquées avec le LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit (Life technologies) et la viabilité a été évaluée à l'aide de la cytométrie en

flux. Les résultats ont été analysés statistiquement en utilisant des tests ANOVA et les intervalles de comparaison multiple Tukey ($\alpha = 0.05$).

Résultats

La viabilité des biofilms d'*E. faecalis*, exposés à 10 μ M d'éosine Y, a été significativement diminuée par rapport aux biofilms contrôles (seulement lumière ou seulement éosine Y). Après une deuxième exposition à l'éosine Y photo-activée à la lumière bleue, la viabilité a sensiblement diminué de 58% à 12%, tandis que 6.5% des bactéries du biofilm sont restés vivants après une troisième exposition ($p < 0.05$). Seulement 3.5% de la population bactérienne ont survécu après la quatrième exposition. Les protocoles d'irradiation continus et intermittents ont présenté des résultats inférieurs à ceux observés après expositions répétées.

Conclusion

Les résultats de cette étude démontrent que l'éosine Y photo-activée peut inactiver les biofilms d'*E. faecalis* cultivés sur des disques d'hydroxyapatite. L'exposition répétée des biofilms à l'éosine Y activée à la lumière bleue a significativement augmenté l'efficacité du traitement. Des recherches supplémentaires semblent nécessaires pour optimiser l'activité antibactérienne de l'éosine Y photo-activée par la lumière bleue sur les pathogènes oraux.

INTRODUCTION

La prolifération bactérienne à l'intérieur de racines dentaires ayant été mises en contact avec l'environnement buccal par la carie dentaire ou une fracture de la couronne est responsable de l'infection endodontique.¹ Cette infection radiculaire peut être éliminée grâce à l'utilisation d'instruments mécaniques de préparation canalaire associées à des désinfectants endodontiques. Bien que l'hypochlorite de sodium reste le désinfectant endodontique de choix, la photothérapie antibactérienne (a-PDT) a récemment été proposée comme moyen supplémentaire pour éliminer les biofilms bactériens réfractaires aux traitements conventionnels.^{2, 3}

L'activation d'une molécule photosensible ou photosensibilisateur, par une source lumineuse de longueur d'onde correspondante, en présence d'oxygène, est le principe de base de la photothérapie antibactérienne. L'absorption des photons émis par la source lumineuse induit une excitation du photosensibilisateur qui immédiatement produit de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou des radicaux libres (ROS) responsables de la destruction de la membrane et de l'ADN bactérien.⁴

Des études récentes démontrent que les lampes dentaires utilisées pour photopolymériser les résines composites et qui émettent dans le bleu (380-500 nm) peuvent inactiver de nombreux pathogènes oraux lorsque celles-ci sont associées à des photosensibilisateurs appropriés. Le nombre élevé d'études récemment publiées atteste de l'intérêt porté à la photo désinfection activée par la lumière bleue (Tableau 1). PAULINO *et coll.* (2005) ont utilisé une lampe à polymériser pour activer le rose bengal, un dérivé des xanthènes et ont démontré une inactivation complète de cultures planctoniques de *S mutans*.⁵ Les propriétés antibactériennes du

Photosan, un photosensibilisateur commercialisé, activé à l'aide d'une lampe dentaire disponible sur le marché ont été démontrées pour les bactéries Gram positives *S. mutans* et *E. faecalis* en suspension.⁶ D'autres travaux démontrent que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, une bactérie Gram-négative impliquée dans la maladie parodontale peut être inactivée par du rose bengal exposé à la lumière bleue aussi bien en croissance planctonique que sous forme de biofilm.⁷ PAPASTAMOU *et coll.* (2011) a testé différentes formulations de ruthenium exposées à la lumière bleue et ont démontré une réduction significative de la viabilité de *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis* après traitement.⁸ Plus récemment, MANOIL *et coll.* (2014) ont utilisé la cytométrie en flux pour démontrer que la curcumine activée à la lumière bleue peut inactiver des cultures planctoniques ainsi que des biofilms de *S. mutans*.⁹

Malgré ces résultats encourageants, aucune des études citées ci-dessus n'a été capable de démontrer une inactivation totale de biofilms bactériens après exposition à la photothérapie antibactérienne. Pour cette raison, il semblerait souhaitable d'optimiser certains paramètres thérapeutiques tels que la dose de photosensibilisateur, les intervalles incubation-irradiation ou encore la façon de délivrer la lumière dans le but d'augmenter l'efficacité de la photothérapie antibactérienne activée par la lumière bleue.

Une étude de STREET *et coll.* (2010) a confirmé que l'efficacité de la photothérapie antibactérienne envers trois pathogènes majeurs de la maladie parodontale était dépendante de la dose de lumière appliquée.¹⁰ D'autres rapports démontrent que le fractionnement de la dose lumineuse pourrait être bénéfique en termes d'efficacité et notamment dans l'élimination des biofilms de *S. mutans* exposés à l'erythrosine photo-activée.¹¹ Dans une étude récente, SUNG *et coll.* (2013) ont utilisé des modes

d'irradiation intermittents ou répétés pour éradiquer *Mycobacterium tuberculosis*. Leurs résultats indiquent que les expositions intermittentes ou répétées permettent d'améliorer l'efficacité du traitement envers les bacilles tuberculeux.¹² Le fractionnement de la dose lumineuse a été également suggéré en dermatologie pour ralentir la photo-dégradation du photosensibilisateur ALA (acide aminolevulinique) et augmenter l'effet thérapeutique produit.¹³

Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité de l'éosine Y photo-activée à inactiver les biofilms d'*E. faecalis* exposés à trois protocoles d'irradiation différents incluant une irradiation continue, répétée et intermittente, *in vitro*. L'éosine Y a été sélectionnée comme photosensibilisateur parce qu'elle absorbe la lumière bleue (spectre d'absorption entre 220 nm à 570 nm) et parce que des précédents travaux ont mis en évidence son pouvoir à inactiver les lactobacilles et *Candida albicans* après photo-activation.^{14, 15} L'irradiation intermittente consiste à exposer d'abord le pathogène au photosensibilisateur et à la lumière, de ré-incuber le pathogène pendant un certain temps avant de répéter l'irradiation. Pour la a-PDT répétée, la même énergie radiale totale a été délivrée dans une série d'irradiations plus courtes séparées par des temps de repos à l'obscurité ; du photosensibilisateur frais a été rajouté après chaque irradiation. Notre hypothèse était que l'irradiation répétée ou intermittente de l'éosine Y avec la lumière bleue augmenterait l'activité antibactérienne envers les biofilms d'*E. faecalis*.

MATERIEL ET METHODES

Une solution stock (1 mmol/L) d'éosine Y (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) a été préparée en dissolvant la poudre dans du chlorure de sodium 0.9%. Un spectrophotomètre (Cintra 40 UV/VIS, GBC, Dandenong, Australia) a été utilisé pour confirmer l'absorbance de la solution dans les longueurs d'onde bleues (380-500 nm). La solution stock a ensuite été diluée pour évaluer l'activité antibactérienne de plusieurs concentrations d'éosine Y (10-20-40-80 μ M).

Enterococcus faecalis (*E. faecalis* 135737, collection des hôpitaux Universitaires de Genève, CH) a été utilisé pour les essais de photo-inactivation à cause de son rôle prépondérant dans les infections endodontiques réfractaires.¹⁶ Les bactéries ont été mises en culture à partir de stocks congelés sur des plaques d'agar Columbia (Oxoid, Pratteln, CH), puis transférées dans 6mL de milieu BHI (Brain-heart infusion), et incubés à 37°C. Après 24h, la culture a atteint la phase stationnaire de croissance et la densité bactérienne est ajustée en mesurant une densité optique (OD 1: 5×10^9 bactéries) à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK).

Des disques d'hydroxyapatite (HA) de 9.5 mm de diamètre et 2 mm épaisseur, en provenance de Clarkson Chromatography Products (Williamsport, PA, USA), ont été autoclavés à 121° C durant 20 min avant utilisation. Les disques ont ensuite été placés dans des puits de culture (TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland) et inoculés avec 200 μ L de suspension bactérienne placés sur le dessus du disque pour permettre l'attachement cellulaire. Puis, 1.8 mL de milieu BHI medium a été

rajouté dans chaque puit et les spécimens ont été incubés pendant 48 heures à 37°C. Le milieu de culture n'a pas été renouvelé afin d'obtenir des biofilms bactériens en phase stationnaire de croissance. Les études précédentes ont démontré que les biofilms *E. faecalis* peuvent se développer en 48 heures et que le mode de croissance bactérien influence la réponse au traitement antibactérien.^{17, 18}

Source lumineuse

Une lampe à photopolymériser les résines composites (Optilux 501, KerrHawe SA, Bioggio, CH) délivrant une lumière bleue (380-500 nm) a été utilisée pour activer l'éosine Y. L'énergie produite par la source était de 450 mW /cm². La lumière, qui est émise par l'intermédiaire d'un guide de 10.4 mm de diamètre, a été placée 10 mm au-dessus des puits de culture de façon à assurer une irradiation complète du puit, chaque puit de culture ayant été irradié séparément.

Essais antibactériens

Différents protocoles d'irradiation (4 x 240 secondes; 960 secondes) ont été utilisés afin de comparer l'effet d'une irradiation unique et continue avec des irradiations répétées ou intermittentes (voir ci-dessous).

Pour le groupe « exposition continue », les biofilms bactériens sur disques HA ont été rincés avec du 0.9% NaCl pour éliminer les bactéries planctoniques et transférés dans des puits de culture noirs (Greiner Bio-One, Milian, Switzerland) contenant 1mL de photosensibilisateur. Ces puits noirs et opaques ont été sélectionnés afin d'éviter que la lumière n'empiète sur le puit adjacent lors de l'irradiation. Les concentrations

testées dans le groupe exposition continue ont varié entre 10 et 80 μM . Le temps d'incubation était de 40 min et chaque puits a été irradié séparément pendant 960 secondes (Fig. 1). La toxicité de l'éosine Y sans exposition lumineuse a également été évaluée. Les conditions d'incubation et d'irradiation ont été choisies pour correspondre à celles utilisées dans les groupes répétés et intermittents. Les cultures contrôle ont été irradiées ou non-irradiées afin de vérifier l'effet de la lumière sur la viabilité bactérienne.

Pour le groupe « expositions répétées », les biofilms ont été rincés de la même manière que précédemment puis incubés 10 min en présence de 1mL de photosensibilisateur (10-20 μM) avant d'être irradiés pendant 240 secondes (Fig. 1). Après un premier cycle d'irradiation, 8 disques ont été acheminés vers la cytométrie en flux pour en évaluer l'efficacité du traitement, pendant que les disques restants étaient transférés dans de nouveaux puits noirs contenant 1 mL de solution fraîche d'éosine Y de même concentration (10-20 μM). Les disques incubèrent 10 minutes supplémentaires et furent irradiés 240 secondes. Après la deuxième irradiation, 8 disques ont été sortis du groupe pour mesurer la viabilité bactérienne après deux cycles de thérapie photodynamique. Les disques restants ont été replacés dans de nouveaux puits avec 1 mL de photosensibilisateur, incubés 10 minutes et irradiés 240 secondes. La troisième irradiation achevée, 8 disques ont été utilisés pour évaluer l'efficacité du traitement après trois cycles. Le quatrième et dernier cycle de photothérapie a été réalisé après que les disques restants aient été incubés pendant 10 minutes dans de l'éosine Y fraîche et irradiés 240 secondes, avant l'analyse par cytométrie. Cette configuration expérimentale nous a permis d'avoir 4 répliques pour chaque condition d'exposition ; l'expérience fut entièrement répétée trois fois.

Pour le groupe « exposition intermittente », les disques avec biofilm ont été placés dans les plaques 24 puits de culture noirs (Greiner Bio-One, Milian, Switzerland) contenant 1 mL de photosensibilisateur à 40 ou 80 μ M, et incubés 10 minutes avant l'exposition à la lumière bleue pendant 240 secondes (Fig. 1). Successivement à l'irradiation, les disques sont restés stockés dans l'obscurité durant 10 minutes pour être irradiés à nouveau pendant 240 secondes. Après 10 minutes de repos dans le noir, les biofilms ont subi une nouvelle irradiation de 240 secondes. Un quatrième cycle de 10 minutes de pause et 240 seconds d'irradiation fut finalement effectué. Tous les spécimens ont été collectés pour l'évaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux. L'expérience a été répétée trois fois pour contrôler la reproductibilité de l'essai.

Quantification de la viabilité bactérienne

La viabilité bactérienne a été mesurée immédiatement après la photothérapie à l'aide de la cytométrie en flux (CMF). Pour les mesures, les disques d'hydroxyapatite ont été transférés dans des tubes de 15 mL contenant 2 mL de NaCl à 0.9% et agités pendant 2 minutes pour permettre le détachement et la séparation du biofilm. 200 μ L de suspension bactérienne furent ensuite transférés dans des tubes de 1.5 mL de volume, agités à l'aide d'un générateur d'ultrasons pendant 20 secondes et mélangés avec une solution de 200 μ M LIVE/DEAD BacLight ; deux marqueurs pour les acides nucléiques (SYTO 9 et propidium iodide) composent la solution LIVE/DEAD BacLight (LIVE/DEAD BacLight viability kit, Life Technologies, Switzerland). Les longueurs d'ondes de l'excitation/émission pour le SYTO 9 sont de 485/500 nm, lesquelles ont la propriété de pénétrer toutes les cellules. Le propidium iodide (PI) en revanche, est capable d'entrer seulement dans les cellules ayant la

membrane cellulaire endommagée ; ses longueurs d'ondes d'excitation/émission sont de 535/617 nm. Les bactéries marquées ont été incubées pendant 15 minutes dans l'obscurité avant l'évaluation de la viabilité avec la cytométrie en flux. L'analyse a été réalisée en utilisant un instrument BD Accuri C6 flow cytometry ayant un laser de 488 nm. Les émissions du SYTO 9 ont été collectées par le canal FL-1 du cytomètre, tandis que les émissions du PI ont été enregistrées par le canal FL-3. Le chevauchement spectrométrique a été corrigé (3% FL-1/FL-3) et la limite d'exécution limitée à 20,000 événements. Une combinaison de diffusion vers l'avant (forward scatter, FSC) et diffusion latérale (sideward scatter, SSC) a été utilisée pour discriminer les bactéries du bruit de fond. Les doublets bactériens ont été exclus pour l'évaluation ; les bactéries non-agglomérées représentaient 90% de la population totale. Les résultats enregistrés avec l'Accuri C6 ont été analysés avec le logiciel FlowJo (FlowJo for Windows, version 10.0.06, 2014, Tree Star Inc., Ashland, Oregon, U.S.A.).

Analyse statistique

Les résultats ont été analysés statistiquement avec un test ANOVA et des tests de comparaisons multiples Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTATS

Les résultats de l'exposition continue sont présentés dans la figure 2. L'irradiation des cultures contrôle sans photosensibilisateur (0 μM) n'a eu aucun effet sur la viabilité des biofilms. Quand les biofilms d'*E. faecalis* ont été incubés pendant 40 minutes avec 10 μM d'éosine Y et photo-activés durant 960 secondes, la viabilité bactérienne était diminuée de façon significative ($p < 0.05$) en comparaison avec les spécimens irradiés sans photosensibilisateur (Fig. 2). Seulement 38.1 % ($\pm 7\%$) des bactéries ont survécu après l'activation lumineuse. Quand la concentration d'éosine Y fut augmentée à 20 μM , l'effet antimicrobien après l'exposition à la lumière n'a pas été significativement modifié ($p > 0.05$); approximativement 31% ($\pm 7\%$) des bactéries sont restés vivants. Avec des concentrations de 40 et 80 μM , la viabilité de *E. faecalis* est restée similaire avec respectivement 40 % ($\pm 12\%$) et 61 % ($\pm 15\%$) de bactéries vivantes après irradiation.

Dans le groupe soumis à une exposition répétée (Fig. 3), la viabilité des biofilms exposés à 10 μM d'éosine Y photo-activée a été significativement diminuée en comparaison avec les contrôles irradiés sans photosensibilisateur. La viabilité des bactéries a diminué de 58 % après la première irradiation, à 12 % après la deuxième exposition. Seulement 6.5 % ($\pm 1.7\%$) des bactéries des biofilms d'*E. faecalis* sont restés vivants après une troisième exposition ($p < 0.05$) alors que 3.8 % ($\pm 2.4\%$) de la population bactérienne ont survécu après la quatrième exposition.

Avec la concentration de 20 μM , la viabilité du biofilm a significativement diminué de 74 % ($\pm 6.4\%$) après la première photo-activation à 24 % ($\pm 11\%$) après la deuxième activation. Les biofilms exposés une troisième fois à la combinaison

lumière/photosensibilisateur ont montré une viabilité de 5.3 % (± 2.4 %) qui n'était plus que de 4 % ($\pm 4\%$) après une quatrième et dernière exposition.

Les résultats pour le groupe avec une exposition intermittente sont présentés dans la figure 4. Comme observé pour les groupes précédents, l'irradiation des cultures de contrôle sans photosensibilisateur (0 μM) n'a eu aucun effet sur la viabilité bactérienne. Les biofilms d'*E. faecalis* incubés avec l'éosine Y à 10 μM photo-activée 4 fois pendant 240 secondes, ont montré une forte diminution de viabilité ($p < 0.05$) en comparaison avec les contrôles (irradiation sans le photosensibilisateur). Seulement 24 % (± 4 %) de bactéries sont restés vivants après l'exposition à la lumière. Avec l'augmentation de la concentration de l'éosine Y à 20 μM , l'effet antibactérien a été significativement moins prononcé ($p < 0.05$) que celui observé à une concentration de 10 μM ; approximativement 38 % ($\pm 8\%$) de cellules sont restés vivants après la photo-activation. Aux concentrations de 40 et 80 μM , la viabilité bactérienne est restée comparable avec respectivement 38 % ($\pm 8\%$) et 45 % ($\pm 8\%$) de bactéries vivantes après le traitement.

DISCUSSION

En médecine dentaire, l'intérêt pour la photothérapie antibactérienne (a-PDT) a fortement augmenté et notamment en vue d'éliminer les biofilms bactériens causant les maladies carieuses, endodontiques et parodontales.¹⁹ Très clairement, l'utilisation de la lumière bleue pour la a-PDT est attrayante parce que chaque cabinet dentaire possède un dispositif à haute intensité (500-1000 mW/cm²) délivrant la lumière bleue susceptible d'activer les photosensibilisateurs pour la désinfection de la surface de l'émail, des surfaces radiculaires et de la dentine canalaire. Parce que tous ces tissus sont seulement superficiellement infectés par les biofilms, la pénétration de la lumière à travers le tissu est un problème secondaire comparé avec la pénétration lumineuse nécessaire pour les thérapies oncologiques. Des travaux ont démontré que la lumière bleue peut pénétrer à travers la dentine malgré le fait que l'épaisseur, le diamètre et la densité des tubules dentinaires soient autant de facteurs qui diminuent la transmission lumineuse.²⁰ Aussi, des études pilotes dans notre laboratoire ont montré que l'éosine Y peut facilement diffuser dans la dentine avec des profondeurs de pénétration variant entre 100 et 600 µm (résultats non publiés). En comparaison, la pénétration de l'hypochlorite de sodium à 1 % appliqué pendant 2 minutes sur la dentine, ne dépasse pas les 80 µm.²¹

Dans cette étude, l'activité antibactérienne de l'éosine Y photo-activée par la lumière bleue a été évaluée sur des biofilms bactériens mis en culture sur des disques d'hydroxyapatite plutôt qu'en suspension bactérienne parce que les biofilms sont beaucoup plus résistants aux agents antibactériens. La pertinence des conditions expérimentales a aussi été améliorée en utilisant *E. faecalis* comme micro-organisme

cible car il est très fréquemment isolé dans les canaux radiculaires présentent une infection endodontique persistante et résistante à l'élimination avec les thérapies conventionnelles.²²

En recherche microbiologique, la cytométrie en flux (CMF) associée avec des marqueurs de viabilité est toujours plus utilisée pour un contrôle immédiat de la viabilité bactérienne aux niveaux des unités cellulaires.²³ La cytométrie en flux a été récemment utilisée pour contrôler l'inactivation d'*Escherichia coli* dans la nourriture solide, pour inspecter la qualité de l'eau après la chloration, pour vérifier la vitalité des bactéries probiotiques lactiques en réponse au stress de l'acidité gastrique et des sels biliaires.^{24, 25, 26}

Sans aucun doute, les analyses par CMF donnent des résultats plus rapides et plus rigoureux en comparaison du comptage de CFUs sur géloses. Il faut cependant noter que l'analyse tridimensionnelle de la viabilité bactérienne n'a pas pu être effectuée car les biofilms ont dû être désagregés par ultrasons avant comptage. Cependant, le grand nombre de bactéries analysé par la cytométrie en flux augmente la précision et l'exactitude du comptage ; en accord avec NEBE-VON-CARON *et coll.* 2009, les variations entre les lectures sont inférieures à 1 % dès que plus de 1000 événements sont utilisés dans la mesure de la viabilité.²⁷ Dans cette étude, l'exposition radiale correspondant à l'irradiation intégrée au temps au niveau de la surface des puits de culture a été maintenue constante pour tous les groupes ; les biofilms ont été soit exposés à 4 cycles d'irradiation de 240 secondes soit à une seule exposition de 960 secondes. Une comparaison entre les fortes concentrations (40-80 μM) et les concentrations cumulées appliquées aux biofilms, par exemple quatre expositions à 10 μM ou 20 μM , a été également été possible. Les résultats ont montré que l'éosine Y photo-activée avec la lumière bleue peut être un candidat pour l'inactivation des

biofilms d'*E. faecalis*, en accord avec des publications précédentes.^{17, 28} Néanmoins, ni pour le groupe exposition continue ni pour le groupe intermittent, l'augmentation de la concentration d'éosine Y (40-80 µM) n'a amélioré l'activité antimicrobienne. Selon GOULARD *et coll.* (2010), quand le photosensibilisateur est incubé pendant longtemps à forte concentration, la formation d'agrégats est possible ce qui diminue l'efficacité du traitement.⁷ Aussi, un temps d'irradiation plus long peut accélérer la photodégradation du photosensibilisateur, et ce pour des irradiations de plus de 15 minutes.²⁹ L'effet de photo dégradation semble se produire quand l'oxygène singulet ou d'autres espèces de ROS produits par activation lumineuse réagissent avec le photosensibilisateur lui-même, réduisant ainsi sa disponibilité pour une photosensibilisation successive.³⁰

Il y a aussi des travaux qui démontrent qu'une forte intensité lumineuse peut causer une diminution de la concentration d'oxygène dans le milieu de culture, avec comme conséquence l'affaiblissement de l'effet thérapeutique.³¹ Sans aucun doute, l'exposition répétée a été beaucoup plus efficace pour inactiver les biofilms d'*E. faecalis* en comparaison à l'exposition continue ou intermittente. Une réduction significative de la viabilité bactérienne a été constatée après chaque exposition successive au tandem photosensibilisateur/lumière, excepté la dernière, laquelle n'a ajouté aucun effet thérapeutique significatif ; seulement 2-3% des bactéries ont survécu après le traitement. Aussi, cet effet a été observé pour les deux concentrations d'éosine Y après l'activation par la lumière.

L'exposition répétée des biofilms a sans aucun doute augmenté la quantité de stress oxydatif produit dans les cultures bactériennes. Cette observation est en accord avec les résultats de METCALF *et coll.* (2006) qui ont montré que la a-PDT avec l'erythrosine sur des biofilms de *S. mutans* peut être plus efficace avec des photo-

irradiation répétées.¹¹ Les auteurs ont attribué ces résultats au réapprovisionnement des molécules cibles, comme l'oxygène et le photosensibilisateur pendant les périodes passées dans l'obscurité. Certaines publications montrent que l'éosine Y est une molécule très hydrosoluble à pH physiologique et que ce photosensibilisateur plutôt hydrophile ne s'associe pas facilement aux membranes bactériennes.^{32, 33}

D'autres publications indiquent que, après photo-activation, l'éosine Y est plus apte à produire de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) par transfert d'énergie (mécanisme de type II), que des dérivés réactifs d'oxygène par transfert d'électrons (mécanisme de type I).³⁴ La production d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est supposée être le principal mécanisme impliqué dans la photothérapie antibactérienne. Aussi, la demi-vie de l'oxygène singulet dans les systèmes biologiques est inférieure à 40 ns ce qui réduit son rayon d'action à environ 20 nm.³⁵ L'activité antimicrobienne des photosensibilisateurs produisant de l'oxygène singulet hautement réactif a montré un effet direct sur les molécules extracellulaires du biofilm. Donc, les polysaccharides présents dans la matrice extracellulaire d'un biofilm sont aussi susceptibles d'être photo-endommagés.³⁶ Par conséquent, il semble que les expositions répétées à l'éosine Y photo-activée par la lumière bleue ont progressivement perturbé les biofilms et finalement inactivé tous les pathogènes qui ont été exposés au stress oxydatif.

Bien que les expositions répétées à l'éosine Y photo-activée ont montré une bonne efficacité, d'autres options pour augmenter l'efficacité de l'éosine Y ont été décrites. JOHNSON *et coll.* (2013) ont rapporté que le peptide (KLAKLAK)₂ accroît fortement l'activité photo-dynamique de l'éosine Y, et que complexe éosine-(KLAKLAK)₂ peut photo-inactiver les souches Gram-positives et Gram-négatives de manière comparable.³⁷

ESTEVÃO et al. (2014) ont montré que l'éosine Y et ses dérivés esters en micelles sont des photosensibilisateurs prometteurs pour des applications photo-dynamiques, et ce parce que l'augmentation de l'hydrophobicité du photosensibilisateur favorise une meilleure interaction avec les membranes biologiques.³⁸

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que l'éosine Y activée par la lumière bleue possède des propriétés antibactériennes envers les biofilms d'*E. faecalis* formés sur des disques d'hydroxyapatite. Aussi, une exposition répétée à l'éosine Y photo-activée par la lumière bleue a montré une efficacité significativement augmentée. D'autres travaux semblent nécessaires pour optimiser l'effet antibactérien de l'éosine Y photo-activée par la lumière bleue sur les pathogènes oraux, tout en garantissant l'innocuité de cette procédure sur les tissus humains.

Repeated exposures to blue light-activated EosinY enhance inactivation of *E. faecalis* biofilms, *in vitro*

ABSTRACT

Background

In dentistry, antibacterial photodynamic therapy (a-PDT) has shown promising results for inactivating bacterial biofilms causing carious endodontic and periodontal diseases. In the current study, we assessed the ability of eosin Y exposed to 3 different activation protocols including continuous, repeated and intermittent exposure to blue light, to inactivate *E. faecalis* biofilms, *in vitro*.

Methods

Eosin Y was incubated with *E faecalis* biofilms formed on hydroxyapatite discs, then activated with blue light using different irradiation protocols. Biofilms exposed to continuous exposure were incubated for 40 min before being light-activated for 960 s. For the intermittent exposure, pathogens were exposed to light and photosensitizer then re-incubated for 10 min without renewing the photosensitizer before repeating irradiation (960 s total). For repeated a-PDT, the same overall radiant energy was delivered in a series of 4 irradiation periods separated by dark periods; fresh photosensitizer was added between each light irradiation. After treatment, bacteria were immediately labeled with LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit (Life technologies) and viability was assessed by flow cytometry (FCM). Results were statistically analyzed using one-way ANOVA and Tukey multiple comparison intervals ($\alpha=0.05$).

Results

The viability of *E. faecalis* biofilms, exposed to 10 μ M eosin Y, was significantly reduced compared to controls (light only- eosin Y only). After a second exposure to blue light-activated eosin Y, viability significantly decreased from 58% to 12% whereas 6.5% of the bacterial biofilm remained live after a third exposure ($p < 0.05$). Only 3.5% of the bacterial population survived after the fourth exposure.

Conclusions

The results of the current study indicate that blue light-activated eosin Y can photoinactivate *E. faecalis* biofilms grown on hydroxyapatite discs. Also, repeated exposures to blue light-activated eosin Y were shown to significantly improve efficacy. Further studies seem warranted to optimize the antibacterial activity of blue light-activated eosin Y on major oral pathogens.

Introduction

Endodontic infections are caused by the proliferation of bacteria inside the root canal of teeth that were exposed to the oral environment by carious or traumatic lesion.¹ The elimination of bacteria by means of mechanical instrumentation and endodontic disinfectants is therefore the primary objective of endodontic treatment. Although the use of sodium hypochlorite for disinfecting root canals remains the gold standard, antimicrobial photodynamic therapy (a-PDT) has been reported to be an effective adjunct to eliminate bacterial biofilms that survived after conventional irrigation with sodium hypochlorite.^{2, 3}

Antibacterial Photodynamic therapy (a-PDT) uses a photo-absorbing molecule (called a photosensitizer) and a light source, both respectively absorbing and emitting within the same range of wavelengths. Absorption of the light triggers excitation of the photosensitizer that immediately produces highly reactive singlet oxygen or creates secondary reactive oxygen species (ROS) in presence of oxygen. There is evidence showing that ROS kill bacteria by damaging bacterial cell wall, membrane proteins, and nucleic acids.⁴

Most recent research indicates that dental curing units emitting blue light (400-500 nm) can successfully inactivate several oral pathogens when used in combination with appropriate photosensitizers (Table 1). PAULINO *et al.* (2005) used a dental blue light source to activate a xanthene derivate called rose bengal, and have reported a complete killing of *S. mutans* grown in planktonic suspensions.⁵ The antibacterial properties of Photosan, a commercialized photosensitizer, light-activated with a commercially available dental photopolymerizer emitting blue light

were reported against the Gram-positive *S. mutans* and *E. faecalis* in planktonic cultures.⁶ Other research indicates that *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a Gram-negative pathogen causing periodontal disease, can be inactivated by rose bengal exposed to blue-light irradiation, both in planktonic and biofilm cultures.⁷ PAPASTAMOU et al. (2011) assessed various formulations of ruthenium exposed blue light for inactivating *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* and reported a significant reduction in viability of both pathogens after treatment.⁸ More recently, MANOIL et al. (2014) showed that blue light-activated curcumin can inactivate planktonic and biofilm cultures of *S. mutans* as evidenced by flow cytometry analysis of bacterial viability after treatment.⁹

However, all above mentioned studies failed to demonstrate a complete killing of oral bacterial biofilms exposed to blue light mediated a-PDT. Thus, it is likely that several therapeutic parameters such as photosensitizer dose, photosensitizer-light interval, and light conditions may require optimization to increase efficacy. A study by STREET et al. (2010) has confirmed that the efficacy of a-PDT against three major periodontal pathogens was light dose dependent.¹⁰ Also, there are reports showing that light dose fractionation may add some benefit to treatment. Erythrosine-mediated PDT of *S. mutans* biofilms was previously shown to be enhanced by dose fractionation of light.¹¹ More recently, SUNG et al. (2013) used intermittent and repeated irradiation to inactivate *Mycobacterium tuberculosis* by a-PDT. Their results indicate that intermittent and repeated a-PDT allowed improved inactivation of the bacilli compared to continuous light exposure.¹² In dermatology, light dose fractionation was also shown to lower the rate of photobleaching of the photosensitizer upon light irradiation and was therefore recommended to increase the efficacy of aminolevulinic acid (ALA) photodynamic therapy.¹³

Therefore, in the current study, we assessed the ability of eosin Y exposed to three different irradiation protocols including continuous, repeated and intermittent light exposure to inactivate *E. faecalis* biofilms, *in vitro*. Eosin Y was selected as a photosensitizer because it absorbs blue light (absorption spectrum between 220 nm and 570) and was previously shown to inactivate lactobacilli and *Candida albicans* upon light activation.^{14, 15} Intermittent irradiation consisted in exposing pathogens to light and photosensitizer first, then re-incubating pathogens for a certain period of time before repeating the irradiation. For repeated a-PDT, the same overall radiant energy was delivered in a series of shorter irradiation periods separated by dark periods; fresh photosensitizer was added between each light irradiation. Our hypothesis was that repeated or intermittent irradiations of Eosin Y with blue-light would increase antibacterial activity against *E. faecalis* biofilms.

Materials and Methods

A stock solution (1 mmol/L) of eosin-Y (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) was prepared after dissolving the powdered chemical in 0.9% sodium chloride solution. A spectrophotometer (Cintra 40 UV/VIS, GBC, Dandenong, Australia) was used to confirm the absorbance of the solution in the blue range (380 - 500 nm). The stock solution was further diluted in 0.9% sodium chloride solution to evaluate the antibacterial activity of several concentrations of blue light-activated Eosin Y (10 - 20 - 40 - 80 μ M).

Enterococcus faecalis (*E. faecalis* 135737, culture collection of the University Hospitals of Geneva, CH) was selected for the antibacterial assays because of its prominent role in endodontic infections.¹⁶ Bacteria were cultured from frozen stocks onto Columbia agar plates (Oxoid, Pratteln, CH), then transferred into 6 mL of brain heart infusion liquid medium (BHI) and incubated overnight aerobically at 37° C. A spectrophotometer (Biochrom WPA Biowave II) was used to adjust the bacterial concentration in the culture medium at 600 nm (OD 1: 5×10^9 bacteria).

Hydroxyapatite discs (9.5 mm diameter X 2 mm thickness), acquired from Clarkson Chromatography Products, (Williamsport, PA, USA) were autoclaved at 121° C for 20 min before use. Hydroxyapatite (HA) discs were placed into 24 well culture dishes (TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland) and inoculated with 200 μ L of bacterial suspension. The bacterial suspension was placed on the top of each disc to allow cell attachment during 5 min before adding 1.8 mL of fresh BHI medium to the well. Specimens were incubated for 48 hours at 37°C in aerobic conditions without

changing the culture medium. The culture medium was not renewed to obtain bacterial biofilms in the stationary phase of growth. Previous studies have shown that *E. faecalis* biofilms can develop within 48 hours; the bacterial mode of growth was also shown to influence the response to antibacterial treatment.^{17, 18}

Light source

A quartz tungsten halogen dental light source (Optilux 501, KerrHawe SA, Bioggio, CH) emitting blue light (380-500 nm) was used to activate the photosensitizer. The irradiance of the light source is 450 mW /cm². The light, which is delivered through a light guide of 10.4 mm in diameter, was placed 10 mm above bacterial biofilms to insure a complete irradiation of the culture dish. Each culture dish was irradiated separately.

Antibacterial assays

Different irradiation protocols (4 x 240 sec; 960 sec) were used to compare the effect of a single a-PDT exposure (continuous) versus repeated a-PDT or intermittent exposures on *E. faecalis* biofilm viability.

For the continuous exposure group, HA discs were rinsed twice with 0.9% NaCl to remove loosely attached bacteria and surrounding planktonic cells, then transferred into black polystyrene 24 well culture dishes (Greiner Bio-One, Milian, Switzerland) containing 1 mL of photosensitizer. Black opaque culture dishes were used to avoid light spreading to the next well during light irradiation. The concentrations of eosin Y tested in the continuous exposure group ranged between 40 and 80 µM. The incubation time was set to 40 min and each culture dish was irradiated separately for

960 seconds (Fig. 1). The “dark toxicity” of the photosensitizer was also measured on biofilms that were not exposed to blue light. Light and incubation conditions were selected to match those applied to the bacterial biofilms in the repeated and intermittent exposure groups. Control cultures received no photosensitizer and were either light irradiated for 960 s (light+ conditions) or received no light (light – conditions).

For the repeated exposure group, biofilms on HA discs were transferred to black opaque culture dishes and incubated into 1 mL of photosensitizer (10-20 μ M) for 10 minutes before light activation. Each disk was separately light-activated for 240 seconds, except those used for dark toxicity evaluation (Fig. 1). A set of 8 discs was sent to the FCM analysis to assess the effect of a first cycle of PDT whereas the remaining disks were transferred to new culture wells containing 1 mL of fresh Eosin Y at the same concentrations (10-20 μ M). Discs were again incubated for 10 minutes and irradiated for 240 seconds. After the second irradiation, 8 discs (including dark toxicity specimens) were collected for viability measurements of a two-cycle PDT. The remaining discs were placed into 1 mL of fresh photosensitizer, incubated 10 minutes and irradiated 240 seconds. After irradiation, 8 discs were used for assessing the effectiveness of a three-cycle PDT. A fourth cycle of a-PDT was performed on discs incubated for 10 minutes in fresh eosin Y solution and irradiated 240 seconds before FCM analysis. This experimental set-up allowed us to obtain 4 replicates per condition; the entire experiment was repeated three times.

For the intermittent exposure group, biofilms on HA discs were placed into black polystyrene 24 well culture dishes (Greiner Bio-One, Milian, Switzerland) containing 1 mL of photosensitizer at different concentrations (40 - 80 μ M), and incubated 10

minutes before light activation for 240 seconds (Fig. 1). After irradiation, the discs remained in the same wells for 10 minutes and irradiated again for 240 seconds. After 10 minutes of rest in the dark, the discs were irradiated for 240 seconds. A fourth and last cycle of 10 minutes rest and 240 sec irradiation was then performed. All specimens were collected for assessing bacterial viability. The entire experiment was repeated three times to assess the reproducibility of the assay as applied to the bacterial biofilms.

Quantification of bacterial viability

Bacterial viability was measured immediately after a-PDT treatment, using flow cytometry (FCM). For FCM viability measurement, the HA discs were transferred into 15mL tubes containing 2 mL of NaCl 0.9% solution and vortexed for 2 minutes to allow the detachment of the biofilms. Then, 200 μ L of bacterial suspension was transferred into 1.5 mL tubes, sonicated for 20 s and mixed with 200 μ L of LIVE/DEAD BacLight solution. Two nucleic acid stains (SYTO 9 and propidium iodide) compose the LIVE/DEAD BacLight solution (LIVE/DEAD BacLight viability kit, Life Technologies, Switzerland). SYTO 9 has excitation/emission wavelengths at 485/500 nm and can penetrate all cells. PI only enters membrane-damaged cells, its excitation/emission wavelengths are 535/617 nm. The labeled bacteria were incubated for 15 minutes in the dark before assessing cell viability by flow cytometry. The flow cytometry analysis was performed using a BD Accuri C6 flow cytometer with a 488 nm excitation laser. SYTO9 emission was collected in the FL-1 channel of the cytometer, whereas PI emission was recorded in the FL-3 channel. The spectral overlap was corrected (3% FL1 –FL3) and the run limit set to at 20,000 events. A combination of forward scatter (FSC) and sideward scatter (SSC) was used to

discriminate bacteria from background. Doublets of bacteria were excluded from analysis; singlets corresponded to 90% of the total population. The data recorded with the Accuri C6 were analyzed with FlowJo software (FlowJo for Windows, version 10.0.06, 2014, Tree Star Inc., Ashland, Oregon, U.S.A.) Results were statistically analyzed using one-way ANOVA and Tukey multiple comparison intervals ($\alpha=0.05$).

Results

Results for the continuous exposure group are shown in Fig. 2. Light irradiation of control cultures without photosensitizer (0 μM) had not effect on biofilm viability. When *E. faecalis* biofilms were incubated for 40 min in presence of 10 μM of eosin Y, then light-activated for 960 s, bacterial viability significantly ($p < 0.05$) decreased compared to specimens irradiated without photosensitizer (Fig. 2). Only 38.1 % (± 7 %) of bacteria remained live after light activation. When the concentration of blue light-activated eosin Y was increased to 20 μM , the antibacterial effect was not significantly different ($p > 0.05$); approximately 31% (± 7 %) of cells remained vital after treatment. At concentrations of 40 and 80 μM , bacterial viability remained similar with respectively 40 % (± 12 %) and 61 % (± 15 %) of bacteria alive after treatment.

For the repeated exposure group (Fig. 3), the viability of *E. faecalis* biofilms exposed to 10 μM of blue light-activated Eosin Y was significantly reduced compared to controls (no photosensitizer- light irradiation only). Bacterial viability significantly decreased from 58% after the first irradiation to 12% after a second exposure to light-activated Eosin Y. Only 6.5% (± 1.7 %) of the bacterial biofilm remained vital after a third exposure ($p < 0.05$) whereas 3.8% (± 2.4 %) of the bacterial population survived after the fourth exposure. For the 20 μM concentration, biofilm viability significantly

decreased from 74% (± 6.4 %) after the first light activation to 24% (± 11 %) after the second activation. Biofilms exposed to a third light activation exhibited a viability of 5.3 % (± 2.4 %) that further decreased to 4% (± 4 %) after the fourth and last exposure to light.

Results for the intermittent exposure group are presented in Fig. 4. As reported for the continuous and repeated exposure groups, light irradiation of control cultures without photosensitizer (0 μ M) had not effect on bacterial viability. *E. faecalis* biofilms incubated with 10 μ M of eosin Y that was light-activated 4 times for 240 s, exhibited a significant reduction in viability ($p < 0.05$) compared to controls (light irradiation without photosensitizer). Only 24 % (± 4 %) of bacteria remained alive after light activation. When the concentration of blue light-activated eosin Y was increased to 20 μ M, the antibacterial effect was significantly less ($p < 0.05$) than observed for the 10 μ M concentration; approximately 38% (± 8 %) of cells remained alive after light-activation. At concentrations of 40 and 80 μ M, bacterial viability remained similar with respectively 38 % (± 8 %) and 45 % (± 8 %) of bacteria live after treatment.

Discussion

In dentistry, a-PDT has recently gained interest for eliminating bacterial biofilms causing carious, endodontic and periodontal diseases.¹⁹ Obviously, the use of blue light for a-PDT is attractive because all dental offices possess high-intensity (500-1000 mW/cm²) devices which can activate photosensitizers for superficial disinfection of enamel surfaces, root surfaces or root canal dentin. Because all above tissue are only superficially infected by biofilms, light penetration through tissue is less of a problem compared with light penetration required for cancer therapy. There is evidence showing that blue light can penetrate across dentin inspite of thickness, diameter and density of dentinal tubules all affecting the light transmission properties of dentin.²⁰ Also, pilot experiments in our laboratory have shown that eosin Y can rapidly diffuse through dentin with penetration depths ranging between 100 and 600 μm (unpublished data). For comparison, the penetration of 1% sodium hypochlorite applied for 2 minutes on root dentin does not exceed 80 μm .²¹

In this study, the antibacterial activity of blue light-activated Eosin Y was assessed on bacterial biofilms grown on hydroxyapatite discs rather than planktonic suspensions because bacterial biofilms are much more resistant to antimicrobial treatments. The relevance to clinical conditions was further improved by using *E. faecalis* as a target microorganism because this pathogen is frequently retrieved from root canals with persistent endodontic infection and resists elimination with conventional antimicrobial agents.²²

In microbiological research, Flow cytometry (FCM) coupled with viability markers is increasingly used to immediately control bacterial viability at a single cell level.²³ Flow cytometry was recently used to monitor the inactivation of *Escherichia coli* on solid food, to control water quality after chlorination, to verify the vitality of probiotic lactic acid bacteria exposed to gastric acid and bile salts.^{24, 25, 26}

Undoubtedly, FCM analysis gives more rapid and accurate results than CFU counts on agar gel, inspite of 3D analysis of bacterial viability was not possible since biofilms had to be disaggregated by ultrasonic treatment before counting. However, the large number of bacteria analyzed by flow cytometry increases counting precision and accuracy; according to NEBE-VON-CARON *et al.* 2009, variation between readings is less than 1% when more than 1000 events are used for viability measurements.²⁷

In this study, radiant exposure that corresponds to the time-integrated irradiance at the surface of the culture wells was kept equivalent for all groups; biofilms were either exposed to 4 irradiation cycles of 240 s or to a single exposure of 960 s. Also, a comparison between the higher concentrations tested (40-80 μ M) and cumulative concentrations applied to biofilms e.g four times 10 μ M or 20 μ M was made possible.

Results have indicated that blue light-activated eosin Y may be a candidate for inactivating *E. faecalis* biofilms. This is in agreement with previously published papers on *E. faecalis* inactivation by a-PDT.²⁸ However, for both the continuous and intermittent groups, increasing concentrations of Eosin Y did not improve antibacterial activity as observed for the 40- 80 μ M concentrations. As reported by GOULARD *et al.* (2010), when high concentrations of photosensitizers are incubated for longer periods of time, they can form aggregates, thereby decreasing treatment efficiency.⁷

Also, a longer irradiation time may have accelerated photobleaching of the photosensitizer, which was shown to occur with irradiation times longer than 15 min²⁹ Photobleaching is likely to happen when singlet oxygen or other ROS produced upon illumination reacts with the photosensitizer itself thereby reducing its availability for further photosensitization.³⁰

There is also evidence showing that high radiant exposures may cause oxygen depletion in the culture medium which consequently weakens the therapeutic effect.³¹

Undoubtedly, repeated exposures were more effective at inactivating *E. faecalis* biofilms than continuous or intermittent exposures. A significant reduction in bacterial viability was reported after each successive exposure to the photosensitizer/light combination except for the last exposure, which did not add any significant effect; only 2-3 % of bacteria survived after treatment. Also, this effect was observed for both concentrations of eosin Y after light-activation.

Repeating exposure of biofilms to a-PDT has undoubtedly increased the amount of oxidative stress produced in bacterial cultures. This is in agreement with METCALF *et al.* (2006) who showed that erythrosine-mediated PDT of *S. mutans* biofilms can be enhanced by repeating light irradiation.¹¹ The authors have attributed this result to the replenishment of target molecules such as oxygen for the photosensitizer during the dark periods. There are reports showing that eosin Y is a highly soluble dye in water at physiological pH and that this rather hydrophilic photosensitizer does not significantly associate with membranes on its own.^{32, 33} Other reports indicate that, upon light-irradiation, eosin Y is more likely to produce singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) by energy transfer (type II mechanism), than reactive oxygen species produced by

electron transfer (type I mechanism).³⁴ Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) production is assumed to be the main mechanism involved in a PDT. Also, the half-life of singlet oxygen in biological systems is < 40 ns, and therefore the radius of the action of singlet oxygen is of the order of 20 nm.³⁵ Also, the antimicrobial activity of photosensitizers mediated by highly reactive singlet oxygen was shown to have a direct effect on extracellular molecules. Thus, the polysaccharides present in the extra polymeric matrix of a bacterial biofilm are also susceptible to photo-damage.³⁶ Therefore, it is likely that repeating exposures to blue light-activates eosin Y has progressively disrupted the biofilm and ultimately killed all pathogens exposed to oxidative stresses.

Although repeating exposures to blue light-activates eosin Y was shown to be successful, other options to increase the efficiency of eosin Y have been recently described. Johnson *et al.* 2013 reported that the peptide (KLAKLAK)₂ greatly enhances the photodynamic activity of eosin Y, and that eosin-(KLAKLAK)₂ can photoinactivate Gram-positive and Gram-negative strains to a similar extent.³⁷

ESTEVIÃO *et al.* 2014 have shown that eosin Y and its ester derivatives in micelles are promising photosensitizer for photodynamic applications because increasing hydrophobicity of the photosensitizer promotes a higher interaction with biological membranes.³⁸

Conclusion

The results of the current study indicate that blue light-activated eosin Y can photoinactivate *E. faecalis* biofilms grown on hydroxyapatite discs. Also, repeated exposures to blue light-activated eosin Y were shown to significantly improve efficacy. Further studies seem warranted to optimize the antibacterial activity of blue light-activated eosin Y on major oral pathogens, while preserving the biocompatibility of this procedure regarding on human tissues.

Acknowledgments

This study was supported by Grant #31003A-149962 of the Swiss National Science foundation and by the Swiss Society for Endodontology. Manufacturers of the light sources used in this study (KerrHawe SA, Bioggio, Switzerland) are acknowledged for their support.

Wavelength (nm)	Photosensitizer	Bacterial species/strains	Authors and journal
480	Rose Bengal	<i>Ag. actinomycetemcomitans</i>	Goulart R <i>et al.</i> , PhotoMed Laser Surg 2010 ⁷
400-500	Rose Bengal	<i>S. mutans</i>	Bolean M <i>et al.</i> , Photomed Laser Surg 2010 ³⁹
425-470	Rose Bengal	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Chui C <i>et al.</i> , J Periodontal Res. 2013 ⁴⁰
532	Rose Bengal	<i>S. mutans</i>	Ishiyama K <i>et al.</i> , PLoS One. 2012 ⁴¹
460	Rose Bengal	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	Rossoni RD <i>et al.</i> , Laser Med Sci 2010 ⁴²
	Photosan	<i>Ag. actinomycetemcomitans</i>	
480	Photosan	<i>S. mutans</i> , <i>E. Faecalis</i>	Maisch <i>et al.</i> , J Applied Microbiol 2009 ⁴³
450–485	RD3	<i>F. nucleatum</i> & <i>P. gingivalis</i>	Papastamou V <i>et al.</i> , Arch Oral Biol 2011 ⁸
480	Riboflavin	<i>S. aureus</i> & <i>P. aeruginosa</i>	Thakuri PS <i>et al.</i> , Nepal Med Coll J. 2011 ⁴⁴
480	Erythrosin	<i>Streptococcus mutans</i>	Lee YH <i>et al.</i> , Int J Oral Sci 2013 ⁴⁵
480	T4 porphirine	<i>S. aureus</i> (MRSA)	Dosselli R <i>et al.</i> , J Proteomics 2012 ⁴⁶
450	Curcumin	<i>S. mutans</i> & <i>L. acidophilus</i>	Araujo NC <i>et al.</i> , Photomed Laser Surg. 2012 ⁴⁷
470	Curcumin	<i>E. coli</i> & <i>E. Faecalis</i>	Hegge AB <i>et al.</i> , J Pharm Sci 2012 ⁴⁸
570	Eosin Erythrosine Rose bengal	<i>S. mutans</i>	Rolim JP <i>et al.</i> , J Photochem Photobiol B 2012 ⁴⁹
450–600	Rose Bengal	<i>Candida albicans</i>	Costa AC <i>et al.</i> , Mycoses 2012 ⁵⁰
440-460	Curcumin	<i>Candida albicans</i>	Dovigo LN <i>et al.</i> , Photochem Photobiol 2011 ⁵¹

Table 1 : List of recent publications on a-PDT mediated by blue-light

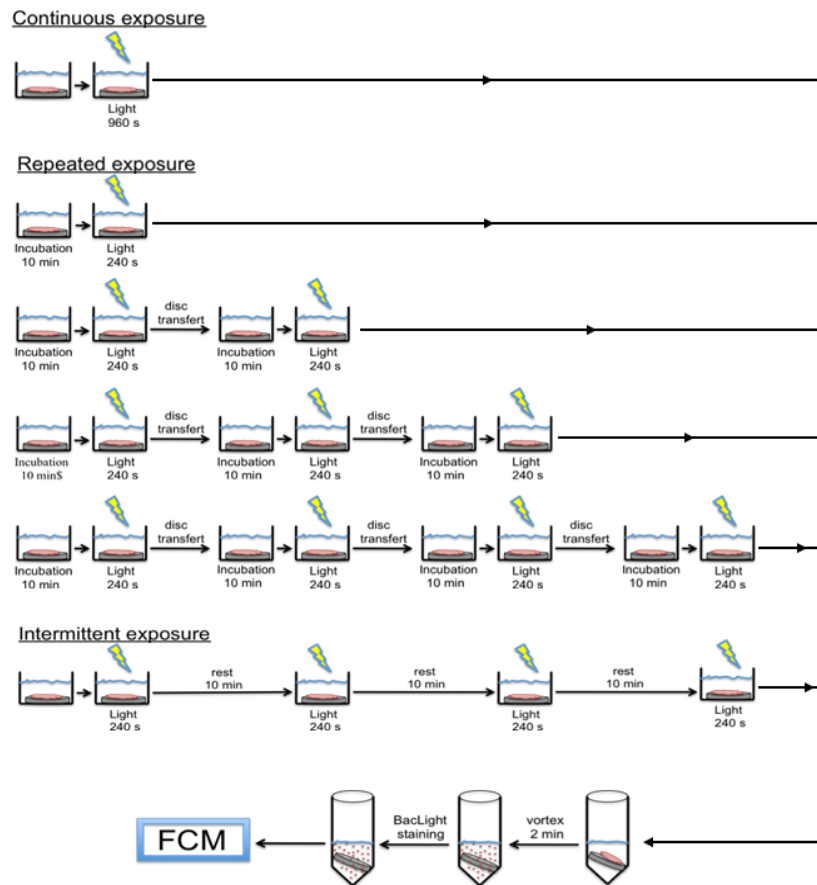


Fig.1 : Experimental set-up used in this study. For the continuous exposure group, biofilms were incubated for 40 min in presence of eosin Y, irradiated with blue light for 960 s before assessing viability by flow cytometry.

For the repeated exposure group, biofilms were incubated for 10 min with eosin Y, then light-activated for 240 s. This procedure was repeated four times and antibacterial activity has been assessed after each incubation/irradiation cycle.

For the intermittent exposure group, light activation for 240 s was repeated four times without renewing the photosensitizer; bacterial viability was then assessed by FCM

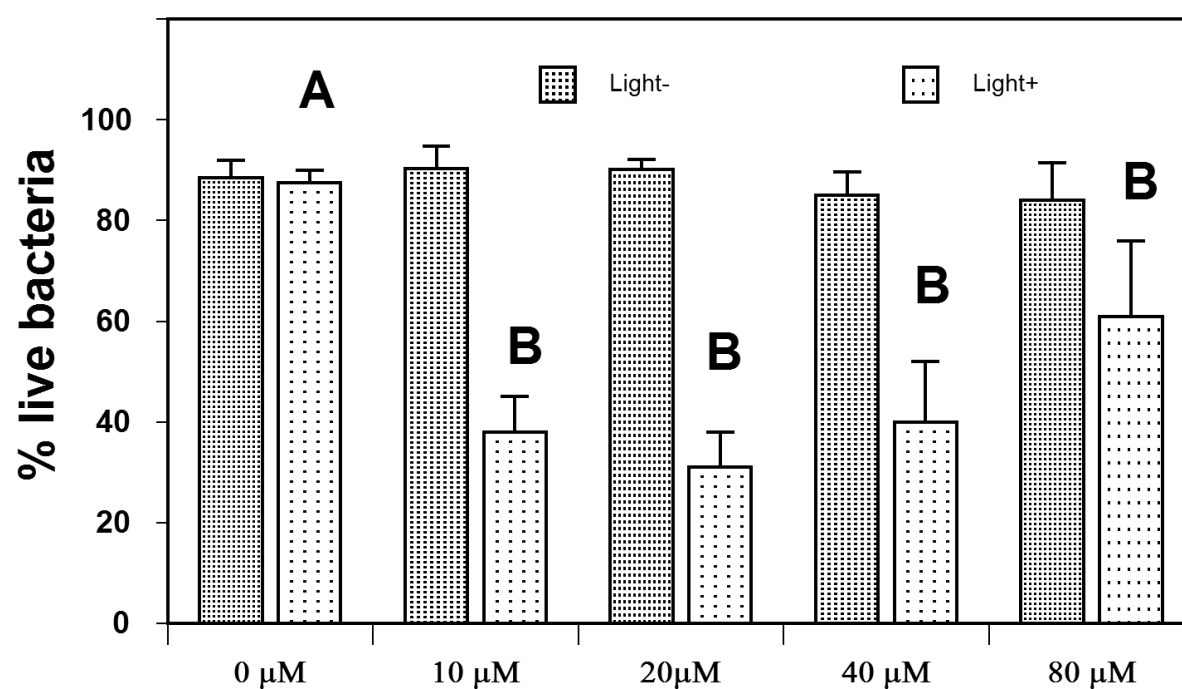


Fig 2 : Continuous exposure group. *E. faecalis* biofilms were either incubated for 40 min in presence of 10, 20, 40 or 80 µM of eosin that was light-activated for 960 s. Letters indicate statistical differences ($\alpha = 0.05$) between light + conditions.

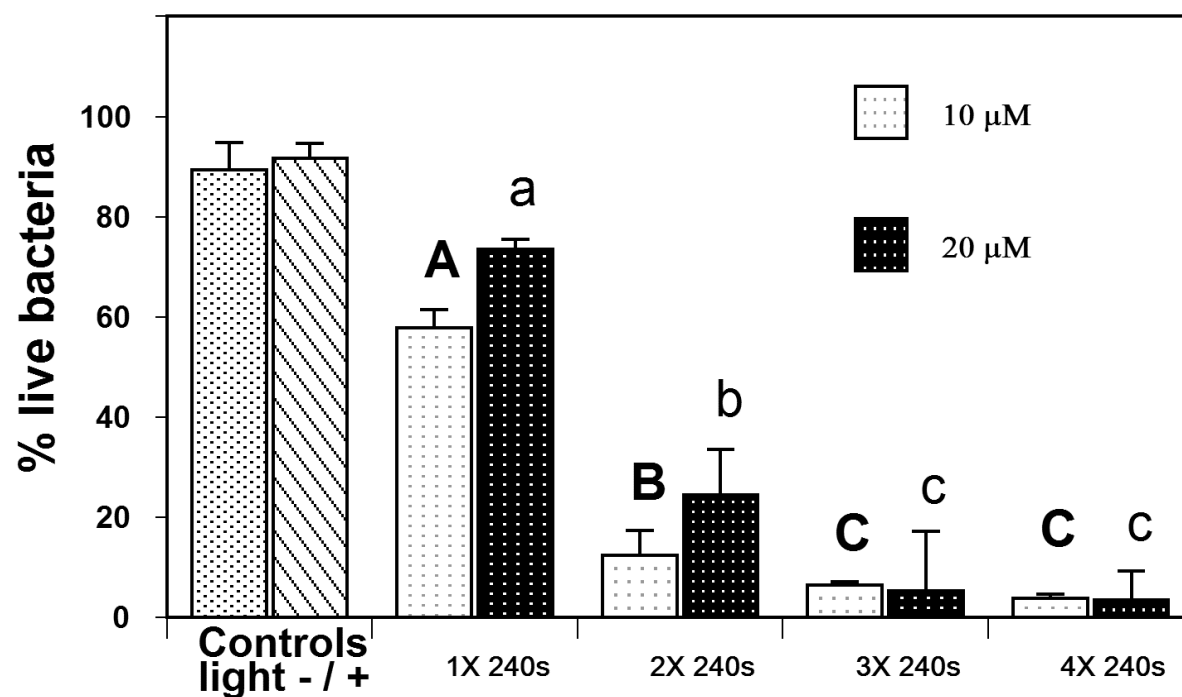


Fig 3 : Repeated exposure group. *E. faecalis* biofilms were incubated for 10 min in presence of 10 or 20 μM of eosin Y that was light-activated for 240 s. The same light photosensitizer conditions were repeated 4 times and biofilm viability was measured after each successive a-PDT treatment. Letters indicate statistical differences ($\alpha = 0.05$) between light + conditions. (superscript: 10 μM , underscript 20 μM)

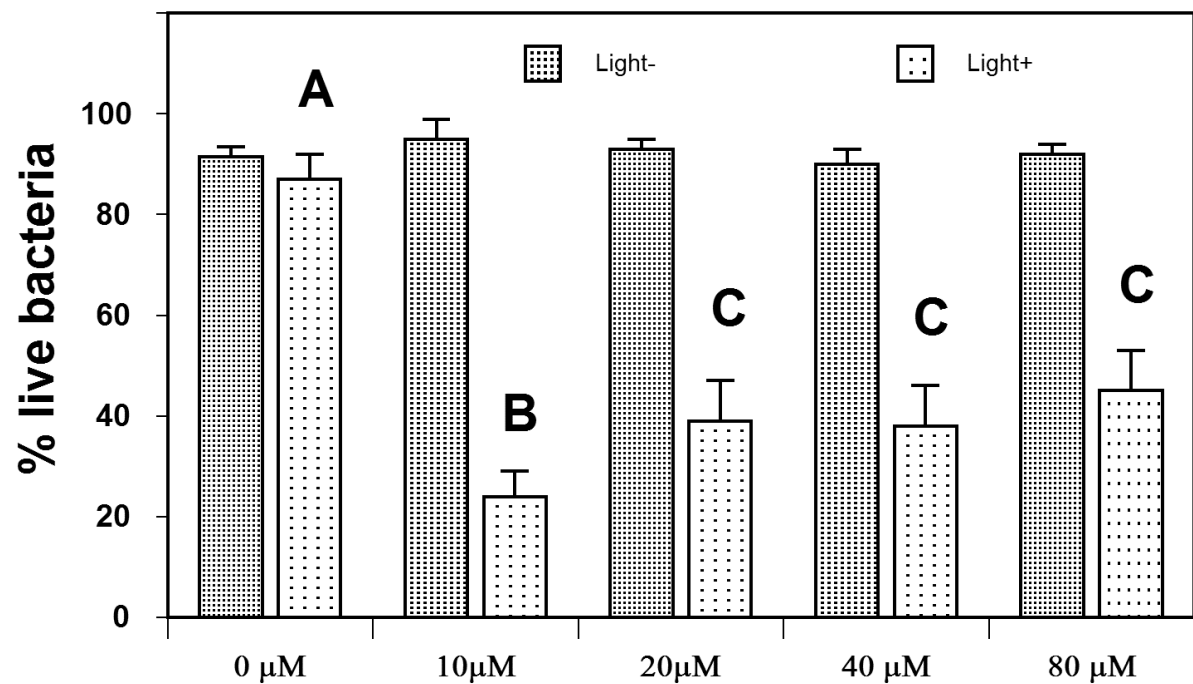


Fig 4 : Intermittent exposure group. *E. faecalis* biofilms were incubated in presence of 10, 20, 40 or 80 µM of eosin that was irradiated 4 times (4X240 s) with dark periods of 10 min between irradiations resulting in a total incubation duration of 40 min. Letters indicate statistical differences ($\alpha = 0.05$) between light + conditions

References

- ¹ KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ.
The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965; 20:340-9.
- ² JAVED F, ROMANOS GE.
Does photodynamic therapy enhance standard antibacterial therapy in dentistry?
Photomed Laser Surg. 2013;31:512-8.
- ³ GARCEZ AS, NUNEZ SC, HAMBLIN MR, SUZUKI H, RIBEIRO MS.
Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report.
J Endod. 2010; 36:1463–6
- ⁴ KOMINE C, TSUJIMOTO Y.
A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*.
J Endod. 2013; 39: 411-4.
- ⁵ PAULINO TP, RIBEIRO KF, THEDEI G JR, TEDESCO AC, CIANCAGLINI P.
Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*.
Arch Oral Biol. 2005; 50: 353-359.
- ⁶ MAISCH T, WAGNER J, PAPASTAMOU V, NERL HJ, HILLER KA, SZEIMIES RM, SCHMALZ G.
Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro.
J Appl Microbiol. 2009;107:1569-78.

-
- ⁷ GOULART R DE C, BOLEAN M, PAULINO TDE P, THEDEI G JR, SOUZA SL, TEDESCO AC, CIANCAGLINI P.
Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
Photomed Laser Surg. 2010; 28 Suppl 1: S53-60.
- ⁸ PAPASTAMOU V, NIETZSCH T, STAUDTE H, ORELLANA G, SIGUSCH BW.
Photoinactivation of *F. nucleatum* and *P. gingivalis* using the ruthenium-based RD3 sensitizer and a conventional halogen lamp.
Arch Oral Biol. 2011; 56:264-8.
- ⁹ MANOIL D, FILIERI A, GAMEIRO C, LANGE N, SCHRENZEL J, WATAHA JC, BOUILLAGUET S.
Flow cytometric assessment of Streptococcus mutans viability after exposure to blue light-activated curcumin.
Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014;11:372-9
- ¹⁰ STREET CN, PEDIGO LA, LOEBEL NG.
Energy dose parameters affect antimicrobial photodynamic therapy-mediated eradication of periopathogenic biofilm and planktonic cultures.
Photomed Laser Surg. 2010;28 Suppl 1:S61-6.
- ¹¹ METCALF D, ROBINSON C, DEVINE D, WOOD S.
Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of Streptococcus mutans biofilms by light fractionation.
J Antimicrob Chemother. 2006;58:190-2.
- ¹² SUNG N, BACK S, JUNG J, KIM KH, KIM JK, LEE JH, RA Y, YANG HC, LIM C, CHO S, KIM K, JHEON S.
Inactivation of multidrug resistant (MDR)- and extensively drug resistant (XDR)-Mycobacterium tuberculosis by photodynamic therapy.

Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013;10:694-702.

- ¹³ MIDDELBURG TA, DE BRUIJN HS, VAN DER PLOEG-VAN DEN HEUVEL A, NEUMANN HA, ROBINSON DJ.
The effect of light fractionation with a 2-h dark interval on the efficacy of topical hexyl-aminolevulinate photodynamic therapy in normal mouse skin.
Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013;10:703-9.
- ¹⁴ BULIT F, GRAD I, MANOIL D, SIMON S, WATAHA JC, FILIERI A, FEKI A, SCHRENZEL J, LANGE N, BOUILLAGUET S.
Antimicrobial activity and cytotoxicity of 3 photosensitizers activated with blue light.
J Endod. 2014;40:427-31.
- ¹⁵ FREIRE F, COSTA AC, PEREIRA CA, BELTRAME JUNIOR M, JUNQUEIRA JC, JORGE AO.
Comparison of the effect of rose bengal- and eosin Y-mediated photodynamic inactivation on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*.
Lasers Med Sci. 2014;29: 949-55.
- ¹⁶ PORTENIER I, WALTIMO TMT, HAAPASALO M.
Enterococcus faecalis – the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. Endod Topics. 2003; 6: 135–159.
- ¹⁷ PILEGGI G, WATAHA JC, GIRARD M, GRAD I, SCHRENZEL J, LANGE N, BOUILLAGUET S.
Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro.
Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013;10:134-40.
- ¹⁸ UPADYA MH, KISHEN A.
Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection.

-
- Int Endod J. 2010; 43:978-87.
- 19 CIEPLIK F, TABENSKI L, BUCHALLA W, MAISCH T.
Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens.
Front Microbiol. 2014; 5:405.
- 20 ZIJP JR, TEN BOSCH JJ.
Theoretical model for scattering of light by dentin and comparison with measurement.
Applied Optics. 1993; 32:411–5.
- 21 ZOU L, SHEN Y, LI W, HAAPASALO M.
Penetration of sodium hypochlorite into dentin.
J Endod. 2010; 36:793-6.
- 22 DAHLÉN G, SAMUELSSON W, MOLANDER A, REIT C.
Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal.
Oral Microbiol Immunol. 2000; 15:309-12.
- 23 HEWITT CJ, NEBE-VON-CARON G.
The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state.
Adv Biochem Eng Biotechnol. 2004;89:197-223. Review.
- 24 TAMBURINI S, FOLADORI P, FERRENTINO G, SPILIMBERGO S, JOUSSON O.
Accurate flow cytometric monitoring of *Escherichia coli* subpopulations on solid food treated with high pressure carbon dioxide.
J Appl Microbiol. 2014;117:440-50.

-
- 25 NESCIERECKA A, RUBULIS J, VITAL M, JUHNA T, HAMMES F.
Biological instability in a chlorinated drinking water distribution network.
PLoS One. 2014;9:e96354.
- 26 CHEN S, CAO Y, FERGUSON LR, SHU Q, GARG S.
Flow cytometric assessment of the protectants for enhanced in vitro survival of
probiotic lactic acid bacteria through simulated human gastro-intestinal
stresses.
Appl Microbiol Biotechnol. 2012 ;95:345-56.
- 27 NEBE-VON-CARON G.
Standardization in microbial cytometry.
Cytometry A. 2009; 75:86-9.
- 28 SILVA TC, PEREIRA AF, BUZALAF MA, MACHADO MA, CRIELAARD W,
DENG DM.
Diverse outcomes of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on five
Enterococcus faecalis strains.
Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014;11:283-9.
- 29 WOOD SR, METCALF DM, DEVINE D ET AL.
Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral
plaque biofilms.
J Antimicrob Chemother. 2006; 57: 680–4.
- 30 CASTANO AP, DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR.
Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers,
photochemistry and cellular localization.
Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1:279-93.

-
- 31 VEENHUIZEN RB, STEWART FA.
The importance of fluence rate in photodynamic therapy: is there a parallel with ionizing radiation dose-rate effects?
Radiotherapy and Oncology. 1995; 37:131-5.
- 32 VALENZENO DP, POOLER J P.
Cell membrane photomodification: relative effectiveness of halogenated fluoresceins for photohemolysis.
Photochem. Photobiol. 1982; 35, 343–50.
- 33 JOHNSON GA, ELLIS EA, KIM H, MUTHUKRISHNAN N, SNAVELY T, PELLOIS JP.
Photoinduced membrane damage of *E. coli* and *S. aureus* by the photosensitizer-antimicrobial peptide conjugate eosin-(KLAKLAK)₂.
PLoS One. 2014;9:e91220.
- 34 WILKINSON F, HELMAN WP AND ROSS AB.
Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution.
J Phys Chem Ref Data 1993; 22; 113–262.
- 35 MOAN J, BERG K.
The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen.
Photochem Photobiol. 1991; 53:549—53.
- 36 KONOPKA K, GOSLINSKI T.
Photodynamic therapy in dentistry.
J Dent Res. 2007; 86:694-707.

-
- 37 JOHNSON GA, MUTHUKRISHNAN N, PELLOIS JP.
Photoinactivation of Gram positive and Gram negative bacteria with the antimicrobial peptide (KLAKLAK)(2) conjugated to the hydrophilic photosensitizer eosin Y.
Bioconjug Chem. 2013;24:114-23.
- 38 ESTEVÃO BM, PELLOSI DS, DE FREITAS CF, VANZIN D, FRANCISCATO DS, CAETANO W, HIOKA N.
Interaction of eosin and its ester derivatives with aqueous biomimetic micelles: Evaluation of photodynamic potentialities.
Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 2014: 287; 30–39
- 39 BOLEAN M, PAULINO TDE P, THEDEI G JR, CIANCAGLINI P.
Photodynamic therapy with rose bengal induces GroEL expression in *Streptococcus mutans*.
Photomed Laser Surg. 2010;28 Suppl 1:S79-84.
- 40 CHUI C, AOKI A, TAKEUCHI Y, SASAKI Y, HIRATSUKA K, ABIKO Y, IZUMI Y.
Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*.
J Periodontal Res. 2013 Feb 27. doi: 10.1111/jre.12055. [Epub ahead of print]
- 41 ISHIYAMA K, NAKAMURA K, IKAI H, KANNO T, KOHNO M, SASAKI K, NIWANO Y.
Bactericidal action of photogenerated singlet oxygen from photosensitizers used in plaque disclosing agents.
PLoS One. 2012;7(5):e37871.
- 42 ROSSONI RD, JUNQUEIRA JC, SANTOS EL, COSTA AC, JORGE AO.
Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae.

- 43 MAISCH T, WAGNER J, PAPASTAMOU V ET AL.
Combination of 10% EDTA, Photosan™, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro.
J Appl Microbiol 2009;107:1569—78.
- 44 THAKURI PS, JOSHI R, BASNET S, PANDEY S, TAUJALE SD, MISHRA N.
Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in-vitro.
Nepal Med Coll J. 2011;13:281-4.
- 45 LEE YH, PARK HW, LEE JH, SEO HW, LEE SY.
The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit.
Int J Oral Sci. 2013 Jan;4(4):196-201.
- 46 DOSSELLI R, MILLIONI R, PURICELLI L, TESSARI P, ARRIGONI G, FRANCHIN C, SEGALLA A, TEARDO E, REDDI E.
Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach.
J Proteomics. 2012; 21:329-43.
- 47 ARAÚJO NC, FONTANA CR, BAGNATO VS, GERBI ME.
Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens.
Photomed Laser Surg. 2012;30:393-9.
- 48 HEGGE AB, NIELSEN TT, LARSEN KL, BRUZELL E, TØNNESEN HH.
Impact of curcumin supersaturation in antibacterial photodynamic therapy--effect of cyclodextrin type and amount: studies on curcumin and curcuminoides XLV.
J Pharm Sci. 2012;101:1524-37

-
- 49 ROLIM JP, DE-MELO MA, GUEDES SF, ALBUQUERQUE-FILHO FB, DE SOUZA JR, NOGUEIRA NA, ZANIN IC, RODRIGUES LK.
The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers.
J Photochem Photobiol B. 2012 5;106:40-6.
- 50 COSTA AC, RASTEIRO VM, PEREIRA CA, ROSSONI RD, JUNQUEIRA JC, JORGE AO.
The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. Mycoses. 2012;55:56-63.
- 51 DOVIGO LN, PAVARINA AC, RIBEIRO AP, BRUNETTI IL, COSTA CA, JACOMASSI DP, BAGNATO VS, KURACHI C.
Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*.
Photochem Photobiol. 2011;87:895-903.