



Université de Montréal  
Département de Chimie, Faculté des Arts et des Sciences

*Cette thèse intitulée*

**Évaluation des propriétés biologiques de sels de  
biguanidium : perturbation membranaire et applications  
dans le traitement du cancer du pancréas**

*Présentée par Audrey Hébert*

*en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D) en Chimie, a été évaluée par un  
jury composé des personnes suivantes :*

**Joelle Pelletier**

Présidente

**Andreea R. Schmitzer**

Directeur de recherche

**Michel Lafleur**

Membre du jury

**Michael Pollack**

Examineur externe

28 Août 2019

© Audrey Hébert, 2019

## Résumé

La metformine, un médicament couramment utilisé pour le traitement du diabète de type II, fut récemment identifiée comme un composé ayant des propriétés anticancéreuses très intéressantes, notamment pour le cancer du pancréas. Toutefois, malgré les nombreuses expériences *in vitro* et sur des modèles murins qui ont confirmé cet effet, les essais cliniques sur les humains sont restés infructueux. Un des facteurs mis en cause pour expliquer ces résultats est la grande hydrophilie de la metformine, qui diminue sa biodisponibilité et limite son transport au travers des membranes cellulaires. Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de sels de biguanidium amphiphiles inspirés de la metformine qui se partitionnent plus facilement dans les bicouches phospholipidiques et qui possèdent de meilleures activités anticancéreuses.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord étudié la perturbation des membranes par de simples alkylbiguanidium. Nous avons démontré que ces composés peuvent transporter des ions  $H^+/OH^-$  et dépolariiser les membranes bactériennes, ce qui leur confère des propriétés antibactériennes et antifongiques. Afin de limiter l'hémolyse associée à ces composés, des sels de biguanidium substitués par le groupement phényléthynylbenzyle ont par la suite été synthétisés. La structure de ceux-ci leur permet de mieux se partitionner dans les membranes et s'accumuler dans les mitochondries, tout en diminuant la toxicité associée à une perturbation membranaire trop forte. Leur activité sur les cellules cancéreuses du pancréas est ainsi beaucoup plus importante que celle de la metformine, de même que leur capacité à inhiber la croissance de xénogreffes chez les souris. Ces résultats nous ont ensuite amené vers la synthèse d'une petite librairie de sels de biguanidium et l'étude de leurs activités anticancéreuses et antibactériennes. Les modifications structurales et les changements de contre-ion apportés à cette librairie ont permis d'obtenir des composés encore plus efficaces et surtout beaucoup plus sélectifs envers les cellules saines, ouvrant ainsi la porte à une nouvelle classe de médicaments anticancéreux à base de sels de biguanidium.

**Mots-clés :** sels de biguanidium, perturbation membranaire, anticancéreux, antibactérien  
cancer du pancréas, membrane cellulaire, metformine

## Abstract

Metformin, a common drug used for the treatment of type II diabetes, has recently been linked to interesting anticancer properties, notably on pancreatic cancer. Although there have been many experiments *in vitro* and on murine models that have confirmed this effect, human clinical trials featuring metformin have been unsuccessful. One of the reasons brought forward to explain these results is the high hydrophilicity of metformin, which limits its bioavailability and transport through cellular membranes. For this reason, we have been interested in the synthesis of amphiphilic biguanidium salts inspired from metformin that can partition more easily in phospholipid membranes and thus have better anticancer properties.

We first studied the membrane perturbation properties of simple alkylbiguanidium salts and showed that these compounds can transport  $H^+/OH^-$  ions and depolarize bacterial membranes, which in turn gives them antibacterial and antifungal properties. To limit the hemolytic activity associated with these compounds, biguanidium salts substituted by the phenylethynylbenzyl moiety were then synthesised. Their structure allows them to partition more easily in membranes and accumulate in mitochondria, while lowering the toxicity associated with high membrane perturbation. For those reasons, their activity on pancreatic cancer cells is much higher than metformin, as is their inhibition of xenograft growth in mice. These results encouraged us to synthesise a small library of biguanidium salts and study their anticancer activity. The structural modifications and counter-anion variations brought to this library have improved the efficiency of these compounds as well as their selectivity towards healthy cells, thus opening the door to a new class of anticancer drugs based on biguanidium salts.

**Keywords:** biguanidium salt, membrane perturbation, anticancer, antibacterial, pancreatic cancer, cellular membrane, metformin

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xx
<b>Chapitre 1 : Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
1.1 Les biguanides.....	1
1.1.1 Utilisations diverses des biguanides.....	1
1.1.2 Propriétés et synthèses des biguanides.....	4
1.2 La metformine et le cancer.....	7
1.2.1 Facteur de risque associé au diabète.....	7
1.2.2 Activité anticancéreuse de la metformine.....	9
1.2.3 Mécanismes d'action de la metformine.....	11
1.2.3.1 Mécanisme direct par activation de l'AMPK.....	11
1.2.3.2 Mécanisme indirect par la diminution de I/IGF.....	13
1.2.3.3 Mécanismes indépendants.....	13
1.2.4 Essais cliniques et limites de la metformine.....	14
1.3 Amélioration de la biodisponibilité de la metformine.....	17
1.3.1 Méthodes de vectorisation.....	17
1.3.2 Nouvelles molécules inspirées de la metformine.....	19
1.3.3 Inspiration des transporteurs transmembranaires synthétiques.....	22
1.4 Les membranes biologiques.....	25
1.4.1 Utilités et fonctions des membranes.....	25
1.4.2 Différents types de membranes.....	27
1.4.2.1 Les liposomes.....	27
1.4.2.2 Les bactéries.....	28
1.4.2.3 Les levures.....	29

1.4.2.4 Les globules rouges.....	30
1.4.2.5 Les cellules cancéreuses .....	30
1.4.2.6 Les mitochondries.....	31
1.5 Description du projet de recherche .....	33
1.5.1 Perméabilisation et perturbation membranaire induite par des sels d'alkylbiguanidium.....	34
1.5.2 Biguanides substitués par le groupement phényléthynylbenzyle capables d'inhiber la croissance de tumeurs du cancer du pancréas.....	34
1.5.3 Propriétés antibactériennes et anticancéreuses de nouveaux sels de biguanidium..	35
1.6 Références.....	36
<b>Chapitre 2 : Perméabilisation et perturbation membranaire induite par des sels d'alkylbiguanidium.....</b>	<b>43</b>
2.1 Préface.....	43
2.2 Concepts et méthodes utilisées .....	44
2.2.1 Transport d'ions .....	44
2.2.2 Dépolarisation des membranes .....	45
2.2.3 Perméabilisation de la membrane bactérienne.....	46
<b>Article 1: Membrane Permeabilization and Perturbation Induced by Alkylbiguanidium Salts .....</b>	<b>47</b>
2.3 Abstract.....	48
2.4 Introduction.....	48
2.5 Material and methods.....	50
2.5.1 General.....	50
2.5.2 General procedure for the synthesis of alkylbiguanidium salts. ....	51
2.5.3 Dynamic light scattering.....	54
2.5.4 Lucigenin assay.....	54
2.5.5 HPTS assay .....	55
2.5.6 Safranin-O assay .....	56
2.5.7 Bacterial membrane depolarization .....	56
2.5.8 Bacterial growth and MIC determination .....	57
2.5.9 Yeast growth and MIC determination.....	57

2.5.10 Hemolytic activity.....	58
2.6 Results and discussion .....	58
2.6.1 Synthesis .....	58
2.6.2 Integrity of the phospholipid bilayer.....	59
2.6.3 Ion transport.....	61
2.6.4 Depolarization of an artificial phospholipid membrane. ....	65
2.6.5 Permeabilization of bacterial membranes.....	67
2.6.6 Depolarization of bacterial membranes .....	69
2.6.7 Antimicrobial activity .....	70
2.6.8 Hemolytic activity.....	72
2.7 Conclusions.....	74
2.8 Acknowledgements.....	74
2.9 References.....	75
<b>Chapitre 3 : Biguanides substitués par le groupement phényléthynylbenzyle capables d’inhiber la croissance de tumeurs du cancer du pancréas .....</b>	<b>77</b>
3.1 Préface.....	77
3.2 Concepts et méthodes utilisées .....	78
3.2.1 Pénétration de la membrane cellulaire.....	78
3.2.2 Évaluation des propriétés biologiques .....	79
<b>Article 2: Phenylethynylbenzyl -Modified Biguanides Inhibit Pancreatic Cancer Tumor Growth .....</b>	<b>82</b>
3.3 Abstract.....	83
3.4 Introduction.....	83
3.5 Results and Discussion .....	84
3.5.1 Synthesis .....	88
3.5.2 <i>In vitro</i> screening .....	88
3.5.3 Membrane activity .....	89
3.5.4 Antiproliferative activity <i>in vitro</i> and mechanism of action.....	93
3.5.5 Antiproliferative activity <i>in vivo</i> .....	98
3.6 Conclusion .....	99
3.7 Acknowledgments.....	100

3.8 References.....	100
<b>Chapitre 4 : Propriétés antibactériennes et anticancéreuses de nouveaux sels de biguanidium.....</b>	<b>103</b>
4.1 Introduction.....	103
4.2 Partie expérimentale.....	105
4.3 Résultats et discussion .....	115
4.3.1 Synthèse .....	115
4.3.2 Propriétés anticancéreuses et sélectivités.....	117
4.3.3 Propriétés antibactériennes .....	119
4.4 Conclusion .....	122
4.4 Références.....	123
<b>Chapitre 5 : Conclusion générale .....</b>	<b>124</b>
5.1 Bilan des travaux de recherche .....	124
5.2 Perspectives.....	126
5.3 Références.....	129
<b>Annexe 1: Informations supplémentaires du chapitre 2 « Membrane permeabilization induced by alkylbiguanidium salts ».....</b>	<b>130</b>
A1.1 NMR Spectra.....	131
A1.2 Bacterial membrane depolarization .....	137
A.1.3 Bacterial membrane permeabilization .....	138
<b>Annexe 2: Informations supplémentaires du chapitre 3 « Phenylethynylbenzyl - Modified Biguanides Inhibit Pancreatic Cancer Tumor Growth ».....</b>	<b>140</b>
A2.1 Synthesis and Characterization .....	141
A2.1.1 General .....	141
A2.1.2 Synthetic procedures .....	142
A2.2 NMR Spectra.....	151
A2.3 Single crystal X-ray diffraction.....	163
A2.4 Hemolytic activity.....	176
A2.5 Measurement of the LogP .....	177
A2.6 U-Tube experiments.....	179
A2.7 Lucigenin assay.....	180



A2.8 HPTS assay .....	182
A2.9 Safranin-O assay .....	182
A2.10 Mitochondrial permeation and accumulation .....	183
A2.11 Mice survival.....	184
<b>Annexe 3 : Informations supplémentaires du chapitre 4 « Amélioration des propriétés antibactériennes et anticancéreuses de nouveaux sels de biguanidium » .....</b>	<b>185</b>
A3.1 Croissance des cellules et détermination de l'IC <sub>50</sub> .....	186
A3.2 Croissance des bactéries et détermination de la MIC .....	186
A3.3 Activité hémolytique.....	187
A3.4 Courbes des IC <sub>50</sub> .....	187
A3.4.1 Cellules cancéreuses KP4 .....	187
A3.4.2 Cellules saines HPNE .....	197
Références des annexes.....	206

## Liste des tableaux

Table 2.1	Radius of EYPC liposomes after exposure to alkylbiguanidium chlorides.....	60
Table 2.2	Permeabilization of the <i>E. coli</i> (MG1655) membrane by alkylbiguanidium chlorides. ....	68
Table 2.3	Minimal inhibitory concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ). ....	72
Table 4.1	Activités anticancéreuses des sels de biguanidium et toxicité.....	118
Table 4.2	Activités antibactériennes des sels de biguanidium.....	121
Table A2.1	Crystal data and structure refinement for compound <b>3.1b</b> .....	163
Table A2.2	Fractional Atomic Coordinates ( $\times 10^4$ ) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for compound <b>3.1b</b> .....	165
Table A2.3	Anisotropic Displacement Parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for compound <b>3.1b</b> . ....	167
Table A2.4	Bond Lengths for compound <b>3.1b</b> .....	169
Table A2.5	Bond Angles for compound <b>3.1b</b> . ....	170
Table A2.6	Hydrogen Bonds for compound <b>3.1b</b> .....	171
Table A2.7	Torsion Angles for compound <b>3.1b</b> . ....	172
Table A2.8	Hydrogen Atom Coordinates ( $\text{\AA} \times 10^4$ ) and Isotropic Displacement Parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for compound <b>3.1b</b> .....	173
Table A2.9	Minimal concentration for under 10% hemolysis.....	177
Table A2.10	Calibration curve and Log P values of compound <b>3.1b</b> .....	178
Table A2.11	Calibration curve and U-tube experiment of compound <b>3.1b</b> .....	180

## Liste des figures

Figure 1.1	Biguanides utilisés en tant qu'antibactériens et antifongiques.....	2
Figure 1.2	Biguanide utilisé en tant qu'antipaludique.....	3
Figure 1.3	Metformine en tant que catalyseur de la réaction de Suzuki-Miyaura.....	3
Figure 1.4	Biguanides utilisés en tant qu'antidiabétiques .....	4
Figure 1.5	A) Formes de résonance d'un biguanide monoprotoné. B) Formes protonées de la metformine .....	5
Figure 1.6	Synthèse de biguanides avec la méthode au FeCl <sub>3</sub> .....	6
Figure 1.7	Synthèse de biguanides en utilisant de l'acide chlorhydrique concentré .....	6
Figure 1.8	Synthèse de biguanides en utilisant la méthode aux micro-ondes .....	7
Figure 1.9	Mécanisme anticancéreux sur les cellules cancéreuses souches .....	10
Figure 1.10	Résumé des différents mécanismes d'action cellulaire de la metformine .....	14
Figure 1.11	Liposomes de vectorisation d'un polymère de metformine de Zhao <i>et al.</i> .....	18
Figure 1.12	Micelles de vectorisation du metformine-oléate enrobées de fucoïdan de Jiang <i>et al.</i> .....	19
Figure 1.13	Biguanides-pyrazoles de Yang <i>et al.</i> .....	20
Figure 1.14	Analogues de la phenformine de Narise <i>et al.</i> .....	20
Figure 1.15	Biguanides-TPP <sup>+</sup> de Boukalova <i>et al.</i> .....	21
Figure 1.16	Transporteurs ioniques imidazolium-PEB et benzimidazolium-PEB.....	23
Figure 1.17	Transporteurs ioniques binaphtol-imidazolium <sup>91</sup> .....	24
Figure 1.18	Membrane phospholipidique.....	25
Figure 1.19	Structure d'un liposome .....	27
Figure 1.20	Structure de la membrane bactérienne .....	28
Figure 1.21	Structure de la mitochondrie .....	32
Figure 1.22	Chaîne de transport d'électron dans la mitochondrie.....	33
Figure 2.1	Sondes fluorescentes utilisées pour les études de transport d'ions .....	44
Figure 2.2	Sondes fluorescentes utilisées pour les études de dépolarisation.....	45
Figure 2.3	Hydrolyse de l'ONPG lors de la perméabilisation de la membrane bactérienne.. .....	46
Figure 2.4	Structures of commercially available biguanides and benzalkonium chloride.	49

Figure 2.5	Synthesis of alkylbiguanidium salts <b>2.1 - 2.6</b> .....	58
Figure 2.6	Ion transport behavior of alkylbiguanidium.....	63
Figure 2.7	Schematic representation of the three possible H <sup>+</sup> /OH <sup>-</sup> transport processes induced by alkylbiguanidium salts.....	64
Figure 2.8	Depolarization behavior of alkylbiguanidium.....	66
Figure 2.9	Hydrolysis of ONPG at various concentrations .....	67
Figure 2.10	Depolarization of the <i>E. coli</i> (DH5 $\alpha$ ) and <i>B. thuringiensis</i> (HD73) membranes. ....	70
Figure 2.11	Hemolysis of RBCs at various concentrations.....	73
Figure 3.1	Schéma de l'expérience de tube en U .....	79
Figure 3.2	Sondes fluorescente utilisées pour la coloration des cellules.....	80
Figure 3.3	Visualisation par immunofluorescence de la protéine TOMM20.....	81
Figure 3.4	Structure and activity screening of PEB-biguanidium salts.....	87
Figure 3.5	Membrane activity of PEB-biguanidium salts. ....	91
Figure 3.6	Antiproliferative activity and mechanism of action of PEB-biguanidium <b>3.1b</b> . ..	97
Figure 3.7	Progression of the volume of KP4 cells sub-cutaneous xenografts performed in nude mice over 37 days.....	99
Figure 4.1	Structure des sels de biguanidium étudiés dans ce chapitre.....	104
Figure 4.2	Synthèse des sels de biguanidiums étudié.....	116
Figure 5.1	A) Conjugé d'acide folique – sel de biguanidium. B) Conjugé TPP-PEB-biguanidium.....	127
Figure 5.2	Méthode d'identification de la cible de la metformine par conjugaison avec la biotine.....	128
Figure A1.2	<sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> ) spectrum of 1-Hexylbiguanidium chloride (C <sub>6</sub> Cl).....	131
Figure A1.3	<sup>13</sup> C NMR (MeOD) spectrum of 1-Hexylbiguanidium chloride (C <sub>6</sub> Cl).....	131
Figure A1.4	<sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> ) spectrum of 1-Octylbiguanidium chloride (C <sub>8</sub> Cl).....	132
Figure A1.5	<sup>13</sup> C NMR (MeOD) spectrum of 1-Octylbiguanidium chloride (C <sub>8</sub> Cl).....	132
Figure A1.6	<sup>1</sup> H NMR (DMSO-d <sub>6</sub> ) spectrum of 1-Decylbiguanidium chloride (C <sub>10</sub> Cl).....	133
Figure A1.7	<sup>13</sup> C NMR (MeOD) spectrum of 1-Decylbiguanidium chloride (C <sub>10</sub> Cl).....	133

Figure A1.8	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 1-Dodecylbiguanidium chloride salt ( $\text{C}_{12}\text{Cl}$ ).	134
Figure A1.9	$^{13}\text{C}$ NMR (MeOD) spectrum of 1-Dodecylbiguanidium chloride salt ( $\text{C}_{12}\text{Cl}$ )	134
Figure A1.10	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 1-Tetradecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{14}\text{Cl}$ ) ....	135
Figure A1.11	$^{13}\text{C}$ NMR (MeOD) spectrum of 1-Tetradecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{14}\text{Cl}$ ) ..	135
Figure A1.12	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 1-Hexadecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{16}\text{Cl}$ ) ..	136
Figure A1.13	$^{13}\text{C}$ NMR (MeOD) spectrum of 1-Hexadecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{16}\text{Cl}$ ) ..	136
Figure A1.14	Depolarization assay on <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .	137
Figure A1.15	Depolarization assay on <i>B. thuringiensis</i> HD073.	138
Figure A1.16	$\text{RR}_r$ of ONPG hydrolysis relative to the concentration of $\text{C}_{10}\text{Cl}$ .....	139
Figure A2.1	$^{19}\text{F}$ NMR (282 MHz) spectrum of $\text{NTf}_2^-$ (from <b>3.1a</b> ) in DMSO- $d_6$ .....	151
Figure A2.2	$^{19}\text{F}$ NMR (282 MHz) spectrum of $\text{OTf}^-$ (from <b>3.1b</b> ) in DMSO- $d_6$ .....	151
Figure A2.3	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzaldehyde in $\text{CDCl}_3$	152
Figure A2.4	$^{13}\text{C}$ NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzaldehyde in $\text{CDCl}_3$ .	152
Figure A2.5	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylamine in DMSO- $d_6$ .	153
Figure A2.6	$^{13}\text{C}$ NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylamine in DMSO- $d_6$ ..	153
Figure A2.7	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylbiguanide chloride salt ( <b>3.1</b> ) in DMSO- $d_6$ .....	154
Figure A2.8	$^{13}\text{C}$ NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylbiguanide chloride salt ( <b>3.1</b> ) in DMSO- $d_6$ .....	154
Figure A2.9	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylamine in DMSO- $d_6$	155
Figure A2.10	$^{13}\text{C}$ NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylamine in DMSO- $d_6$	155
Figure A2.11	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylbiguanide chloride salt ( <b>3.2</b> ) in DMSO- $d_6$ .....	156
Figure A2.12	$^{13}\text{C}$ NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylbiguanide chloride salt ( <b>3.2</b> ) in DMSO- $d_6$ .....	156

Figure A2.13	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz) spectrum of tert-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate in CDCl <sub>3</sub> .....	157
Figure A2.14	<sup>13</sup> C NMR (70 MHz) spectrum of tert-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate in CDCl <sub>3</sub> .....	157
Figure A2.15	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO-d <sub>6</sub> .....	158
Figure A2.16	<sup>13</sup> C NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO-d <sub>6</sub> .....	158
Figure A2.17	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz) spectrum of (4-(phenylethynylphenyl)biguanide trifluoroacetic salt ( <b>3.3</b> ) in DMSO-d <sub>6</sub> .....	159
Figure A2.18	<sup>13</sup> C NMR (70 MHz) spectrum of (4-(phenylethynylphenyl)biguanide trifluoroacetic salt ( <b>3.3</b> ) in DMSO-d <sub>6</sub> .....	159
Figure A2.19	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz) spectrum of tert-butyl (4-phenethylphenyl)carbamate in CDCl <sub>3</sub> .....	160
Figure A2.20	<sup>13</sup> C NMR (70 MHz) spectrum of tert-butyl (4-phenethylphenyl)carbamate in CDCl <sub>3</sub> .....	160
Figure A2.21	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethylphenyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO-d <sub>6</sub> .....	161
Figure A2.22	<sup>13</sup> C NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethylphenyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO-d <sub>6</sub> .....	161
Figure A2.23	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz) spectrum of (4-(phenylethylphenyl)biguanide trifluoroacetic acid salt ( <b>3.4</b> ) in DMSO-d <sub>6</sub> .....	162
Figure A2.24	<sup>13</sup> C NMR (70 MHz) spectrum of (4-(phenylethylphenyl)biguanide trifluoroacetic acid salt ( <b>3.4</b> ) in DMSO-d <sub>6</sub> .....	162
Figure A2.25	Hemolytic activity .....	176
Figure A2.26	Calibration curve of <b>3.1b</b> in octanol.....	178
Figure A2.27	Calibration curve of <b>3.1b</b> by HPLC .....	179
Figure A2.28	Chloride transport assay with lucigenin .....	181
Figure A2.29	Progression of the fraction surviving (%) of nude mice with KP4 cells subcutaneous xenografts performed over 37 days.....	184

# Liste des abréviations

## Souches bactériennes et cellules

AH375	Cellules cancéreuses du canal pancréatique, souris
DH5 $\alpha$	Bactéries <i>Escherichia coli</i>
HD73	Bactéries <i>Bacillus thuringiensis</i>
HEK293T	Cellules saines embryonnaires du rein, humain
HPNE	Cellules saines épithéliales pancréatiques, humain
IMR90	Cellules saines fibroblastiques, humain
KP4	Cellules cancéreuses du canal pancréatique, humain
MG1655	Bactéries <i>Escherichia coli</i>
NB508	Cellules cancéreuses du canal pancréatique, souris
Panc1	Cellules cancéreuses du canal pancréatique, humain
PSN-1	Cellules cancéreuses du canal pancréatique, humain
SC5314	Levures <i>Candida albicans</i>
SK037	Bactéries <i>Escherichia coli</i> , pompe TolC inactivée
UM680	Levures <i>Candida krusei</i>

## Général

ACC	acétyl-CoA carboxylase
ACN	acétonitrile
AcOEt	acétate d'éthyle
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adenosine diphosphate
AMP	adenosine monophosphate
AMPK	5' <i>AMP-activated protein kinase</i>
anh.	anhydre
ATP	adenosine triphosphate
AUC	<i>area under curve</i> , aire sous la courbe

BAC	<i>benzalkonium chloride</i> , chlorure de benzalkonium
BOC	groupement protecteur tert-butyl carbamate
calcd.	<i>calculated</i> , calculé
CCM	chromatographie sur couche mince
CSC	<i>cancer stem cell</i> , cellule souche cancéreuse
CXCL8	interleukine 8
d	doublet (RMN)
DAPI	sonde 4',6-diamidino-2-phénylindole
DCM	dichlorométhane
DFT	<i>density functional theory</i> , théorie de la fonctionnelle de la densité
DHFR	dihydrofolate réductase
DiSC2(5)	sonde 3,3'-diéthylthiadicarbocyanine iodée
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	diméthyl sulfoxyde
EC <sub>50</sub>	concentration efficace médiane
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i>
eq.	équivalent
et	éthyle
et al.	<i>et alii</i> , et autres
etc.	<i>et cætera</i> , et autres choses
EYPC	<i>egg-yolk phosphatidyl choline</i>
FASN	<i>fatty acid synthase</i> , synthase d'acide gras
HC <sub>50</sub>	concentration hémolytique médiane
HEPES	acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia inducible factor 1-<math>\alpha</math></i> , facteur inductible de l'hypoxie 1- $\alpha$
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , chromatographie liquide de haute performance
HPTS	sonde 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate de trisodium
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , spectrométrie de masse de haute résolution
I	insuline



IC <sub>50</sub>	concentration inhibitrice médiane
IGF	<i>insulin like growth factor</i> , facteur de croissance similaire à l'insuline
J	constante de couplage (RMN)
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCMS	<i>liquid chromatography – mass spectrometry</i> , chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LogP	coefficient de partition octanol - eau
LUV	<i>large unimellar vesicule</i> , large vésicule unilamellaire
m	multiplet (RMN)
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i> , désorption/ionisation laser assisté par la matrice
me	méthyle
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> , concentration minimale inhibitrice
MS	<i>mass spectrometry</i> , spectrométrie de masse
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , cible de la rapamycine chez les mammifères
MW	<i>microwave</i> , micro-onde
m/z	ratio masse/charge (MS)
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite
NDH-1	NADH-quinone oxydoréductase de la bactérie
NF-Kb	<i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , resonance magnétique nucléaire (RMN)
NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup>	bis(trifluorométhane)sulfonimide
OAc	acétate
OCR	<i>oxygen consumption rate</i> , taux de consommation d'oxygène
OCT	<i>organic cation transporter</i> , transporteur de cation organique
OD	<i>optical density</i> , densité optique
o.n	<i>overnight</i> , de nuit
ONP	ortho-nitrophénol
ONPG	ortho-nitrophénol-β-galactoside
OTf	triflate

p.	page
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAPB	polyaminopropyl biguanide
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , tampon phosphate salin
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma cell</i> , cellules de l'adénocarcinome du canal pancréatique
PEB	phenyléthynylbenzyle
Pi	phosphate inorganique
pH	potentiel hydrogène
pKa	constante d'acidité
P13k/Akt	phosphinositide-3-kinase
Q	ubiquinone
QAC	<i>quaternary ammonium cation</i> , cation ammonium quaternaire
qn	quintuplet (RMN)
Rag-GTPases	guanosine triphosphate hydrolases
RBC	<i>red blood cell</i> , globule rouge
REDD1	<i>regulated in development and DNA damage response</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , espèces réactives de l'oxygène
s	singulet (RMN)
sat.	saturé
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> , petit acide ribonucléique interférent
t	triplet (RMN)
THF	tétrahydrofurane
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , acide trifluoroacétique
TMS	triméthylesilane
TMSCl	<i>trimethylsilyl chloride</i> , chlorure de triméthylsilyle
TOF	<i>time of flight</i> , temps de vol
TPP+	cation triphénylphosphonium
UPR	<i>unfolded protein response</i> , réponse aux protéines non repliées
UV	ultraviolet

VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
Vis	visible (lumière)
WB	<i>western blot</i> , technique de transfert de protéines
XRD	<i>X-ray diffraction</i> , diffraction des rayons X
YPDA	<i>yeast peptone dextrose adenine hemisulfate media</i>
$\delta$	déplacement chimique
$^1\text{H}$	RMN du proton
$^{13}\text{C}$	RMN du carbone 13
$\lambda_{\text{ex}}$	longueur d'onde d'excitation
$\lambda_{\text{em.}}$	longueur d'onde d'émission
2D	deux dimensions

*À mes parents, à mon frère*

## Remerciements

Cette thèse est la dernière étape de huit années d'études à l'université, et il s'agit d'un des accomplissements dont je suis le plus fière dans ma vie. Mais je n'aurais jamais pu le réaliser sans tous ces gens alentours de moi, qui m'ont supporté et encouragé à travers tout le processus.

Bien sûr, la première personne que j'aimerais remercier est Andreea. Je suis entrée dans ton groupe au tout début de mon parcours universitaire, j'en ressort aujourd'hui une chimiste accomplie et une meilleure personne, grâce à toi. Merci énormément pour ton temps, tes idées, tes encouragements et surtout d'avoir partagé avec moi ta passion pour la science. Merci aussi de m'avoir permis de vivre des expériences aussi folles que celles que j'ai vécu dans ton groupe. Entre les conférences à Hawaii et en Italie, les journées de science avec les enfants, les courses dans la boue et les party d'été, tu as toujours pensé à nous. Ce fut un grand honneur pour moi de faire partie de ton groupe!

J'aimerais aussi remercier tous les gens qui ont fait partie de ce groupe et que j'ai eu la chance de côtoyer. En particulier, merci aux anciens, Julien G., Julie K., Vincent, Marc, Thierry, Solène, Mathieu et Vanessa, mais aussi aux plus nouveaux, Jérémie, Julie V., Margaux, Alexandra, Philippe, Guillaume et Amélie. Merci pour toutes les discussions intéressantes, les encouragements, les idées de projet, mais merci aussi pour tous les moments drôles, disjonctés, et complètement fous. Vous avez fait en sorte que chaque journée au laboratoire soit une aventure! J'ai aussi eu la chance de superviser plusieurs stagiaires dans mon doctorat, Mounir, Michèle, Julien W., Pénélope, Philippe, Émilie et Guillaume. Chacun d'entre vous m'a permis d'apprendre beaucoup, sur ma science mais aussi sur moi-même, et ce fut un plaisir de vous connaître - et encore aujourd'hui, Guillaume et Philippe, de vous côtoyer dans le groupe.

Je remercie aussi le professeur Shawn Collins et son groupe de recherche, avec qui j'ai partagé le corridor et le laboratoire pendant mes études. Vous avez mis de l'ambiance dans notre coin perdu du bâtiment, et vous avez fait en sorte que ce soit toujours agréable d'y travailler. Un merci particulier à Johann et Shawn, que j'ai eu la chance d'apprendre à connaître un peu plus et qui sont aujourd'hui des amis précieux. Shawn, on s'est connu au tout début de notre baccalauréat, et on finit aujourd'hui notre doctorat ensemble. Ça n'aurait pas été pareil sans toi. Merci!

J'aimerais aussi remercier le professeur Gerardo Ferbeyre et son groupe de recherche, en particulier Maxime, Marie-Camille, Fred, Sebastian et Véronique, pour avoir été non seulement des collaborateurs hors pairs mais aussi pour m'avoir accueilli à bras grand ouvert dans votre laboratoire. Merci aussi au professeur Joelle Pelletier et son groupe de recherche, pour m'avoir vous aussi accueilli dans vos laboratoires et pour votre aide et expertise dans plusieurs aspects de mon projet.

Merci beaucoup aux services du département, les laboratoires de spectrométrie de masse, le centre de flow continu et les laboratoires RMN, toujours prêts à aider nos idées folles, et merci aussi aux membres de mon jury, les professeurs Alexis Vallée-Bélisle, Michel Lafleur et Joelle Pelletier, pour vos conseils et pour la lecture de cette thèse.

J'aimerais aussi remercier les gens qui ont été avec moi d'une façon plus personnelle. Tout d'abord, mes coéquipières de synchro, et en particulier Josyane, Beth, Sarah, Tessa, Laurence, Alycia et Dominic. Merci d'avoir été là à tous les moments, autant pour m'encourager et me remonter le moral que pour sortir et faire les fous. Vous êtes une sacrée gang et je suis extrêmement choyée de vous avoir à mes côtés. Merci aussi Marie-France d'avoir été une coach aussi extraordinaire. Ta passion et détermination ont été inspirantes! Merci à ma famille, et à Joanie, Lisa, Laura et France, mes amies de toujours. Je n'y serais pas arrivé sans votre support et votre écoute. France, merci d'être mon oreille au quotidien, ma partner, mon mentor. Je serais si perdue sans toi!

Pour finir, j'aimerais remercier mon père, ma mère et mon frère. Les mots me manquent pour vous dire à quel point je vous remercie d'être là, depuis toujours, à me soutenir dans toutes mes aventures plus folles les unes que les autres. Cette thèse-là est aussi la vôtre, parce que je n'aurais JAMAIS pu la compléter sans vous dans ma vie. Je vous aime, et merci, mille fois merci.

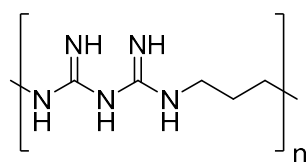
# Chapitre 1 : Introduction générale

## 1.1 Les biguanides

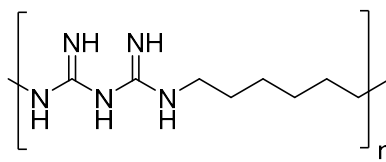
### 1.1.1 Utilisations diverses des biguanides

Les biguanides sont une classe de molécules organiques utilisées depuis plusieurs décennies dans le domaine pharmaceutique. Leur description dans la littérature remonte aux années 1920, avec la découverte de guanidines comme principal agent actif dans une plante utilisée en médecine traditionnelle, le lilas français (*Galega officinalis*)<sup>1</sup>. Bien que démontrant des propriétés anti-hyperglycémiques intéressantes, c'est-à-dire une capacité à diminuer le niveau de glucose dans le sang, les biguanides et guanidines furent mises de côté pendant de nombreuses années au profit de l'insuline pour le traitement du diabète. Ce n'est que dans les années 1950 que le domaine pharmaceutique s'est intéressé de nouveau à ces composés, qui sont aujourd'hui utilisés couramment dans de nombreux domaines.

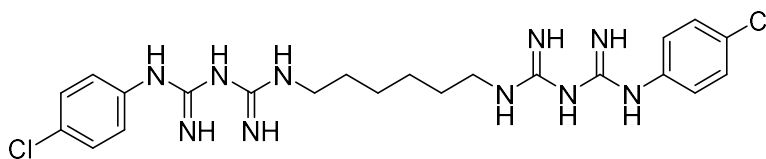
Une des applications les plus notables des biguanides est en tant qu'agents antibactériens et antifongiques. Parmi les composés les plus communément utilisés, on retrouve la chlorhexidine, le polyaminopropyl biguanide (PAPB), le polyhexanide et l'alexidine, des structures comportant deux ou plusieurs fonctions biguanides (**fig. 1.1**)<sup>2</sup>. La chlorhexidine est utilisée en particulier dans le domaine médical pour la stérilisation d'instruments et le traitement de blessures. Arrivée sur le marché dans les années 1950, son mode d'action passe par l'adsorption du cation biguanide sur les lipides chargés négativement de la membrane bactérienne, suivit de son insertion dans la membrane et de la séparation de cette dernière en microdomaines. Cette séquestration diminue la perméabilité de la membrane et induit une fuite du contenu cellulaire, ce qui mène éventuellement à la mort de la bactérie<sup>3, 120</sup>. Les polymères comme le PAPB et le polyhexanide fonctionnent d'une façon similaire, mais ciblent également l'ADN bactérien et lui causent des dommages irréversibles<sup>4</sup>.



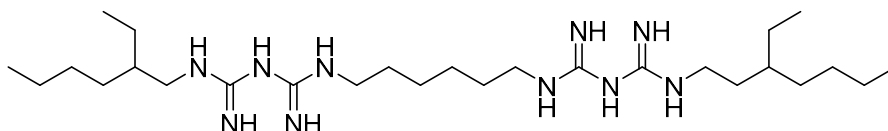
**Polyaminopropyl biguanide**



**Polyhexanide**



**Chlorhexidine**

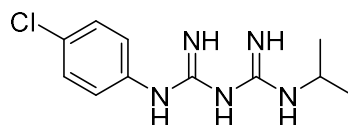


**Alexidine**

Figure 1.1 Biguanides utilisés en tant qu'antibactériens et antifongiques

Les biguanides sont aussi utilisés en tant qu'antipaludiques avec le proguanile (**fig. 1.2**), une prodrogue dont le métabolite actif est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR) du parasite<sup>5</sup>. L'inhibition de cette enzyme cause l'interruption de la synthèse d'ADN et d'acides aminés. Lorsque qu'utilisé en combinaison avec l'atovaquone, un autre médicament antipaludique, le mécanisme d'action du proguanile change. Il permet alors de diminuer la concentration nécessaire d'atovaquone pour augmenter la perméabilité de la membrane et ainsi perturber son potentiel électrochimique<sup>6</sup>.





**Proguanil**

Figure 1.2 Biguanide utilisé en tant qu'antipaludique

Outre les applications biologiques, les biguanides sont utilisés en catalyse en tant que ligands dans plusieurs réactions comme la condensation aldolique<sup>7</sup> ou la transestérification<sup>8</sup>. Les structures rapportées dans le domaine de la catalyse sont variées, passant de biguanides simples jusqu'à des structures comme celles d'Akhavan *et al.*, avec des nanotubes de carbone fonctionnalisés par des biguanides<sup>9</sup>. Le 1,1-diméthylbiguanide, ou metformine, fut aussi récemment utilisé par notre groupe en tant que ligand dans la réaction de Suzuki-Miyaura dans l'eau (**fig. 1.3**)<sup>10</sup>.

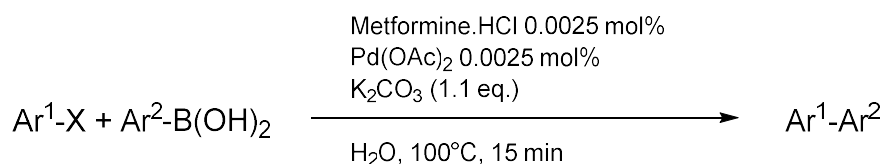


Figure 1.3 Metformine en tant que catalyseur de la réaction de Suzuki-Miyaura<sup>10</sup>

Bien que les résultats de la metformine en tant que ligand soient très probants, son utilisation principale reste en tant qu'agent antidiabétique. En effet, ayant été mis de côté après leur découverte en 1920, les biguanides ont connu un regain d'intérêt lorsque leurs propriétés anti-hyperglycémiques furent explorées plus en profondeur<sup>11</sup>. La phenformine et la buformine (**fig. 1.4**) furent tout d'abord utilisées dans les années 1950 pour le traitement du diabète de type II. Toutefois, ces composés plus lipophiles que la metformine se sont avérés à produire de l'acidose lactique chez les patients (40-64 par 100 000 patients pour la phenformine<sup>12</sup>), raison

pour laquelle ils ont été retirés du marché en faveur de la metformine. Celle-ci est alors devenue le médicament le plus vendu mondialement pour le traitement du diabète de type II, avec 81 millions de prescriptions aux États-Unis en 2018<sup>13</sup>. Bénéficiant d'une grande efficacité couplée à très peu d'effets secondaires, les doses de metformine utilisées vont aisément jusqu'à 1 g, et parfois même jusqu'à 2 g par jour. La prise de metformine diminue la production de glucose par le foie, augmente la sensibilité à l'insuline dans les tissus et diminue l'absorption du glucose dans l'intestin<sup>14</sup>.

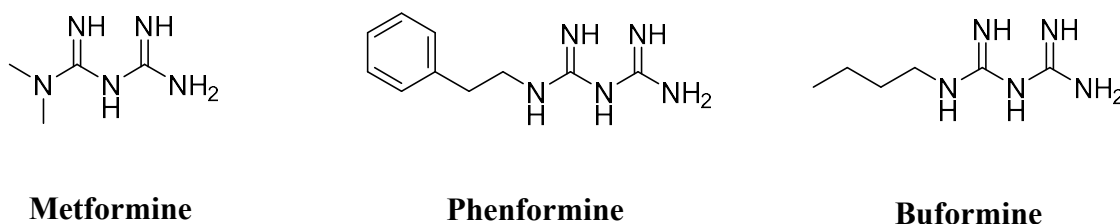


Figure 1.4 Biguanides utilisés en tant qu'antidiabétiques

Malgré la diversité des structures retrouvées chez les biguanides commerciaux, de la simple metformine jusqu'au polymère PAPB, leurs propriétés chimiques et leurs méthodes de synthèse sont généralement similaires.

### 1.1.2 Propriétés et synthèses des biguanides

Les biguanides sont des superbases organiques possédant deux constantes d'acidité ( $pK_{a1} = 2 - 4$  et  $pK_{a2} = 10 - 18$ ) et qui sont donc simplement protonées à pH physiologique. Leur forte basicité provient de la grande conjugaison et de la présence de plusieurs formes de résonance, décrites à la **figure 1.5a**<sup>15</sup>. Plusieurs études par la théorie de la fonctionnelle de la densité (*density functional theory*, DFT) indiquent que la charge positive de la metformine monoprotinée se trouve sur l'atome d'azote N2 alors que la deuxième charge de la metformine doublement protonnée se trouve sur l'atome d'azote N3 (**fig. 1.5b**)<sup>16-17</sup>.

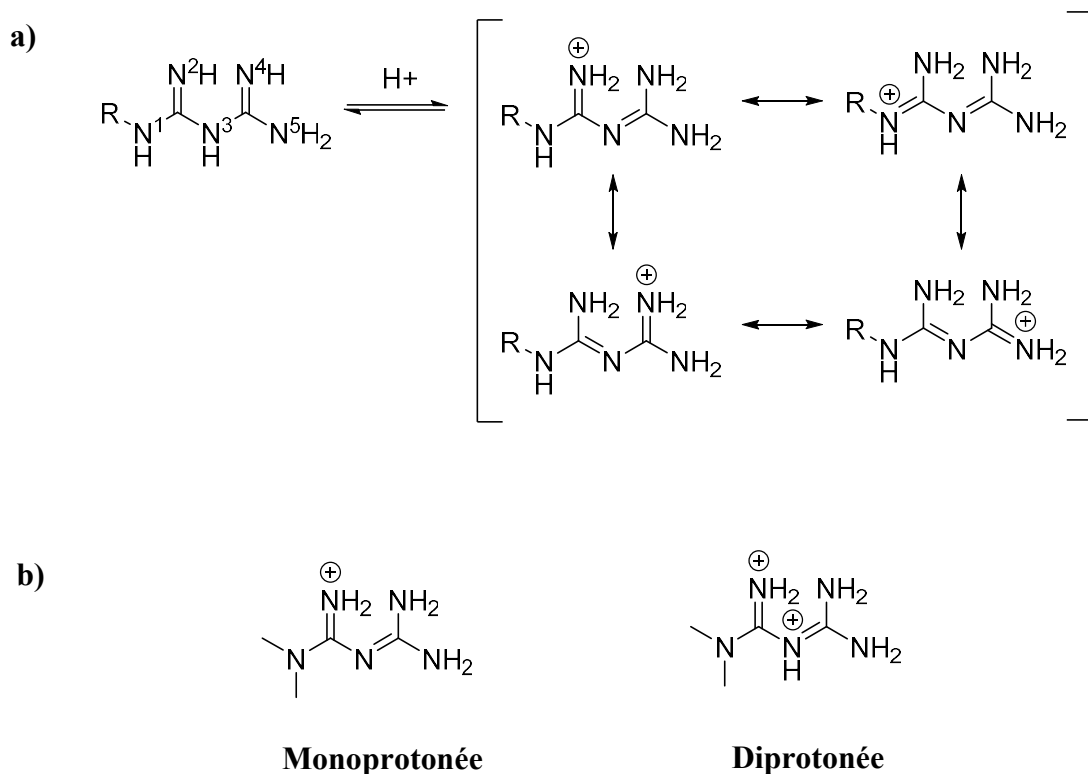


Figure 1.5 A) Formes de résonance d'un biguanide monoprotoné. B) Formes protonées de la metformine

Les biguanides peuvent être fonctionnalisés sur les atomes N1, N2, N4 et N5, mais le sont plus souvent aux extrémités N1 et N5. La synthèse asymétrique d'un biguanide se fait par l'attaque nucléophile d'une amine substituée sur une cyanoguanidine. La première méthode de synthèse de biguanides fut publiée en 1989 par Suyama *et al.* et utilise le FeCl<sub>3</sub> ou ZnCl<sub>2</sub> en quantité stœchiométrique dans du 1,4-dioxane ou du tétrahydrofurane (THF) à reflux (**fig. 1.6**)<sup>18</sup>. Cette méthode fut utilisée avec le dicyandiamide ou la cyanophénylguanide pour obtenir des alkylbiguanides et phénylbiguanides avec des rendements entre 63 et 99%. Seulement des amines simples furent utilisées dans cette publication (alkylamines ou phénylamines) et aucune réaction avec des substrats contenant des groupements autres (halogène, nitro, alcyne, etc...) ne fut rapportée. La réaction fut toutefois utilisée avec des cyanothiourées comme réactif de départ au lieu de cyanoguanidines et des rendements entre 55 et 89% furent obtenus selon l'amine utilisée.

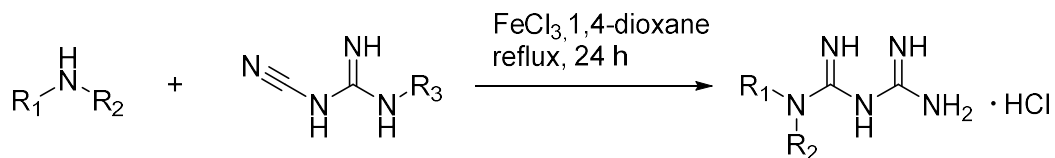


Figure 1.6 Synthèse de biguanides avec la méthode au  $\text{FeCl}_3$ <sup>18</sup>

Lebel *et al.* ont aussi décrit la synthèse d'arylbiguanides asymétriques en utilisant du HCl aqueux à reflux qui conduit à l'obtention de bons rendements (**fig. 1.7a**)<sup>19</sup>. Les auteurs ont aussi utilisé cette méthode pour former des bis-biguanides avec la 1,3 ou 1,4-phénylènediamine et deux équivalents de dicyandiamide (**fig. 1.7b**), ou encore pour former des diarylbiguanides symétriques avec la réaction de deux équivalents d'arylamine sur le dicyanamide de sodium (**fig. 1.7c**). Cette dernière réaction fut effectuée avec amines aromatiques contenant différents groupements fonctionnels, où des rendements entre 49 et 71% ont été obtenus.

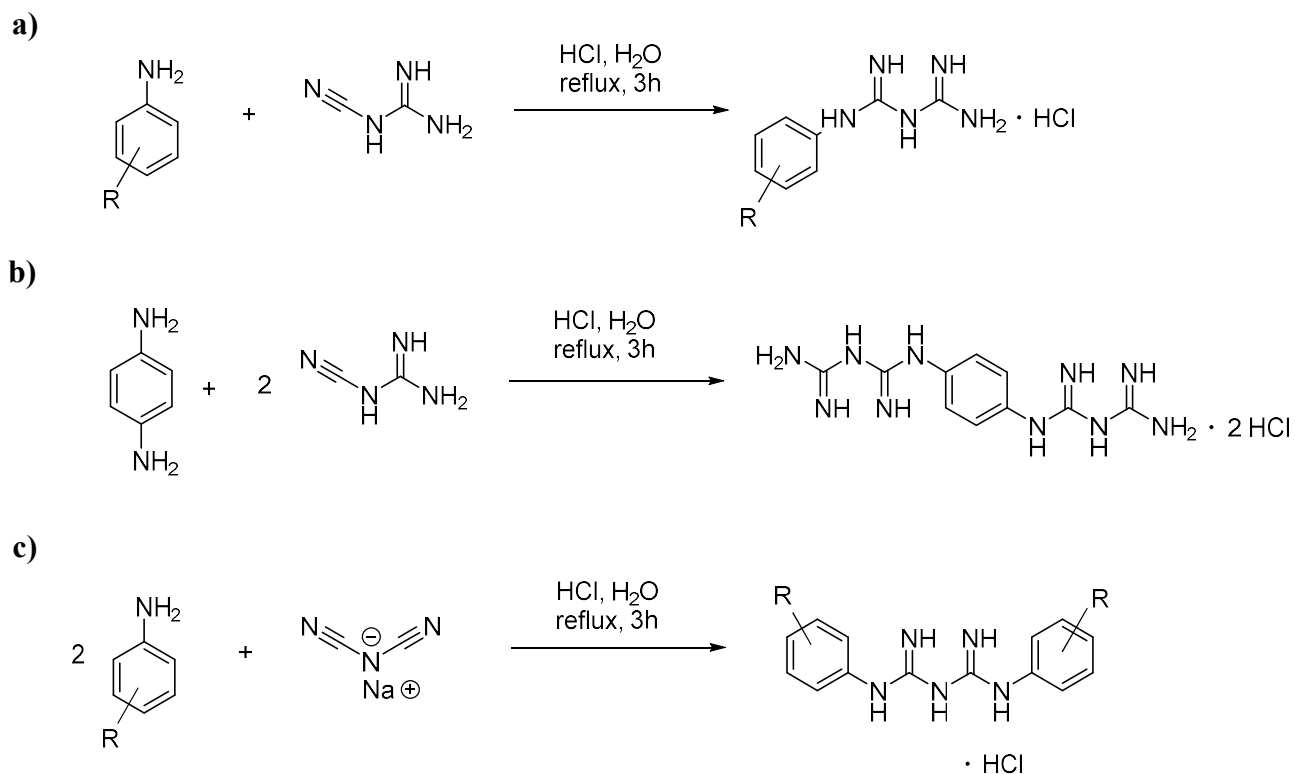


Figure 1.7 Synthèse de biguanides en utilisant de l'acide chlorhydrique concentré<sup>19</sup>

Une des méthodes de synthèse les plus récentes, décrite par Mayer *et al.* en 2004, utilise du HCl concentré dans l'acétonitrile sous irradiation micro-ondes, à 150 °C pendant 15 minutes (**fig. 1.8**)<sup>20</sup>. Les auteurs ont ainsi synthétisé des arylbiguanides substitués par une grande variété de groupements fonctionnels avec des rendements généralement entre 36 et 85%, mais allant jusqu'à seulement 2 à 6% pour certains substrats. Toutefois, en changeant le HCl pour du chlorure de triméthylsilane (TMSCl), les auteurs sont parvenus à augmenter le rendement de la réaction pour les substrats contenant des groupements fonctionnels alcools et acides carboxyliques (de 0% avec la méthode HCl jusqu'à 96% pour la méthode TMSCl, pour le 4-aminophénol). La réaction tolère aussi un grand nombre de solvants tels que l'eau, l'isopropanol ou le THF et se fait beaucoup plus rapidement que les autres méthodes de la littérature.

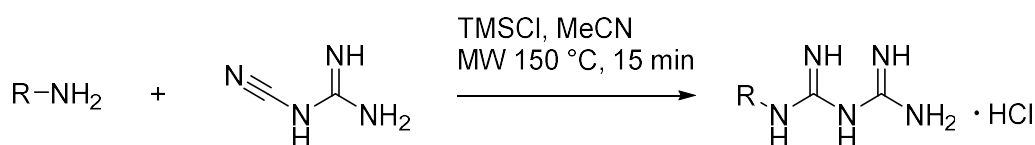


Figure 1.8 Synthèse de biguanides en utilisant la méthode aux micro-ondes<sup>20</sup>

## 1.2 La metformine et le cancer

### 1.2.1 Facteur de risque associé au diabète

La première association entre le diabète et le cancer fut rapportée en 1934 par Marbles<sup>21</sup> et suscite depuis un intérêt croissant dans la recherche en oncologie. Plusieurs études épidémiologiques ont en effet démontré que les patients diabétiques ont un taux d'incidence et de mortalité plus élevé que dans l'ensemble de la population<sup>22</sup>, en particulier pour les cancers du sein, de la vessie, du colon, du foie et du pancréas<sup>23-24</sup>. En 2010, l'association américaine du diabète et la société américaine du cancer ont publié un rapport conjoint après une conférence regroupant plusieurs experts dans ces domaines<sup>25</sup>. Cette revue de la littérature indique que le

risque est le plus grand pour les cancers du foie, du pancréas et de l'endomètre (facteur de risque plus grand que 2) et dans une moindre mesure pour les cancers du côlon, du sein et de la vessie (facteur de risque entre 1.2 et 1.5). Bien que les causes de cette association soient encore présentement à l'étude, les auteurs décrivent plusieurs mécanismes pouvant expliquer le lien entre les deux maladies :

- La concentration accrue dans le sang des patients diabétiques d'insuline et de facteurs de croissance similaires à l'insuline (*insulin-like growth factor*, IGF) est associée à une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses et des métastases<sup>26</sup>.
- Une augmentation de la concentration d'insuline dans le sang a pour effet de réduire la production de globuline par le foie, une protéine qui se lie aux hormones sexuelles<sup>27</sup>. L'augmentation du taux d'estrogène et de testostérone est associée à un plus grand risque de cancer du sein et de l'endomètre.
- Il fut démontré que les cellules cancéreuses utilisent principalement la glycolyse au lieu de la phosphorylation oxydative (hypothèse de Warburg<sup>28</sup>, voir section **1.4.2.5**). L'hyperglycémie associée au diabète pourrait ainsi faciliter la prolifération des cellules cancéreuses en leur fournissant une source supplémentaire d'énergie.
- Indépendamment des effets de l'insuline, l'obésité associée au diabète de type II pourrait activer d'autres voies métaboliques favorisant la prolifération des cellules cancéreuses. Les tissus adipeux sont des organes endocrines qui produisent plusieurs facteurs tels que le PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) et des cytokines IL-6 qui sont associées à la prolifération cancéreuse ainsi qu'à la suppression du système immunitaire<sup>29-30</sup>.

En parallèle, le rapport consensus de 2010 présente la metformine comme un potentiel agent thérapeutique associé à une diminution du risque de cancer.

## 1.2.2 Activité anticancéreuse de la metformine

Au début des années 2000, de plus en plus d'études sont publiées démontrant que la prise de metformine permet une réduction de l'incidence du cancer ainsi qu'un meilleur taux de survie après le pronostic chez les patients diabétiques traités par ce médicament. Evans *et al.* ont été les premiers à publier en 2005 une étude sur 11 876 patients atteints du diabète de type II qui indique une diminution du risque de cancer avec la prise de metformine<sup>31</sup>. Les études épidémiologiques subséquentes portent sur une grande variété de cancers : ovarien (Kumar *et al.*<sup>32</sup>), du sein (Hadad *et al.*<sup>33</sup>), de la prostate (He *et al.*<sup>34</sup>), colorectal (Hosono *et al.*<sup>35</sup>), hépatique et pancréatique (Lee *et al.*<sup>24</sup>), et les exemples sont nombreux. Une étude rétrospective de Currie *et al.*<sup>36</sup> sur 120 000 patients en 2012 associe la monothérapie à la metformine à un taux de survie plus élevé chez les patients, comparativement à d'autres traitements du diabète mais également lorsque comparé à la population non diabétique en général.

Suivant ces études épidémiologiques, des études *in vitro* ont permis de confirmer l'effet antinéoplasique de la metformine<sup>37-38</sup>. Queiroz *et al.* ont démontré en 2014 une inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses du sein MCF-7 en présence de 10 mM de metformine, inhibition causée par l'arrêt de la division cellulaire et l'apoptose des cellules<sup>39</sup>. Des résultats similaires furent également rapportés pour le cancer du rein (30% d'inhibition à 5 mM de metformine)<sup>40</sup>, de la prostate (50% d'inhibition à 5 mM)<sup>41</sup>, de l'endomètre (40% d'inhibition à 5 mM)<sup>42</sup> et du pancréas (40% d'inhibition à 5 mM)<sup>43</sup>.

Certaines de ces études ont aussi souligné un effet de la metformine sur la prolifération des cellules souches cancéreuses (CSC), vus par plusieurs comme étant une cible de choix pour empêcher la tumorigénèse<sup>44</sup>. Possédant des caractéristiques similaires aux cellules souches saines, les CSC s'auto-régénèrent et prolifèrent en cellules cancéreuses qui contribuent à la croissance de la tumeur. Encore en débat dans la littérature, des études auraient démontré que les cellules cancéreuses en elles-mêmes ne seraient pas responsables de la croissance des tumeurs et que seules les cellules cancéreuses souches, présentes en très faibles proportions, seraient capables de tumorigénèse<sup>45</sup>. Malheureusement, une des caractéristiques de ces cellules est une prolifération lente alors que beaucoup de chimiothérapies actuelles ciblent les cellules à

prolifération rapide. On voit alors une diminution de la taille des tumeurs et une apparence de rémission chez les patients cancéreux, mais la survie des cellules cancéreuses souches augmente les possibilités de rechute et de développement de métastases (**fig. 1.9**). Cibler ces cellules avec la metformine serait alors un avantage non négligeable dans le cadre d'une thérapie<sup>38</sup>.

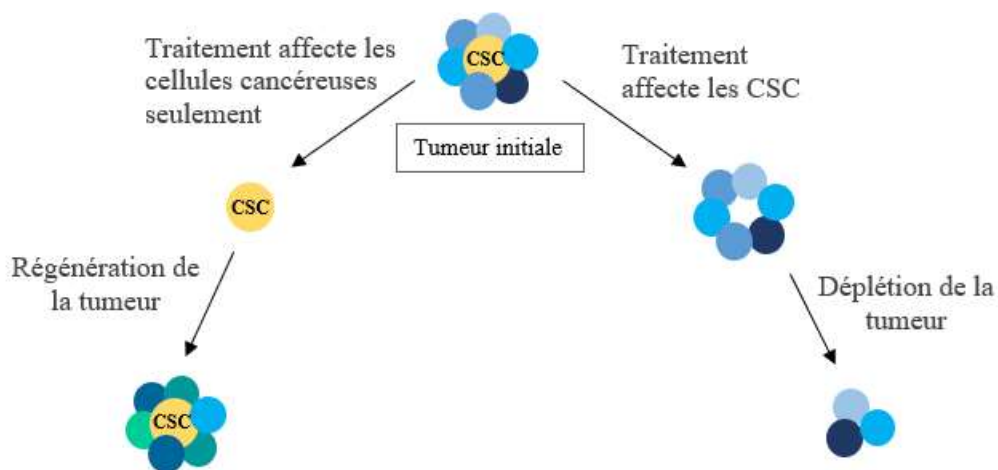


Figure 1.9 Mécanisme anticancéreux sur les cellules cancéreuses souches

De façon très intéressante, les concentrations de metformine rapportées pour la mort des CSC sont beaucoup plus faibles que pour l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses. Hirsh *et al.* indiquent ainsi une diminution importante du nombre de sphères tumorales pour quatre lignées de cancer du sein avec aussi peu que 0.1 mM de metformine<sup>46</sup>. En combinaison avec la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique couramment utilisé, la prise de metformine permet la réduction de la masse tumorale et diminue le risque de rechutes beaucoup plus efficacement que ces deux agents en monothérapie. Dans une publication subséquente, les auteurs rapportent des résultats similaires sur la prévention des métastases de la prostate et des poumons, une autre évidence de l'action de la metformine sur les CSC<sup>47</sup>.

Enfin, plusieurs modèles *in vivo* ont été utilisés pour évaluer l'effet de la metformine. Entre autres, Kisfalvi *et al.* ont rapporté une diminution de 80% du volume de xénogreffes du cancer du pancréas avec des injections intrapéritonéales de 200 mg/kg/jour<sup>48</sup>. Il fut aussi



démontré que la metformine cible l'angiogenèse (la formation de nouveaux vaisseaux sanguins) dans les tumeurs de cancer du sein, des poumons et de l'ovaire à des concentrations de 100 à 200 mg/kg/jour<sup>49-50</sup>. Plusieurs autres articles indiquent des effets anticancéreux intéressants en combinaison avec d'autres agents comme la doxorubicine et le cisplatine<sup>51</sup> ainsi que sur des modèles orthotopiques<sup>48</sup> (développement de la tumeur dans l'organe directement versus l'introduction de la xéno greffe sous la peau de la souris).

Malgré les études extensives sur les effets *in vivo* et *in vitro* présentées dans la littérature, le mécanisme d'action moléculaire de la metformine sur le cancer reste incertain, en partie à cause de la complexité de la maladie mais aussi parce qu'il semble y avoir plusieurs modes d'action sur des cibles variées.

### **1.2.3 Mécanismes d'action de la metformine**

Il existe deux mécanismes principaux répertoriés, direct et indirect, les deux visant la cible de la rapamycine chez les mammifères (*mammalian target of rapamycine*, mTOR)<sup>52</sup>. Cette kinase est responsable de la croissance et de la prolifération cellulaire, la survie de la cellule, la synthèse de protéines et l'autophagie. La suractivation de mTOR est liée à l'initiation et au développement de tumeurs dans plusieurs types de cancers<sup>53</sup>. La première voie directe d'action passe par une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale menant à l'activation de la kinase de protéine activée par l'adénosine monophosphate (*AMP-activated protein kinase*, AMPK), alors que la voie indirecte implique la diminution du taux d'insuline dans le sang.

#### **1.2.3.1 Mécanisme direct par activation de l'AMPK**

Un des effets les plus reconnus de la metformine est l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le complexe I (ou la déshydrogénase du NADH) est localisé dans la membrane interne de la mitochondrie et catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone Q, permettant ultimement le transfert de quatre ions H<sup>+</sup> dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Cette étape est la première de la chaîne respiratoire

mitochondriale permettant la génération d'un gradient de protons à travers la membrane, plus tard utilisé par le complexe V dans la phosphorylation oxydative pour la génération de l'adénosine triphosphate (ATP) (la chaîne respiratoire est détaillée dans la section **1.4.2.6**)

La génération de l'ATP à l'intérieur de la mitochondrie est associée à un potentiel transmembranaire mitochondrial négatif de -150 à -180 mV qui est beaucoup plus important que celui de la membrane cellulaire, situé entre -40 et -80 mV. Ce potentiel membranaire plus fort attire les cations intracellulaires vers les mitochondries<sup>54</sup>. Il fut ainsi suggéré que la metformine, un cation à pH physiologique, s'accumule dans la mitochondrie où elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire<sup>55-56</sup>. Il n'est toutefois pas encore déterminé comment la metformine se lie au complexe I, ou même si cette inhibition représente la conséquence d'une autre voie métabolique. Tout de même, un des premiers effets de cette inhibition est la génération de stress métabolique dans la cellule qui augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), provoquant des lésions à l'ADN et induisant l'apoptose des cellules<sup>57</sup> (**fig. 1.10, étiquette #1**).

Un deuxième effet de cette inhibition du complexe I est une augmentation du ratio AMP/ATP puisque la chaîne respiratoire n'arrive plus à produire des quantités normales d'ATP. Ce faisant, la cellule se retrouve en manque d'énergie et active la kinase de l'AMP (AMPK), un senseur d'énergie cellulaire, qui agit en limitant les voies anaboliques énergivores tout en activant des voies cataboliques responsables de la production d'énergie, comme la glycolyse<sup>58</sup>. AMPK est le régulateur de nombreuses voies métaboliques, dont celle de la mTOR, qu'elle inhibe à travers la phosphorylation de l'agent suppresseur de tumeurs TSC1/2 (**fig. 1.10, étiquette #2**)<sup>59</sup>. L'AMPK active en parallèle l'agent suppresseur de tumeurs p53 qui promeut l'apoptose et l'autophagie tout en inhibant la production de cycline D, un régulateur de la division cellulaire (**fig. 1.10, étiquette #3**)<sup>41, 60</sup>. Elle inhibe aussi la carboxylase de l'acétyl-CoA (ACC) et la synthase d'acide gras (*fatty acid synthase*, FASN), empêchant ainsi la lipogenèse qui est un processus crucial pour la prolifération des cellules cancéreuses (**fig. 1.10, étiquette #4**)<sup>61</sup>. Enfin, l'AMPK active des voies anti-inflammatoires et anti-angiogénèse en inhibant le NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) et l'HIF-1α (*hypoxia inducible factor-1-alpha*). Ces voies diminuent à leur tour la production de cytokines inflammatoires, la production du facteur de croissance endothélial vasculaire (*vascular*

*endothelial growth factor*, VEGF) et surtout la sécrétion d'interleukine 8 (CXCL8), relié à la croissance et la progression du cancer (**fig. 1.10, étiquette #5**)<sup>62</sup>.

### 1.2.3.2 Mécanisme indirect par la diminution de I/IGF

La résistance à l'insuline (I) est une caractéristique bien connue et étudiée du diabète de type II, ayant pour conséquence une augmentation de son niveau sanguin et des facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (IGF) dans le sang. Un des mécanismes proposés pour le lien entre le diabète et le cancer (mentionné plus haut) implique une activation du récepteur d'insuline IRS1, qui active la voie signalétique de la phosphoinositide-3-kinase (P13K/Akt), responsable de l'activation de mTOR<sup>63</sup>. Des essais cliniques en phase III ont même utilisé des anticorps spécifiques aux récepteurs IGF comme traitement pour le cancer, même si leur efficacité semble limitée<sup>64</sup>. La metformine, dont l'action souhaitée dans le traitement du diabète est de réduire le taux d'insuline dans le sang, pourrait ainsi inactiver les voies de signalisation de P13K/Akt/mTOR et avoir un effet anticancéreux (**fig. 1.10, étiquette #6**). Cette voie métabolique est aussi affectée par l'AMPK, qui inhibe indépendamment le récepteur d'insuline IRS1.

### 1.2.3.3 Mécanismes indépendants

Plusieurs autres mécanismes proposés dans la littérature pour l'action anticancéreuse de la metformine n'impliquent pas l'action de l'AMPK ou encore la diminution du ratio I/IGF dans le sang. Il fut ainsi démontré que la metformine inhibe mTOR en l'absence d'AMPK par l'inactivation des hydrolases de guanosine triphosphate (rag-GTPases)<sup>65</sup>, ou par une augmentation de l'expression du facteur de croissance REDD1 (*regulated in development and DNA damage response 1*) menant à l'inhibition de mTOR et de la prolifération cellulaire (**fig. 1.10, étiquette #7**)<sup>66</sup>.

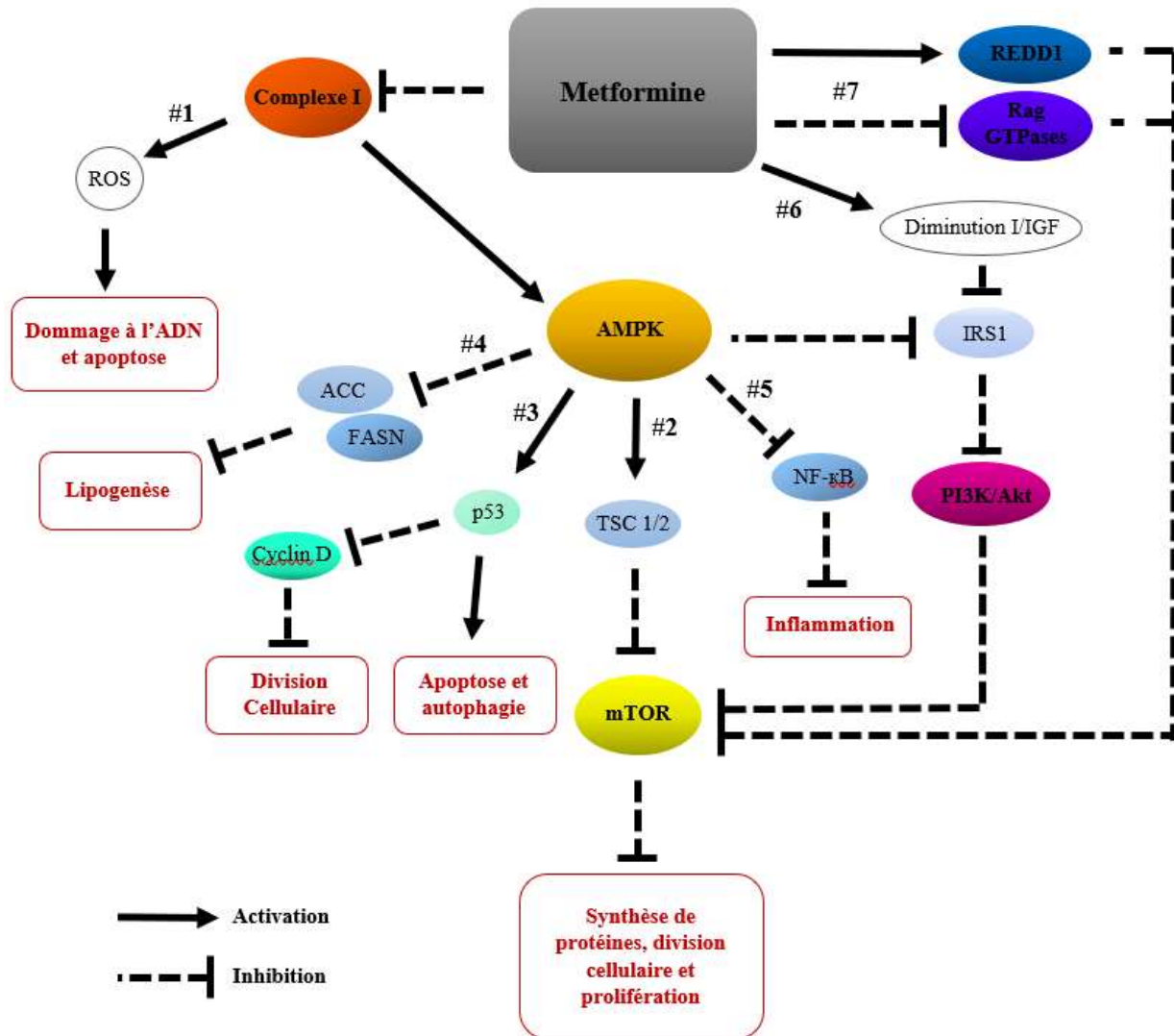


Figure 1.10 Résumé des différents mécanismes d'action cellulaire de la metformine<sup>38</sup>

### 1.2.4 Essais cliniques et limites de la metformine

Les résultats encourageants de la metformine sur le traitement du cancer, obtenus autant au niveau des nombreuses études épidémiologiques qu'au niveau des effets antinéoplasiques sur des modèles murins, ont rapidement mené à des études cliniques chez les humains. Contrairement aux études précédentes qui montraient l'effet préventif de la metformine après des traitements sur plusieurs années, ces nouvelles recherches se sont consacrées aux effets de

la metformine en tant qu'agent chimiothérapeutique. La première étude clinique en phase II (*randomized double blind clinical trial*) fut ainsi publiée en 2015 par Kordes *et al.* sur des patients atteints du cancer du pancréas. Cette étude visait à mesurer le taux de survie des patients lorsque traités avec la metformine à des doses conventionnelles antidiabétiques en combinaison avec la gemcitabine et l'erlotinib, deux agents couramment utilisés en chimiothérapie<sup>67</sup>. Les résultats furent pour le moins décevants : aucune différence statistique ne fut mesurée sur le taux général de survie des patients traités à la metformine versus les patients traités avec un placebo. Plusieurs autres études en sont arrivées à des conclusions similaires, comme dans le cas de l'étude clinique en phase II de Pujalte Martin *et al.* sur le cancer de la prostate métastatique<sup>121</sup>. Malgré les études précliniques suggérant une activité de la metformine sur ce type de cancer, sa combinaison avec le docetaxel n'a eu aucun bénéfice pour la survie des patients. La metformine fut aussi inefficace en étude clinique phase II sur le cancer du poumon en combinaison avec la chimio-radiothérapie<sup>122</sup>. Bien que d'autres études cliniques soient présentement en cours<sup>68</sup>, les études publiées présentement montrent dans une grande proportion que la prise de metformine n'offre aucun avantage au niveau de la progression du cancer, l'augmentation du niveau de vie des patients et l'amélioration de leur taux de survie.

Plusieurs facteurs sont mis en cause pour justifier l'inefficacité de la metformine dans ce type d'essai cliniques, alors que son efficacité *in vitro* et *in vivo* est indéniable. La metformine possède deux pKa de 2.8 et 11.5, ce qui en fait une espèce protonée à pH physiologique et un composé particulièrement hydrophile avec un logP de -1.43 (le logP représente le coefficient de partition d'un composé entre une fraction d'eau et d'octanol). L'hydrophilie d'un composé est particulièrement importante pour la pharmacocinétique et la biodisponibilité dans le corps. Pour traverser de façon passive les membranes cellulaires, un composé doit non seulement être soluble dans les milieux aqueux extra et intracellulaire mais doit également être capable de pénétrer dans la bicouche lipidique formant la membrane. Les paramètres de Ghose, une variante de la règle de cinq de Lipinski<sup>69</sup> utilisée pour prévoir l'efficacité d'un médicament dans le corps humain, indique que la valeur du logP pour un composé doit être compris entre - 0.4 et 5.6 pour une efficacité maximale<sup>70</sup>. La doxorubicine, par exemple, possède un logP de 1.27<sup>71</sup>. La metformine est donc trop hydrophile pour traverser de façon passive les membranes, ce qui diminue fortement sa biodisponibilité.

Pour pénétrer le milieu cellulaire, la metformine fait appel à des protéines transmembranaires, des transporteurs de cations organiques (OCT1, OCT2 et OCT3)<sup>72</sup>. Ces transporteurs sont non-spécifiques et sont exprimés dans de nombreux organes du corps, notamment le foie (OCT1-3), les intestins (OCT3), les reins (OCT2-3) et les poumons (OCT1-2-3)<sup>73</sup>. De plus, la metformine n'est pas métabolisée par le corps et possède une demi-vie de 1,74 à 7,3 h chez les humains, dépendamment des conditions. Il est donc prévisible qu'elle s'accumule (quoique relativement faiblement) dans l'estomac, le colon, les reins et le foie, des organes responsables de la digestion et sécrétion et exprimant en grandes quantités les OCT<sup>74</sup>. Toutefois, une étude de Wilcock *et al.*<sup>75</sup> fut réalisée sur des souris traitées avec des doses antidiabétiques de metformine (50 mg/kg/jour versus 30 mg/kg/jour chez l'humain). Les résultats montrent que même dans ces organes où l'accumulation est plus prononcée, la concentration de metformine n'excède pas 60  $\mu\text{M}$ , ce qui est très loin des doses antiprolifératives rapportées *in vitro* allant de 5 à 10 mM. Les concentrations standards de metformine dans le plasma des patients diabétiques traités à la metformine sont aux alentours de 10  $\mu\text{M}$ , avec des maximums mesurés de 40  $\mu\text{M}$ <sup>55</sup>. Il fut d'ailleurs démontré que des concentrations aussi basses de metformine n'étaient pas suffisantes pour activer l'AMPK *in vitro*<sup>76</sup>. La metformine semble donc trop hydrophile pour pouvoir s'accumuler dans le corps à une concentration suffisante pour montrer un effet chimiothérapeutique.

Les résultats obtenus chez les souris montrant une réduction de la taille des tumeurs s'expliquent en partie par l'utilisation de doses beaucoup plus élevées allant jusqu'à 350 mg/kg/jour<sup>77</sup>, ce qui représenterait chez l'humain une moyenne de 23 kg de metformine pris oralement. Les nombreuses études épidémiologiques chez l'humain, quant à elles, concernent presque toujours la prise de metformine à long terme (jusqu'à des dizaines d'années pour les patients diabétiques), ce qui pourrait favoriser l'accumulation de la drogue dans les cellules. Il faut toutefois noter que cette accumulation, en particulier dans les mitochondries, est encore débattue dans la littérature<sup>78</sup>. Enfin, il a été démontré que l'efficacité de la metformine sur les CSC est beaucoup plus grande que sur les cellules cancéreuses, avec une activité antiproliférative entre 100 et 300  $\mu\text{M}$ <sup>46</sup>, ce qui pourrait possiblement expliquer l'effet préventif de la metformine sur le cancer.

Même si les raisons derrière l'inactivité de la metformine dans les études cliniques ne sont pas encore totalement élucidées, il est évident que sa structure hydrophile lui confère un désavantage pour la biodisponibilité. Par conséquent, plusieurs études se sont tournées vers des structures alternatives comportant des biguanides et pouvant potentiellement pallier ce problème.

## 1.3 Amélioration de la biodisponibilité de la metformine

### 1.3.1 Méthodes de vectorisation

Au vu de la faible biodisponibilité de la metformine, plusieurs groupes se sont penchés sur des stratégies de vectorisation de ce médicament pour améliorer sa pénétration des membranes cellulaires. Ces méthodes utilisent généralement la formation de nano- ou microparticules qui encapsulent la metformine dans des systèmes chimiques très variés, comme les polymères, microsphères, micelles, liposomes, etc.<sup>79</sup>. L'un des avantages à utiliser de tels systèmes provient de l'effet d'augmentation de la perméabilité et de la rétention (*enhanced permeability and retention effect*, EPR), qui décrit une plus grande accumulation des particules ou macromolécules dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux<sup>80</sup>. Cet effet provient de la croissance accélérée et anarchique des vaisseaux sanguins dans les tumeurs, qui sont ainsi malformés et qui présentent une plus large fenestration entre les cellules endothéliales.

Plusieurs de ces systèmes combinent la metformine à un autre agent anticancéreux, comme dans le cas des particules polymérique de Zhao *et al.*<sup>81</sup>. Pour augmenter la pénétration de la metformine dans les cellules, les auteurs utilisent une combinaison d'un polymère de metformine avec de l'acide hyaluronique et un l'acide ribonucléique interférent (siRNA), le tout encapsulé dans des liposomes (des sphères de phospholipides) (**fig.1.11**). De telles nanoparticules combinent l'effet anticancéreux des biguanides et du siRNA du facteur de croissance VEGF, responsable de la formation des vaisseaux sanguins dans les tumeurs<sup>82</sup>. Li *et al.* ont également combiné l'effet de la metformine avec celui de la doxorubicine dans des liposomes<sup>83</sup>. La présence de la metformine permet de diminuer la respiration cellulaire des cellules cancéreuses, amenant ainsi une augmentation de la concentration en oxygène sur le site

de la tumeur. Cette modulation de l'environnement tumoral, habituellement hypoxique, permet une augmentation de l'efficacité de la doxorubicine.

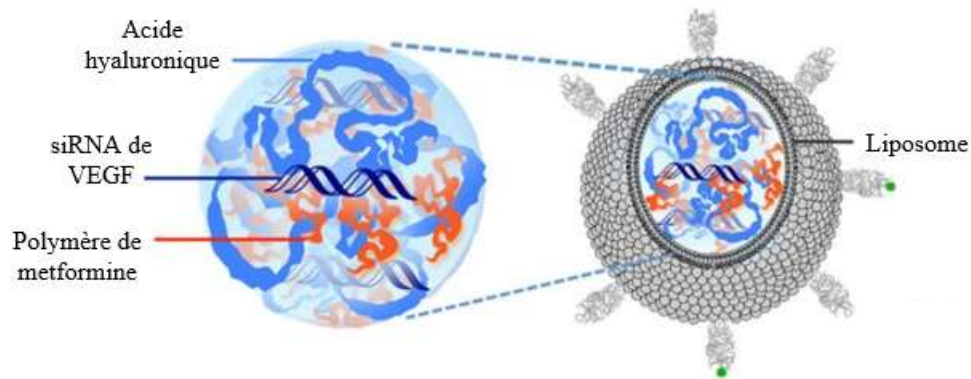


Figure 1.11 Liposomes de vectorisation d'un polymère de metformine de Zhao *et al.*

Enfin, un autre avantage de ces systèmes de vectorisation est la possibilité d'ajouter un élément de reconnaissance pour les cellules cancéreuses. Par exemple, Jiang *et al.* ont synthétisé des micelles de metformine-oléate et d'acide docosahexaénoïque enrobées de fucoidan<sup>84</sup>. Ce polysaccharide sulfoné possède une grande affinité pour la P-selectine, une molécule d'adhésion surexprimée dans les niches pré-métastatiques et facilitant l'adhésion des cellules cancéreuses. Les auteurs parviennent ainsi à cibler directement les environnements propices au développement de métastases dans les poumons de souris.



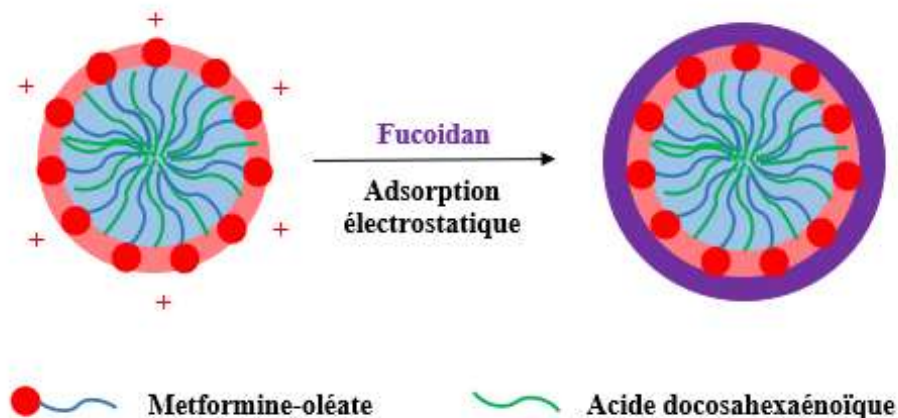


Figure 1.12 Micelles de vectorisation du metformine-oléate enrobées de fucoïdan de Jiang *et al.* Adapté avec la permission de la réf. 84. Copyright 2019 American Chemical Society

### 1.3.2 Nouvelles molécules inspirées de la metformine

Tandis qu'une partie des recherches s'intéressent au véhiculage de la metformine sous sa forme native, de plus en plus d'études se tournent vers des stratégies de synthèse pour obtenir des biguanides plus lipophiles et idéalement plus efficaces. Les premières structures dérivées de la metformine avec des applications anticancéreuses furent proposées dans un brevet de Aroles *et al.* en 2010. Celui-ci décrit une grande variété de structures comportant entre autres des chaînes carbonées, des substituants aryles ou des hétérocycles, et rapporte leur activité pour les cancers du pancréas, du sein, du colon et du poumon<sup>85</sup>. Malheureusement, aucune publication subséquente n'est présente dans la littérature pour décrire l'effet de ces substitutions sur l'activité anticancéreuse, la pénétration cellulaire ou le mode d'action. C'est aussi le cas du brevet déposé par Yang *et al.* décrivant des biguanides comportant une fonction ester et pyrazole avec différents substituants (**fig. 1.13**)<sup>86</sup>. Les auteurs rapportent toutefois dans leur brevet une efficacité jusqu'à 800 fois supérieure à la metformine sur des cellules cancéreuses de la vessie et des ovaires.

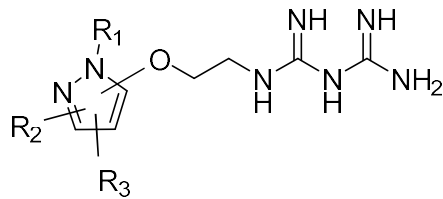


Figure 1.13 Biguanides-pyrazoles de Yang *et al.*<sup>86</sup>

Narise *et al.* ont investigué en 2014 treize analogues de la phenformine en introduisant d'une part des substituants alcool, méthyle, methoxy ou chlore sur le cycle aromatique, ou encore en substituant le biguanide par une fonction bioisostérique comme la guanidine, l'urée ou la thiourée (**fig. 1.14**)<sup>87</sup>. Les auteurs ont concentré leurs efforts sur la réponse adaptative des cellules dans le microenvironnement de la tumeur, caractérisé par une faible oxygénation et un manque de nutriments. Ils ont en particulier ciblé l'inhibition du facteur inductible d'hypoxie (HIF-1) et la réponse aux protéines non-repliées (*unfolded protein response*, UPR) et ont démontré que les analogues de la phenformine substitués par un méthyle ou un chlore étaient plus efficaces sur ces facteurs que la phenformine. De façon intéressante, ils ont aussi conclu que la version guanidine de leurs composés était tout aussi efficace que la phenformine alors que l'urée et la thiourée semblaient perdre toute leur activité.

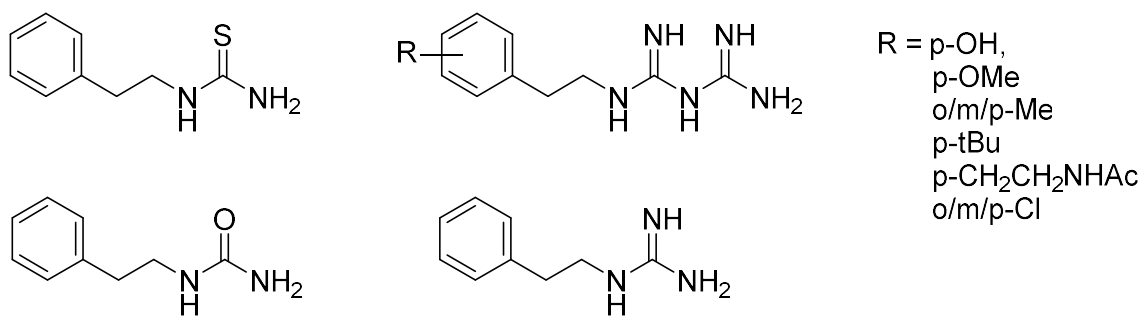


Figure 1.14 Analogues de la phenformine de Narise *et al.*<sup>87</sup>

Boukalova *et al.* ont quant à eux breveté en 2016 des biguanides substitués par un cation triphénylphosphonium (TPP<sup>+</sup>), une fonction servant au ciblage des mitochondries et reliée aux biguanides par une chaîne carbonée de longueur variable (**fig. 1.15**)<sup>88</sup>. Leurs travaux ont démontré que ces composés étaient de 100 à 1000 fois plus efficaces *in vitro* que la metformine sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses pancréatiques, causant également une diminution du taux d'ATP intracellulaire et une activation de l'AMPK. Les auteurs ont aussi étudié l'effet sur le potentiel mitochondrial en rapportant une large dissipation de celui-ci et la génération de ROS, responsables du moins en partie de l'apoptose induite dans les cellules cancéreuses.

Si ces nouvelles structures offrent des voies prometteuses pour de nouvelles applications dans le cancer, elles font toutefois partie de bibliothèques limitées, n'offrant que peu de variations sur les structures originales de la metformine et la phenformine. De plus, aucune de ces publications ne décrit en détail l'effet de ces nouvelles structures sur la pénétration et la perturbation membranaire, pourtant le plus grand facteur limitant identifié pour la metformine. C'est en se basant sur cette analyse que nous nous sommes intéressés à de nouveaux biguanides pouvant pénétrer et traverser les membranes cellulaires plus facilement.

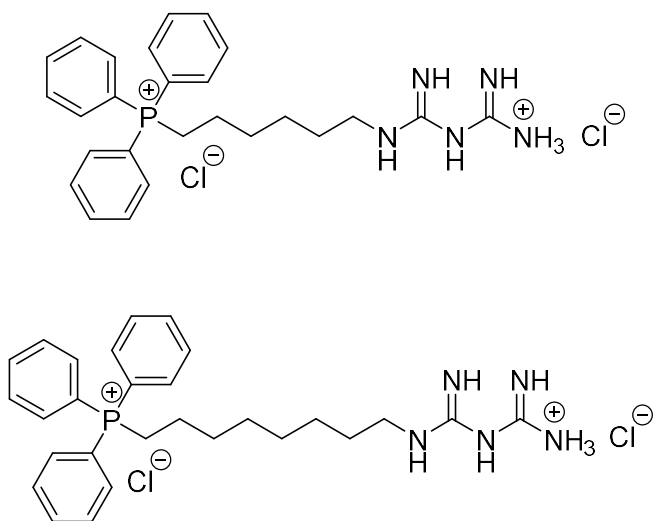


Figure 1.15 Biguanides-TPP<sup>+</sup> de Boukalova *et al.*<sup>88</sup>

### 1.3.3 Inspiration des transporteurs transmembranaires synthétiques

Bien qu'il ne soit que très peu rapporté pour les biguanides, l'interaction de petites molécules avec les membranes biologiques est un sujet très bien décrit dans la littérature. En effet, le domaine des transporteurs membranaires – avec la perspective de la chimie supramoléculaire - se spécialise dans la caractérisation de la perturbation des membranes par des composés simples. En s'insérant dans celles-ci, les composés peuvent transporter des ions ou des petits substrats d'une part et d'autre d'une bicouche lipidique alors qu'elle leur est habituellement imperméable.

Les travaux sur les transporteurs transmembranaires peuvent être très utiles pour identifier les paramètres pertinents à une meilleure pénétration cellulaire des biguanides. Notre groupe de recherche s'est ainsi intéressé aux propriétés de transport des sels d'imidazolium et benzimidazolium substitués par des groupes phényléthynylbenzyle (PEB) (**fig. 1.16**). Il fut démontré que ces transporteurs de chlorure cristallisent en forme de canaux grâce aux interactions aromatiques  $\pi$ - $\pi$  des bras PEB, ce qui fut proposé comme étant leur mode d'assemblage à l'intérieur des membranes lipidiques et leur mode d'action en tant que perturbateurs membranaires<sup>89</sup>. Ces travaux soulignent l'utilité du motif PEB pour l'auto-assemblage et l'insertion de petites molécules dans les membranes. En effet, l'introduction d'un deuxième bras PEB sur le motif benzimidazolium de ces transporteurs permet de presque doubler l'efficacité du transport d'ions chlorure. Cette propriété fut vérifiée sur une variété de structures qui possèdent toutes une grande facilité à perturber et perméabiliser les membranes biologiques<sup>90</sup>.

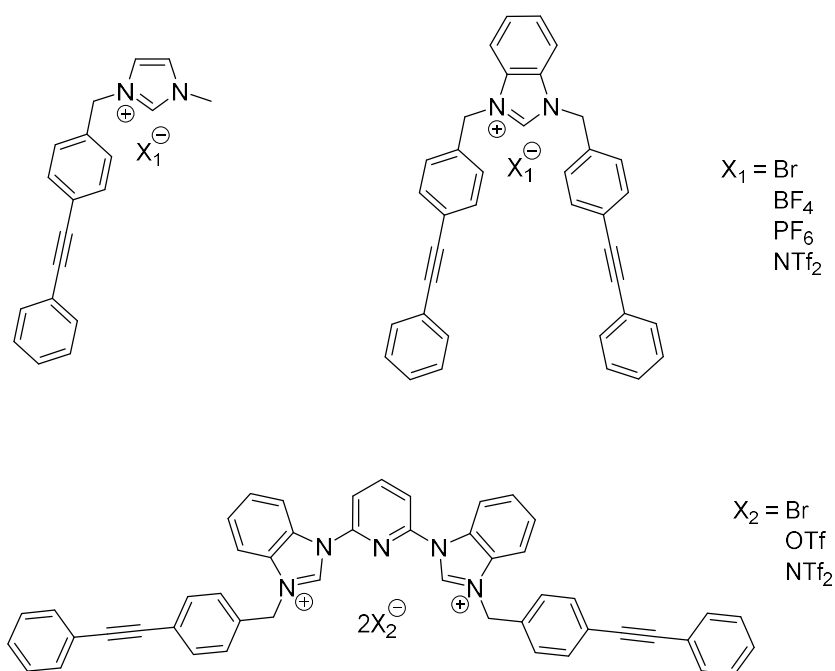


Figure 1.16 Transporteurs ioniques imidazolium-PEB et benzimidazolium-PEB<sup>89,90</sup>.

Ces travaux ont également montré l'importance de la nature du contre-ion des cations imidazolium ou benzimidazolium. En faisant varier le bromure avec des anions complexes comme le bistriflimide ( $\text{NTf}_2^-$ ), triflate ( $\text{TfO}^-$ ), perfluoroborate ( $\text{BF}_4^-$ ) ou hexafluorophosphate ( $\text{PF}_6^-$ ), l'efficacité du transport fut grandement influencée, démontrant ainsi l'effet du contre-ion sur la capacité d'insertion des molécules dans les membranes.

Notre groupe s'est aussi intéressé aux binaphtols fonctionnalisés par des cations imidazolium et à leurs propriétés de transport d'ions chlorure (**fig. 1.17a**)<sup>91</sup>. L'efficacité de ces transporteurs est modulée directement par la longueur de la chaîne alkyle attachée au cation imidazolium (de  $\text{CH}_3$  à  $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ ), et donc par l'hydrophobie du composé. Alors que les binaphtols les plus hydrophiles (i.e avec les chaînes courtes  $\text{CH}_3$  et  $\text{C}_4\text{H}_9$ ) se sont montrés incapables de transporter des ions chlorures, le binaphtol de longueur intermédiaire ( $\text{C}_8\text{H}_{17}$ ) s'est montré beaucoup plus efficace que ceux à longues chaînes ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$  et  $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ ). Ces travaux soulignent l'importance de l'amphiphilie pour un transporteur, soit le fait de posséder à la fois une portion

hydrophile lui permettant de se solubiliser dans les milieux aqueux extra et intracellulaires et une portion hydrophobe pour se partitionner dans la membrane lipidique.

Ces travaux démontrent aussi l'importance de la géométrie dans la structure, puisque les binaphtols possédant les fonctions imidazoliums aux positions 6,6' (**fig 1.17b**) perdent une grande partie de leur efficacité comparé aux binaphtols substitué en positions 3,3' (**fig 1.17a**).

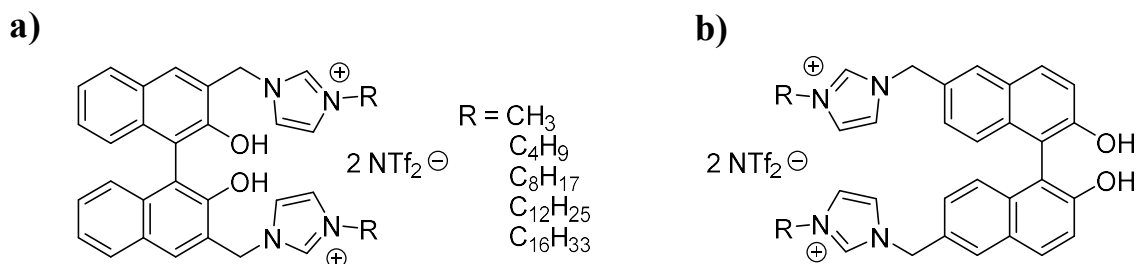


Figure 1.17 Transporteurs ioniques binaphtol-imidazolium<sup>91</sup>

Tous ces composés capables de s'insérer et d'altérer l'intégrité membranaire ont démontré des propriétés antibactériennes intéressantes. Celles-ci sont dues à un déséquilibre des charges ioniques par le transport d'ions chlorures et une dépolarisation de la membrane bactérienne, menant à la mort cellulaire. Toutefois, cette dépolarisation n'est pas sélective aux membranes bactériennes et a été observée sur plusieurs types de cellules, comme les globules rouges (*red blood cells*, RBC) et les cellules de rein embryonnaires humaines HEK293T<sup>92</sup>. Le manque de sélectivité associée aux transporteurs transmembranaires rend donc leur utilisation difficile dans l'optique d'un traitement sur les humains. La sélectivité est en effet d'une importance cruciale pour le développement de nouveaux médicaments, surtout lorsque celui-ci affecte des structures aussi universelles que les bicouches phospholipidiques. Pour cette raison, la prochaine section s'attardera aux membranes phospholipidiques et à leurs particularités dans différents organismes.

## 1.4 Les membranes biologiques

### 1.4.1 Utilités et fonctions des membranes

Les membranes biologiques sont des éléments essentiels à la survie des cellules, qui agissent comme barrière entre les milieux extra et intracellulaire, tout en délimitant les organelles. Ces membranes sont formées de différents phospholipides qui s'auto-assemblent en bicouche grâce aux ponts hydrogène des têtes polaires et l'effet hydrophobe des queues apolaires<sup>93</sup>. Les membranes cellulaires contiennent aussi plusieurs protéines qui sont soit intégrées dans la membrane elle-même ou simplement présentes à sa surface. La nature et la quantité de ces protéines dépend du type de membrane et de cellules et ont des fonctions très variées, tels que transporteurs transmembranaires, récepteurs intra et extracellulaires, enzymes, etc<sup>94</sup>. Enfin, on retrouve dans les membranes des oligosaccharides, responsables de la reconnaissance cellulaire et de la réponse immunitaire, du cholestérol, responsable de la fluidité membranaire, ainsi que des glycolipides, responsables de la stabilité de la membrane et de la reconnaissance cellulaire (**fig. 1.18**)<sup>94</sup>.

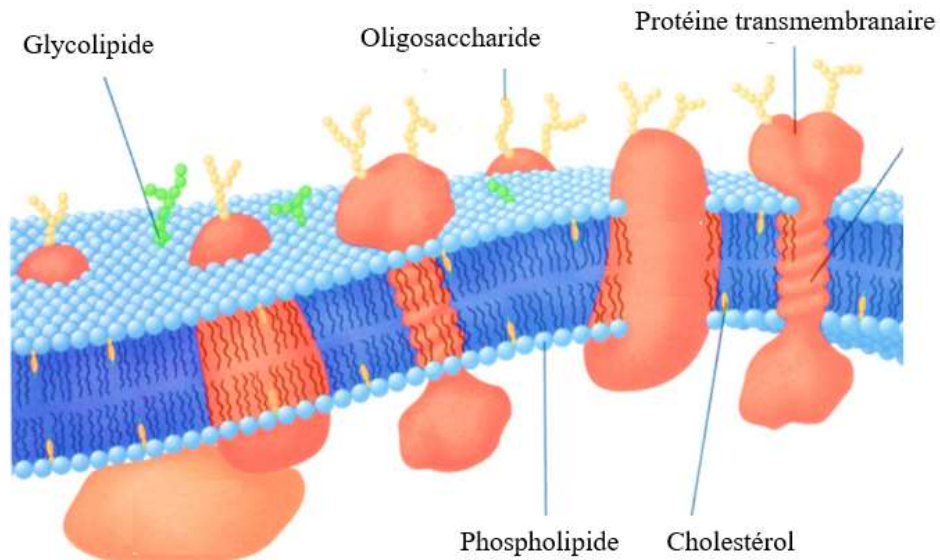


Figure 1.18 Membrane phospholipidique Figure adaptée de la réf. 94. En général, la bicouche lipidique est perméable aux petites molécules hydrophobes et aux gaz

(comme le CO<sub>2</sub> ou le O<sub>2</sub>) qui peuvent diffuser de façon passive en suivant le gradient de concentration. Dans le cas des autres éléments essentiels à la cellule tel que les ions (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> par exemple), les petites molécules chargées ou les macromolécules, des protéines de transport transmembranaire sont requises pour faciliter le passage de part et d'autre de la membrane. Les transporteurs transmembranaires peuvent agir soit par diffusion facilitée, comme pour les transporteurs OCT qui permettent la diffusion de la metformine selon son gradient de concentration, ou encore par transport actif, comme la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase qui transporte les deux ions contre leur gradient de concentration en utilisant l'ATP <sup>95</sup>.

La principale fonction de la membrane cellulaire est d'agir comme barrière sélective afin de contrôler ce qui peut ou ne peut pas pénétrer dans la cellule. Elle permet ainsi de ségréger le contenu de la cellule - ou des organelles - du milieu externe afin de lui conférer des fonctions particulières et de maintenir son homéostasie. Le transport contrôlé de substrats de part et d'autre de la membrane est donc un processus d'une grande importance. Un exemple de ceci est la génération du potentiel membranaire localisé de l'ordre de -40 à -80 mV qui sert à de nombreux phénomènes physiologiques, comme la génération de l'ATP dans la mitochondrie ou la transmission de signaux électriques dans les neurones<sup>94</sup>. Ce potentiel est généré uniquement par l'action de protéines transmembranaires qui travaillent contre le gradient de concentration pour accumuler les ions de chaque côté de la membrane. Le passage incontrôlé des ions amène rapidement à la dépolarisation de la membrane et dans plusieurs cas, la mort de la cellule. D'une façon similaire, le blocage du transport ionique peut aussi poser plusieurs problèmes. Le dysfonctionnement de protéines transmembranaires amène différentes maladies nommées canalopathies, dont des exemples bien connus sont la fibrose kystique, qui résulte du dysfonctionnement de canaux chlorures<sup>96</sup>, ou encore le syndrome de Bartter qui résulte d'un mauvais fonctionnement du cotransporteur Na-K-2Cl <sup>97</sup>.



## 1.4.2 Différents types de membranes

Les travaux présentés dans cette thèse se concentrent en partie sur l'effet des biguanides sur différents types de membranes. Les prochains paragraphes serviront à décrire les variétés de membranes étudiées et la pertinence de chacune dans ce projet.

### 1.4.2.1 Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules synthétiques composés d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Bien qu'on les retrouve de toute tailles et compositions, les liposomes utilisés dans cette thèse sont composés de phosphatidylcholine provenant de jaune d'œuf (*egg-yolk phosphatidylcholine*, EYPC) extrudé pour obtenir une taille uniforme de 100 nm avec une seule bicouche lipidique (**fig.1.19**)<sup>98</sup>. Bien qu'ils soient peu représentatifs de la complexité d'une membrane bactérienne ou cellulaire, l'utilisation des liposomes comporte plusieurs avantages. Par exemple, leur procédé de fabrication simple permet de choisir la composition de la solution interne, ce qui permet d'étudier le transport de différents ions. L'utilisation des liposomes permet aussi d'isoler un phénomène pour l'étudier sans l'interférence des processus biologiques complexes inhérents à un organisme vivant. Ils sont en général une bonne façon d'évaluer l'interaction de nouveaux composés avec les membranes biologiques et servent de premier filtre avant les expériences plus complexes.

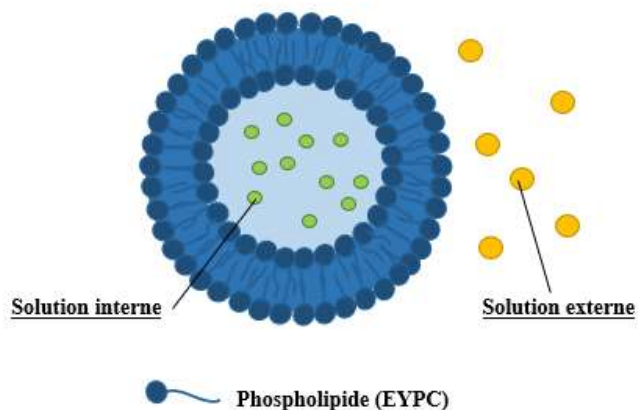


Figure 1.19 Structure d'un liposome

### 1.4.2.2 Les bactéries

Les bactéries font partie de la famille des procaryotes, qui sont des organismes unicellulaires ne possédant pas d'organelles délimitées<sup>94</sup>. Elles se divisent en deux catégories en fonction de leur membrane : les bactéries à Gram positif ont des membranes composées d'une seule bicouche lipidique entourée d'une épaisse couche de peptidoglycane, alors que les bactéries à Gram négatif ne contiennent qu'une mince couche de peptidoglycane entre deux bicouches de phospholipides (**fig. 1.20**)<sup>94</sup>. Parce que leur membrane est un peu plus simple et qu'elle ne possède qu'une seule bicouche lipidique, les bactéries à Gram positif sont plus facilement détruites par des composés altérant l'intégrité des membranes que les bactéries à Gram négatif<sup>99</sup>. De plus, ces dernières peuvent posséder des pompes à efflux dans leur membrane externe, des protéines transmembranaires qui servent à sortir les composés ayant diffusé passivement dans l'espace interstitiel<sup>100</sup>. Ce faisant, elles limitent encore plus l'accès à l'intérieur de la bactérie.

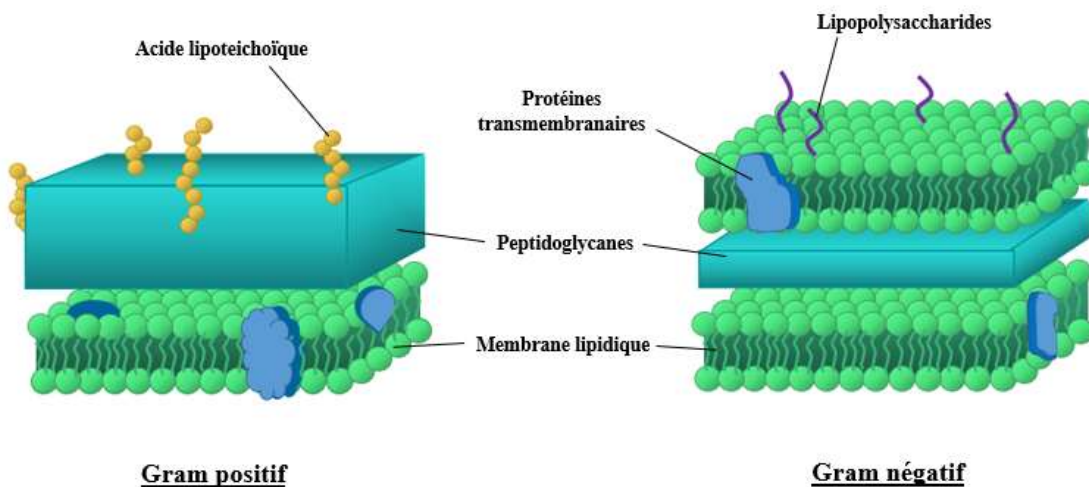


Figure 1.20 Structure de la membrane bactérienne <sup>94</sup>

Le développement de nouveaux composés antibactériens est devenu un enjeu majeur dans les dernières années, avec plus de 700 000 morts en 2018 attribuées à la résistance aux antibiotiques couramment utilisés<sup>101</sup>. De plus en plus alarmante, elle a pour cause la

surutilisation des antibiotiques en agriculture, leur prescription inappropriée et surabondante chez les humains ainsi qu'un faible développement de nouveaux antibiotiques<sup>102-103</sup>. Comme mentionné plus tôt, les biguanides comme la chlorhexidine sont connus comme étant d'excellents agents antibactériens qui peuvent disloquer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  de la membrane bactérienne, résultant en une augmentation de la rigidité membranaire et la perte de son intégrité<sup>104</sup>. Il est donc intéressant d'évaluer les propriétés antibactériennes de nouveaux biguanides, surtout considérant l'apparition de plus en plus commune de résistances à la chlorhexidine<sup>101</sup>.

Les bactéries sont aussi des modèles intéressants pour étudier l'effet de certains composés sur les membranes mitochondriales, et surtout sur la chaîne respiratoire. La théorie de la symbiogenèse propose en effet que les mitochondries des cellules eucaryotes aient été initialement des bactéries primitives, comme des protéobactéries, qui auraient été absorbées et auraient évolué pour devenir des organelles<sup>105</sup>. De ce fait, la chaîne respiratoire bactérienne possède plusieurs éléments en commun avec la chaîne respiratoire mitochondriale, en particulier au niveau de la première déshydrogénase : le complexe I dans la mitochondrie et le complexe NDH-1 dans la bactérie<sup>106</sup>. Comme les biguanides sont connus pour avoir un effet important sur le complexe I mitochondrial, l'évaluation des propriétés antibactériennes est aussi un moyen d'estimer l'effet anticancéreux potentiel des biguanides.

Enfin, les bactéries possèdent des membranes beaucoup plus complexes que les liposomes tout en offrant une certaine facilité et robustesse quant à leur manipulations. Ces caractéristiques en font des bons candidats pour évaluer plus en profondeur la cytotoxicité de certains composés, de même que des processus plus complexes comme la dépolarisation membranaire.

### 1.4.2.3 Les levures

Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires faisant partie de la famille des champignons. Alors qu'elles sont globalement utilisées par les humains dans les processus de fermentation et de cuisine, plusieurs levures sont aussi des pathogènes humains, comme le très commun *Candida albicans*<sup>107</sup>. Les membranes des levures sont composées principalement de phospholipides, glycosphingolipides et d'ergostérol, avec quelques variations selon les espèces

et la disponibilité des nutriments<sup>108</sup>. Des mécanismes de protection des membranes sont présents chez certaines espèces, en particulier pour les levures productrices d'éthanol qui doivent en tolérer des quantités habituellement dommageables pour les levures et bactéries<sup>109</sup>. Ces mécanismes sont toutefois encore peu élucidés.

Les levures sont robustes, manipulées facilement en laboratoire, et ont des problèmes de résistance similaires aux bactéries. Pour cette raison, nous avons décidé d'étudier l'effet des biguanides sur des levures pathogènes communes.

#### **1.4.2.4 Les globules rouges**

Les globules rouges sont des cellules eucaryotes qui servent à transporter l'oxygène dans les tissus par la circulation dans les capillaires sanguins. Dépourvus d'un noyau cellulaire et d'une majorité d'organelles, les globules rouges sont plutôt remplis d'hémoglobine, une métalloprotéine servant au transport de l'oxygène<sup>94</sup>. Ils sont donc considérés comme des sacs d'hémoglobine avec des parois composées d'une membrane phospholipidique. Celle-ci possède une composition qui permet un maximum de déformabilité et de stabilité lors du passage étroit dans les capillaires.

La rupture de la membrane cellulaire des globules rouges, l'hémolyse, est une indication non seulement de l'efficacité d'une molécule à perturber les membranes, mais aussi une indication de sa toxicité. Ce test est donc souvent utilisé comme première évaluation de la viabilité d'un composé en tant que médicament<sup>110</sup>.

#### **1.4.2.5 Les cellules cancéreuses**

Les cellules cancéreuses sont des cellules eucaryotes qui se divisent sans contrôle pour former des amas cellulaires, les tumeurs. Elles sont caractérisées par leur induction de l'angiogenèse (la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins), leur immortalité, leur résistance à la mort cellulaire et leur capacité à former des métastases<sup>111</sup>.

Les différences entre les cellules saines et cancéreuses sont nombreuses et complexes ; c'est pourquoi leurs différentes propriétés ainsi que les variations d'efficacité des traitements sont encore mal compris<sup>111</sup>. Certains mécanismes sont toutefois mieux élucidés que d'autres,

notamment au niveau de la différence de composition de leurs membranes cellulaires. Les variations dans la nature et proportion des phospholipides ainsi que la quantité de cholestérol dans les cellules cancéreuses (jusqu'à 50% d'augmentation dans les tumeurs<sup>112</sup>) sont associées à une diminution de la fluidité de la membrane<sup>113</sup>. Ce phénomène amène une diminution de la perméabilité de celle-ci et une résistance accrue aux traitements par chimiothérapie dues à la limitation de la pénétration des agents chimiothérapeutiques dans la cellule<sup>114</sup>. Il est donc anticipé que le développement de nouveaux composés ayant une insertion facilitée dans les membranes permet ainsi une plus grande activité anticancéreuse et un risque moins élevé de développement d'une résistance.

Une autre particularité des cellules cancéreuses est l'utilisation de la glycolyse de façon prédominante pour subvenir à leurs besoins énergétiques<sup>28</sup>. Surnommé *effet de Warburg*, ce mécanisme a longtemps été décrit comme l'unique source d'énergie des cellules cancéreuses, malgré la présence abondante d'oxygène et la possibilité de phosphorylation oxydative. Pour cette raison, il fut associé à un défaut des mitochondries, qui furent alors considérées comme de simples spectatrices de l'oncogenèse. On sait toutefois aujourd'hui que les mitochondries jouent un rôle clé dans plusieurs processus de la tumorigénèse et que le ciblage de celles-ci est une avenue prometteuse pour de nouveaux traitements anticancéreux<sup>115</sup>. La perméabilisation de la membrane mitochondriale est une cible particulièrement intéressante puisqu'elle permet le relargage de protéines apoptotiques, un processus clé de l'apoptose, qui se voit dérégulé dans les cellules cancéreuses<sup>116</sup>.

#### **1.4.2.6 Les mitochondries**

En plus de leur fonction principale en tant que productrices d'énergie pour la cellule, les mitochondries ont un rôle très important dans plusieurs fonctions métaboliques, comme la régulation du potentiel membranaire, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou, comme mentionné plus haut, l'induction de l'apoptose<sup>117-118</sup>. La mitochondrie est composée de deux membranes<sup>94</sup> ; la première, la membrane externe, est une membrane perméable aux petites molécules. La composition de l'espace intermembranaire est donc similaire à celle du cytosol. La deuxième, la membrane interne, est hautement imperméable et est le siège la chaîne

respiratoire mitochondriale, responsable de la production de l'ATP. Cette membrane est compartimentée en cristae, des invaginations de la membrane servant à en augmenter la surface et augmenter la production d'énergie par la mitochondrie.

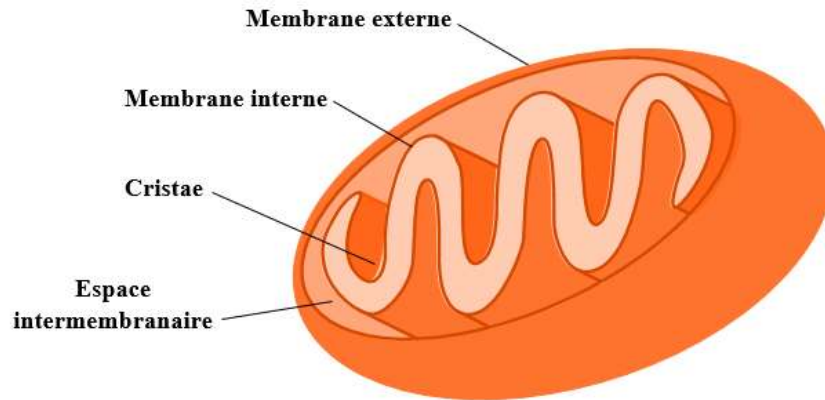


Figure 1.21 Structure de la mitochondrie <sup>94</sup>

La chaîne respiratoire<sup>94</sup> située dans la membrane interne est composée d'une série de protéines transmembranaires qui transfèrent des électrons d'un accepteur à un autre pour générer un gradient de protons à travers la membrane. Ce gradient est alors utilisé pour former une molécule d'ATP à partir de l'ADP, fournissant ainsi une source d'énergie à la cellule.

La première enzyme de la chaîne respiratoire, le complexe I ou la déshydrogénase du NADH, prend deux électrons du NADH pour les transférer à l'ubiquinone (**figure 1.22**, représentée par *Q*), qui est alors réduite à l'ubiquinol. Dans le processus, quatre protons sont transférés de l'autre côté de la membrane pour commencer à former un gradient. Le complexe II, la déshydrogénase de succinate, est une voie de transport d'électrons parallèle au complexe I qui transforme le succinate en fumarate. Cette réaction permet la réduction de l'ubiquinone comme le complexe I mais, contrairement à celui-ci, ne transfère pas de protons de l'autre côté de la membrane.

Le complexe III, ou cytochrome  $bc_1$ , transfère les électrons de l'ubiquinol vers cytochrome *c*, permettant le transport de quatre autres protons dans l'espace intermembranaire.

Le complexe IV sert alors à enlever quatre électrons au cytochrome c pour les transférer à l'oxygène, l'accepteur le plus électronégatif de la chaîne. Ce faisant deux molécules d'eau sont générées et deux protons supplémentaires sont ajoutés au gradient transmembranaire. Enfin, le complexe V – la synthase d'ATP – utilise le gradient de protons créé par la chaîne de transport d'électrons pour effectuer la phosphorylation de l'ADP en ATP.

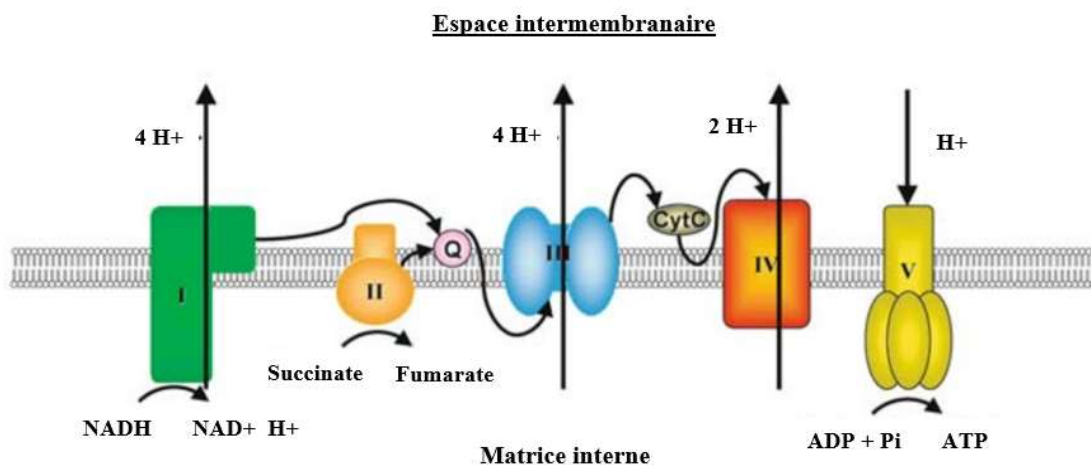


Figure 1.22 Chaîne de transport d'électron dans la mitochondrie <sup>119</sup>

C'est avec l'aide de ces différents modèles d'organismes et de membranes biologiques que nous avons étudié l'effet de nouveaux composés biguanides.

## 1.5 Description du projet de recherche

Dans les projets présentés dans cette thèse, nous nous sommes inspirés de nos connaissances en transport ionique afin de développer des biguanides possédant une meilleure pénétration dans les membranes cellulaires. Ayant comme but de synthétiser de nouveaux composés ayant des applications anticancéreuses, nous avons toutefois voulu trouver un équilibre entre l'insertion facilitée dans les cellules et la toxicité amenée par une perturbation trop importante de la membrane. Nos efforts se sont aussi concentrés sur l'étude du mode

d'action de ces nouveaux biguanides dans la cellule en comparaison avec les mécanismes proposés dans la littérature.

### **1.5.1 Perméabilisation et perturbation membranaire induite par des sels d'alkylbiguanidium**

Afin de mieux comprendre les paramètres inhérents à une meilleure pénétration des biguanides dans les cellules, nous avons dans un premier temps synthétisé des sels d'alkylbiguanidium avec des longueurs de chaînes carbonées variables. Nous avons par la suite étudié l'effet de ces composés simples sur la perturbation des membranes, soit par la perméabilisation, le transport d'ion chlorures et de protons et la dépolarisation membranaire sur des liposomes synthétiques. Ces propriétés furent aussi étudiées dans des organismes plus complexes, des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que des levures. Ces études nous ont permis de déterminer que les chaînes alkyles de longueur intermédiaire possédaient les meilleures capacités de perméabilisation membranaire, directement corrélables avec l'activité bactérienne et antifongique de ces composés. La toxicité de ces composés sur les globules rouges, bien que non significative aux concentrations pertinentes, montre toutefois que cette perturbation affecte également les cellules saines.

### **1.5.2 Biguanides substitués par le groupement phényléthynylbenzyle capables d'inhiber la croissance de tumeurs du cancer du pancréas**

Inspirés par nos travaux précédents sur les sels d'imidazolium- et benzimidazolium-PEB ainsi que les connaissances acquises avec les sels d'alkylbiguanidium, nous avons synthétisé des sels de PEB-biguanidium. Leur assemblage supramoléculaire leur permettent de pénétrer plus facilement les membranes que la metformine, sans les perturber aussi fortement que les analogues imidazoliums. Les propriétés de transport de protons et de dépolarisation membranaire de ces composés sont similaires mais moins importantes que celles des sels d'alkylbiguanidium, ce qui se traduit par une toxicité moindre. Ces nouveaux composés furent étudiés pour leur capacité à inhiber la croissance de cellules cancéreuses pancréatiques



(*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) et de sphères tumorales (CSC), ainsi que pour leur toxicité sur les fibroblastes sains et les globules rouges. Il fut remarqué que l'un d'entre eux était particulièrement efficace avec une activité 800 fois supérieure à la metformine, et ce composé fut utilisé dans des tests *in vivo* sur des xénogreffes du cancer du pancréas. De plus, le mécanisme d'action cellulaire de ce composé fut investigué en étudiant sa capacité d'inhibition de la respiration cellulaire, l'activation de l'AMPK ainsi que le changement de morphologie des mitochondries.

### **1.5.3 Propriétés antibactériennes et anticancéreuses de nouveaux sels de biguanidium**

Nos travaux précédents sur les transporteurs ioniques ont illustré l'importance de la structure moléculaire et du contre-ion pour l'assemblage, l'amphiphilie et la pénétration des structures dans les membranes. Nous avons ainsi généré une librairie de plusieurs biguanides dans le but d'identifier des composés anticancéreux et antibactériens plus efficaces que les sels de PEB-biguanidium. Ces composés furent testés non seulement au niveau de leur activité sur les cellules PDAC et les bactéries, mais aussi au niveau de leur toxicité sur les globules rouges et les cellules saines du pancréas. Certains des biguanides étudiés se sont ainsi montrés 10 000 fois plus efficaces pour l'inhibition de la croissance des PDAC que la metformine avec une grande sélectivité envers les cellules cancéreuses et une faible toxicité.

## 1.6 Références

1. Werner, E. A.; Bell, J., *J Chem Soc Trans* **1922**, 121 (0), 1790.
2. Weinberg, E. D., *Ann N Y Acad Sci* **1968**, 148 (3), 587.
3. Cheung, H. Y.; Wong, M. M.; Cheung, S. H.; Liang, L. Y.; Lam, Y. W.; Chiu, S. K., *PLoS One* **2012**, 7 (5), e36659.
4. Allen, M. J.; White, G. F.; Morby, A. P., *Microbiology* **2006**, 152 (Pt 4), 989.
5. Boggild, A. K.; Parise, M. E.; Lewis, L. S.; Kain, K. C., *Am J Trop Med Hyg* **2007**, 76 (2), 208.
6. Thapar, M. M.; Gupta, S.; Spindler, C.; Wernsdorfer, W. H.; Björkman, A., *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* **2003**, 97 (3), 331.
7. Alizadeh, A.; Khodaei, M. M.; Kordestani, D.; Fallah, A. H.; Beygzadeh, M., *Micropor Mesopor Mat* **2012**, 159, 9.
8. Gelbard, G.; Vielfaure-Joly, F., *Tetrahedron Lett* **1998**, 39 (18), 2743.
9. Akhavan, E.; Hemmati, S.; Hekmati, M.; Veisi, H., *New J Chem* **2018**, 42 (4), 2782.
10. Fortun, S.; Beauclair, P.; Schmitzer, A. R., *RSC Advances* **2017**, 7 (34), 21036.
11. Campbell, I. W., *Br J Diabetes Vasc Dis* **2016**, 7 (5), 247.
12. Stang, M.; Wysowski, D. K.; Butler-Jones, D., *Diabetes Care* **1999**, 22 (6), 925.
13. *clincalc.com*, Accessed 7 May 2019.
14. Bailey, C. J.; Turner, R. C., *N Engl J Med* **1996**, 334 (9), 574.
15. Ishikawa, T., Superbases for Organic Synthesis, *John Wiley & Sons publications* **2009**.
16. Bharatam, P. V.; Patel, D. S.; Iqbal, P., *J Med Chem* **2005**, 48 (24), 7615.
17. Langmaier, J.; Pizl, M.; Samec, Z.; Zalis, S., *J Phys Chem A* **2016**, 120 (37), 7344.
18. Suyama, T.; Soga, T.; Miyauchi, K., *Nippon Kagaku Kaishi* **1989**, (5), 884.
19. Lebel, O.; Maris, T.; Duval, H.; Wuest, J. D., *Can J Chem* **2005**, 83 (6-7), 615.
20. Mayer, S.; Daigle, D. M.; Brown, E. D.; Khatri, J.; Organ, M. G., *J Comb Chem* **2004**, 6 (5), 776.
21. Marble, A., *N Engl J Med* **1934**, 211 (8), 339.
22. Barone, B. B.; Yeh, H. C.; Snyder, C. F.; Peairs, K. S.; Stein, K. B.; Derr, R. L.; Wolff, A. C.; Brancati, F. L., *JAMA* **2008**, 300 (23), 2754.

23. Coughlin, S. S.; Calle, E. E.; Teras, L. R.; Petrelli, J.; Thun, M. J., *Am J Epidemiol* **2004**, *159* (12), 1160.
24. Lee, M. S.; Hsu, C. C.; Wahlqvist, M. L.; Tsai, H. N.; Chang, Y. H.; Huang, Y. C., *BMC Cancer* **2011**, *11*, 20.
25. Giovannucci, E.; Harlan, D. M.; Archer, M. C.; Bergenstal, R. M.; Gapstur, S. M.; Habel, L. A.; Pollak, M.; Regensteiner, J. G.; Yee, D., *CA Cancer J Clin* **2010**, *60* (4), 207.
26. Mardilovich, K.; Pankratz, S. L.; Shaw, L. M., *Cell Commun Signal* **2009**, *7*, 14.
27. Calle, E. E.; Kaaks, R., *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (8), 579.
28. Warburg, O., *Science* **1956**, *123* (3191), 309.
29. Ulisse, S.; Baldini, E.; Sorrenti, S.; D'Armiento, M., *Curr* **2009**, *9* (1), 32.
30. Yu, H.; Pardoll, D.; Jove, R., *Nat Rev Cancer* **2009**, *9* (11), 798.
31. Evans, J. M.; Donnelly, L. A.; Emslie-Smith, A. M.; Alessi, D. R.; Morris, A. D., *BMJ* **2005**, *330* (7503), 1304.
32. Kumar, S.; Meuter, A.; Thapa, P.; Langstraat, C.; Giri, S.; Chien, J.; Rattan, R.; Cliby, W.; Shridhar, V., *Cancer* **2013**, *119* (3), 555.
33. Hadad, S.; Iwamoto, T.; Jordan, L.; Purdie, C.; Bray, S.; Baker, L.; Jellema, G.; Deharo, S.; Hardie, D. G.; Pusztai, L.; Moulder-Thompson, S.; Dewar, J. A.; Thompson, A. M., *Breast Cancer Res Treat* **2011**, *128* (3), 783.
34. He, X. X.; Tu, S. M.; Lee, M. H.; Yeung, S. C., *Ann Oncol* **2011**, *22* (12), 2640.
35. Hosono, K.; Endo, H.; Takahashi, H.; Sugiyama, M.; Sakai, E.; Uchiyama, T.; Suzuki, K.; Iida, H.; Sakamoto, Y.; Yoneda, K.; Koide, T.; Tokoro, C.; Abe, Y.; Inamori, M.; Nakagama, H.; Nakajima, A., *Cancer Prev Res (Phila)* **2010**, *3* (9), 1077.
36. Currie, C. J.; Poole, C. D.; Jenkins-Jones, S.; Gale, E. A.; Johnson, J. A.; Morgan, C. L., *Diabetes Care* **2012**, *35* (2), 299.
37. Ben Sahra, I.; Le Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J. F.; Bost, F., *Mol Cancer Ther* **2010**, *9* (5), 1092.
38. Saini, N.; Yang, X., *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2018**, *50* (2), 133.
39. Queiroz, E. A.; Puukila, S.; Eichler, R.; Sampaio, S. C.; Forsyth, H. L.; Lees, S. J.; Barbosa, A. M.; Dekker, R. F.; Fortes, Z. B.; Khaper, N., *PLoS One* **2014**, *9* (5), e98207.
40. Xie, W.; Wang, L.; Sheng, H.; Qiu, J.; Zhang, D.; Zhang, L.; Yang, F.; Tang, D.; Zhang, K., *Med Sci Monit* **2017**, *23*, 29.

41. Ben Sahra, I.; Laurent, K.; Loubat, A.; Giorgetti-Peraldi, S.; Colosetti, P.; Auberger, P.; Tanti, J. F.; Le Marchand-Brustel, Y.; Bost, F., *Oncogene* **2008**, *27* (25), 3576.
42. Takahashi, A.; Kimura, F.; Yamanaka, A.; Takebayashi, A.; Kita, N.; Takahashi, K.; Murakami, T., *Cancer Cell Int* **2014**, *14*, 53.
43. Lonardo, E.; Cioffi, M.; Sancho, P.; Sanchez-Ripoll, Y.; Trabulo, S. M.; Dorado, J.; Balic, A.; Hidalgo, M.; Heeschen, C., *PLoS One* **2013**, *8* (10), e76518.
44. Dominik Kuhlmann, J.; Hein, L.; Kurth, I.; Wimberger, P.; Dubrovskaja, A., *Anticancer Agents Med Chem* **2015**, *16* (1), 38.
45. Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L., *Nature* **2001**, *414* (6859), 105.
46. Hirsch, H. A.; Iliopoulos, D.; Tsiachlis, P. N.; Struhl, K., *Cancer Res* **2009**, *69* (19), 7507.
47. Iliopoulos, D.; Hirsch, H. A.; Struhl, K., *Cancer Res* **2011**, *71* (9), 3196.
48. Kisfalvi, K.; Moro, A.; Sinnott-Smith, J.; Eibl, G.; Rozengurt, E., *Pancreas* **2013**, *42* (5), 781.
49. Wang, J.; Li, G.; Wang, Y.; Tang, S.; Sun, X.; Feng, X.; Li, Y.; Bao, G.; Li, P.; Mao, X.; Wang, M.; Liu, P., *Oncotarget* **2015**, *6* (42), 44579.
50. Rattan, R.; Graham, R. P.; Maguire, J. L.; Giri, S.; Shridhar, V., *Neoplasia* **2011**, *13* (5), 483.
51. Wang, J.; Gao, Q.; Wang, D.; Wang, Z.; Hu, C., *Oncol Lett* **2015**, *10* (3), 1343.
52. Kezic, A.; Popovic, L.; Lalic, K., *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, 2640342.
53. Xu, K.; Liu, P.; Wei, W., *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1846* (2), 638.
54. Murphy, M. P., *Trends Biotechnol* **1997**, *15* (8), 326.
55. Owen, M. R.; Doran, E.; Halestrap, A. P., *Biochem J* **2000**, *348* (3), 607.
56. Cameron, A. R.; Logie, L.; Patel, K.; Erhardt, S.; Bacon, S.; Middleton, P.; Harthill, J.; Forteach, C.; Coats, J. T.; Kerr, C.; Curry, H.; Stewart, D.; Sakamoto, K.; Repiscak, P.; Paterson, M. J.; Hassinen, I.; McDougall, G.; Rena, G., *Redox Biol* **2018**, *14*, 187.
57. Bridges, H. R.; Jones, A. J.; Pollak, M. N.; Hirst, J., *Biochem J* **2014**, *462* (3), 475.
58. Hardie, D. G.; Ross, F. A.; Hawley, S. A., *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13* (4), 251.
59. Yu, X.; Mao, W.; Zhai, Y.; Tong, C.; Liu, M.; Ma, L.; Yu, X.; Li, S., *Oncotarget* **2017**, *8* (3), 5619.
60. Pernicova, I.; Korbonits, M., *Nat Rev Endocrinol* **2014**, *10* (3), 143.

61. Vazquez-Martin, A.; Colomer, R.; Brunet, J.; Lupu, R.; Menendez, J. A., *Cell Prolif* **2008**, *41* (1), 59.
62. Rotondi, M.; Coperchini, F.; Pignatti, P.; Magri, F.; Chiovato, L., *J Clin Endocrinol Metab* **2015**, *100* (3), 427.
63. Clayton, P. E.; Banerjee, I.; Murray, P. G.; Renehan, A. G., *Nat Rev Endocrinol* **2011**, *7* (1), 11.
64. Pollak, M., *Nat Rev Cancer* **2012**, *12* (3), 159.
65. Kalender, A.; Selvaraj, A.; Kim, S. Y.; Gulati, P.; Brule, S.; Viollet, B.; Kemp, B. E.; Bardeesy, N.; Dennis, P.; Schlager, J. J.; Marette, A.; Kozma, S. C.; Thomas, G., *Cell Metab* **2010**, *11* (5), 390.
66. Ben Sahra, I.; Regazzetti, C.; Robert, G.; Laurent, K.; Le Marchand-Brustel, Y.; Auberger, P.; Tanti, J. F.; Giorgetti-Peraldi, S.; Bost, F., *Cancer Res* **2011**, *71* (13), 4366.
67. Kordes, S.; Pollak, M. N.; Zwinderman, A. H.; Mathôt, R. A.; Weterman, M. J.; Beeker, A.; Punt, C. J.; Richel, D. J.; Wilmink, J. W., *Lancet Oncol* **2015**, *16* (7), 839.
68. Chae, Y. K.; Arya, A.; Malecek, M. K.; Shin, D. S.; Carneiro, B.; Chandra, S.; Kaplan, J.; Kalyan, A.; Altman, J. K.; Plataniias, L.; Giles, F., *Oncotarget* **2016**, *7* (26), 40767.
69. Lipinski, C. A., *Drug Discov Today Technol* **2004**, *1* (4), 337.
70. Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J., *J Comb Chem* **1999**, *1* (1), 55.
71. Bodor, N.; Buchwald, P., *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *36* (2-3), 229.
72. Gong, L.; Goswami, S.; Giacomini, K. M.; Altman, R. B.; Klein, T. E., *Pharmacogenet Genomics* **2012**, *22* (11), 820.
73. Roth, M.; Obaidat, A.; Hagenbuch, B., *Br J Pharmacol* **2012**, *165* (5), 1260.
74. He, H.; Ke, R.; Lin, H.; Ying, Y.; Liu, D.; Luo, Z., *Cancer J* **2015**, *21* (2), 70.
75. Wilcock, C.; Bailey, C. J., *Xenobiotica* **1994**, *24* (1), 49.
76. Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-Melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N.; Musi, N.; Hirshman, M. F.; Goodyear, L. J.; Moller, D. E., *J Clin Invest* **2001**, *108* (8), 1167.
77. Wheaton, W. W.; Weinberg, S. E.; Hamanaka, R. B.; Soberanes, S.; Sullivan, L. B.; Anso, E.; Glasauer, A.; Dufour, E.; Mutlu, G. M.; Budigner, G. S.; Chandel, N. S., *Elife* **2014**, *3*, e02242.
78. Fontaine, E., *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 753.

79. Cetin, M.; Sahin, S., *Drug Deliv* **2016**, *23* (8), 2796.
80. Maeda, H., *Adv Enzym Regul* **2001**, *41* (1), 189.
81. Zhao, Y.; Wang, W.; Guo, S.; Wang, Y.; Miao, L.; Xiong, Y.; Huang, L., *Nat Commun* **2016**, *7*, 11822.
82. Phillips, R. J.; Mestas, J.; Gharaee-Kermani, M.; Burdick, M. D.; Sica, A.; Belperio, J. A.; Keane, M. P.; Strieter, R. M., *J Biol Chem* **2005**, *280* (23), 22473.
83. Li, Y.; Luo, J.; Lin, M. T.; Zhi, P.; Guo, W. W.; Han, M.; You, J.; Gao, J. Q., *Mol Pharm* **2019**.
84. Jiang, T.; Chen, L.; Huang, Y.; Wang, J.; Xu, M.; Zhou, S.; Gu, X.; Chen, Y.; Liang, K.; Pei, Y.; Song, Q.; Liu, S.; Ma, F.; Lu, H.; Gao, X.; Chen, J., *Nano Lett* **2019**, *19* (6), 3548.
85. Aroles, V.; Ballotti, R.; Rocchi, S.; Tomic, T., Biguanide compounds and its use for treating cancer. Patent US 20130059916 A1: 2013.
86. Yang, X., Zhou, S., Xu, S., Wang, Z., Deng, J., He, C., Xiao, D., Hu, X., Wu, J. Patent CN 109096194.
87. Narise, K.; Okuda, K.; Enomoto, Y.; Hirayama, T.; Nagasawa, H., *Drug Des Devel Ther* **2014**, *8*, 701.
88. Boukalova, S.; Stursa, J.; Werner, L.; Ezrova, Z.; Cerny, J.; Bezawork-Geleta, A.; Pecinova, A.; Dong, L.; Drahota, Z.; Neuzil, J., *Mol Cancer Ther* **2016**, *15* (12), 2875.
89. Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R., *Org Biomol Chem* **2013**, *11* (6), 923.
90. Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R., *J Med Chem* **2015**, *58* (5), 2358.
91. Vidal, M.; Schmitzer, A., *Chemistry* **2014**, *20* (32), 9998.
92. Vidal, M.; Elie, C.-R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R., *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5* (4), 436.
93. Israelachvili, J. N.; Marčelja, S.; Horn, R. G., *Q Rev Biophys* **2009**, *13* (2), 121.
94. Voet, D., Voet, J. G., Biochimie 2<sup>e</sup> édition, de Boeck, **2005**
95. Clausen, M. V.; Hilbers, F.; Poulsen, H., *Front Physiol* **2017**, *8*, 371.
96. O'Sullivan, B. P.; Freedman, S. D., *The Lancet* **2009**, *373* (9678), 1891.
97. Rodríguez-Soriano, J., *Pediat Nephrol* **1998**, *12* (4), 315.
98. Mozafari, M. R., *Cell Mol Biol Lett* **2005**, *10* (4), 711.

99. Heritage, J. E., E. G. V.; Killington, R. A. , *Introductory Microbiology, Cambridge University Press* **1996**.
100. Aono, R.; Tsukagoshi, N.; Yamamoto, M., *J Bacteriol* **1998**, *180* (4), 938.
101. Cieplik, F.; Jakubovics, N. S.; Buchalla, W.; Maisch, T.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A., *Front Microbiol* **2019**, *10*, 587.
102. Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M. I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M. H.; Nisar, M. A.; Alvi, R. F.; Aslam, M. A.; Qamar, M. U.; Salamat, M. K. F.; Baloch, Z., *Infect Drug Resist* **2018**, *11*, 1645.
103. Ventola, C. L., *P T* **2015**, *40* (4), 277.
104. Gilbert, P.; Moore, L. E., *J Appl Microbiol* **2005**, *99* (4), 703.
105. Andersson, S. G.; Zomorodipour, A.; Andersson, J. O.; Sicheritz-Ponten, T.; Alsmark, U. C.; Podowski, R. M.; Naslund, A. K.; Eriksson, A. S.; Winkler, H. H.; Kurland, C. G., *Nature* **1998**, *396* (6707), 133.
106. Kerscher, S.; Drose, S.; Zickermann, V.; Brandt, U., *Results Probl Cell Differ* **2008**, *45*, 185-222.
107. Kumamoto, C. A., *Curr Opin Microbiol* **2002**, *5* (6), 608.
108. Daum, G.; Lees, N. D.; Bard, M.; Dickson, R., *Yeast* **1998**, *14* (16), 1471.
109. Henderson, C. M.; Block, D. E., *Appl Environ Microbiol* **2014**, *80* (10), 2966.
110. Evans, B. C.; Nelson, C. E.; Yu, S. S.; Beavers, K. R.; Kim, A. J.; Li, H.; Nelson, H. M.; Giorgio, T. D.; Duvall, C. L., *J Vis Exp* **2013**, (73), e50166.
111. Zalba, S.; Ten Hagen, T. L., *Cancer Treat Rev* **2017**, *52*, 48.
112. Freeman, D. A.; Romero, A., *Biochem Pharmacol* **2003**, *66* (2), 307.
113. Hendrich, A.; Michalak, K., *Current Drug Targets* **2003**, *4* (1), 23.
114. Peetla, C.; Vijayaraghavalu, S.; Labhasetwar, V., *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, *65* (13-14), 1686.
115. Vyas, S.; Zaganjor, E.; Haigis, M. C., *Cell* **2016**, *166* (3), 555.
116. Fulda, S.; Galluzzi, L.; Kroemer, G., *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (6), 447.
117. Green, D. R., *Cell* **1998**, *94* (6), 695.
118. Li, X.; Fang, P.; Mai, J.; Choi, E. T.; Wang, H.; Yang, X. F., *J Hematol Oncol* **2013**, *6*, 19.

119. Cuperus, R.; Leen, R.; Tytgat, G. A.; Caron, H. N.; van Kuilenburg, A. B., *Cell Mol Life Sci* **2010**, *67* (5), 807.
120. Oule, M. K.; Azinwi, R.; Bernier, A. M.; Kablan, T.; Maupertuis, A. M.; Mauler, S.; Nevry, R. K.; Dembele, K.; Forbes, L.; Diop, L., *J Med Microbiol* **2008**, *57* (Pt 12), 1523.
121. Pujalte Martin, M.; Borchiellini, D.; Viotti, J.; Guillot, A.; Paoli, J. B.; Besson, D.; Hilgers, W.; El Kouri, C.; Cavaglione, G.; Priou, F.; Lharidon, T.; Largillier, R.; Deville, J.-L.; Hoch, B.; Schiappa, R.; Tanti, J. F.; Bost, F.; Ferrero, J.-M., *J Clinl Oncol* **2019**, *37* (15\_suppl), 5004-5004.
122. Tsakiridis, T.; Hu, C.; Skinner, H.D.; Santana-Davila, R.; Lu, B.; Erasmus, J.J.; Doemer, A.; Videtic, G.; Coster, J.; Yang, X.; Lee, R.; Werner-Wasik, M.; Schaner, P.E.; McCormack, S.; Esparaz, B.; McGarry, R.; Bazan, J.; Struve, T.; Bradley J., *J Clin Oncol* **2019**, *37*, (8502\_suppl)



# **Chapitre 2 : Perméabilisation et perturbation membranaire induite par des sels d'alkylbiguanidium**

## **2.1 Préface**

Lorsque nous avons commencé ce projet, très peu d'informations étaient présentées dans la littérature pour nous permettre de comprendre l'action des biguanides et des sels de biguanidium sur les membranes. Avant de commencer la synthèse de molécules plus complexes, nous nous sommes donc penchés sur l'étude des composés très simples, les sels d'alkylbiguanidium. Notre but en étudiant ces composés était de comprendre les paramètres requis pour faire pénétrer les sels de biguanidium plus facilement dans l'environnement hydrophobe de la membrane, et comment la perméabilisation de celle-ci allait influencer leurs propriétés biologiques. L'utilisation des chaînes alkyles simples comme groupements fonctionnels nous a permis d'isoler l'effet de l'hydrophobie sans que l'assemblage supramoléculaire de ces composés ne vienne modifier leur capacité d'insertion dans les bicouches lipidiques.

Ce chapitre présente ainsi la synthèse de sels d'alkylbiguanidium, ainsi que leurs propriétés de perméabilisation, de transport d'ions et de dépolarisation des membranes. Les propriétés antibactériennes ainsi que la toxicité hémolytique qui découlent de cette perturbation sont aussi décrites.

Ma contribution à l'article présenté dans ce chapitre a été l'élaboration du projet et des procédures, la totalité du travail expérimental ainsi que la rédaction de la première version du manuscrit. Le Dr. Maxime Parisotto et Prof. Gerardo Ferbeyre ont contribué à cet article dans l'élaboration du projet. La Prof. Andreea R. Schmitzer a assuré la supervision du projet, contribué à l'élaboration du projet et des procédures expérimentales, ainsi que la finalisation de la rédaction du manuscrit.

Les informations supplémentaires de cet article se trouvent en annexe à la page 128.

## 2.2 Concepts et méthodes utilisées

### 2.2.1 Transport d'ions

Afin d'étudier les propriétés de transport des sels d'alkylbiguanidium, nous avons utilisé deux essais très courants dans le domaine des transporteurs synthétiques. Le premier étudie le transport d'ions chlorures à travers la membrane de liposomes de EYPC et utilise la lucigénine comme sonde fluorescente (**fig. 2.1**), dont l'intensité de fluorescence est dépendante de la concentration en ions chlorures<sup>1</sup>. En encapsulant cette sonde dans des liposomes contenant une forte concentration en Cl<sup>-</sup>, la majorité de la fluorescence de la lucigénine est éteinte. L'ajout d'un transporteur d'ions actif dans la solution extravésiculaire permet de faire sortir les Cl<sup>-</sup> hors du liposome, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence de la lucigénine. Cette variation peut être suivie en temps réel pour obtenir la cinétique de transport ainsi que d'autres données pertinentes, tel que le EC<sub>50</sub> (concentration de transporteur nécessaire pour le transport de la moitié d'ions chlorures) ou le coefficient de Hill, qui décrit la coopérativité des molécules lors de ce processus<sup>2-3</sup>.

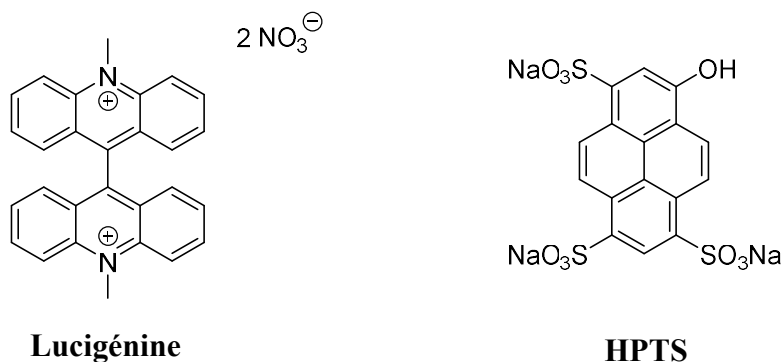


Figure 2.1 Sondes fluorescentes utilisées pour les études de transport d'ions

Le deuxième essai utilise le 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate de trisodium (HPTS) encapsulé d'une façon similaire dans des liposomes de EYPC (**fig. 2.1**)<sup>2</sup>. La sonde HPTS possède deux longueurs d'ondes d'excitation différentes, 403 nm pour sa forme protonée et 460 nm pour sa forme déprotonée, à la même longueur d'onde d'émission. Il est ainsi possible de

calculer le pH dans l'environnement de la sonde – soit l'intérieur du liposome – avec le rapport d'intensité de ces deux longueurs d'ondes selon la formule suivante :

$$pH = 7.3 - \log (I_{403 \text{ nm}}/I_{460 \text{ nm}})$$

Cette expérience permet de déterminer l'efficacité du transport d'ions  $H^+/OH^-$  par un composé ajouté au milieu extravésiculaire.

### 2.2.2 Dépolarisation des membranes

Le transport d'ions à travers une membrane biologique peut avoir de graves conséquences pour un organisme vivant, entre autres à cause de la dépolarisation de celle-ci. Afin de déterminer l'effet des sels alkybiguanidium sur le potentiel de membrane des liposomes, nous avons utilisé la safranine-O, une sonde fluorescente cationique et lipophile dont la fluorescence varie en fonction du potentiel de la membrane (**fig. 2.2**)<sup>4</sup>. Nous avons utilisé cette sonde dans un système de liposomes contenant des ions  $K^+$  et baignant dans une solution avec des ions  $Na^+$ . De cette manière, un petit potentiel membranaire est généré et la safranine-O est légèrement fluorescente au début de l'expérience. En ajoutant un composé capable de modifier ce potentiel, la fluorescence de la safranine-O change, ce qui permet de suivre par fluorescence les variations du potentiel membranaire.

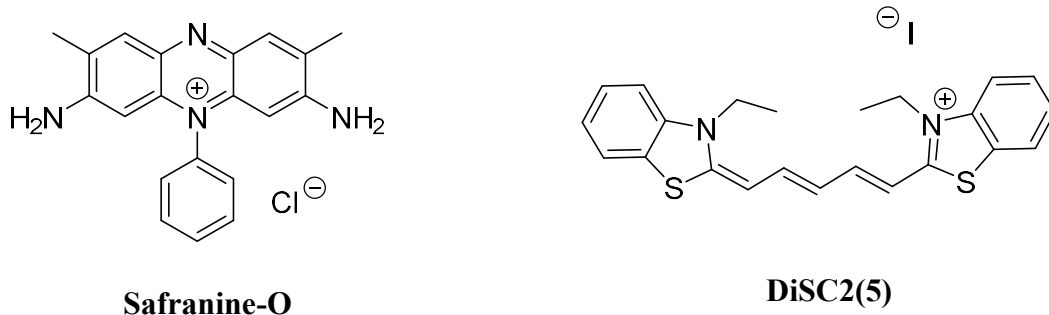


Figure 2.2 Sondes fluorescentes utilisées pour les études de dépolarisation

Une expérience très similaire fut utilisée sur des membranes bactériennes plus complexes<sup>5</sup>. Après avoir été retirées du milieu de croissance, des bactéries furent incubées avec la sonde iodure de 3,3'-diethylthiadicarbocyanine (DiSC2(5)) pour qu'elle s'incorpore dans leur membrane externe (**fig. 2.2**)<sup>6</sup>. La fluorescence de cette sonde est éteinte dans les membranes bactériennes polarisées mais augmente fortement lorsque ce potentiel est détruit. Encore une fois, cette expérience permet de suivre la cinétique de dépolarisation membranaire en temps réel.

### 2.2.3 Perméabilisation de la membrane bactérienne

Afin de déterminer l'effet des biguanides sur la perméabilisation des membranes bactériennes, nous avons utilisé des *E. coli* MG1655 exprimant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase dans le cytosol et baignant dans une solution d'*ortho*-nitrophényl- $\beta$ -galactoside (ONPG)<sup>7</sup>. L'ONPG est habituellement incapable de diffuser au travers des bicouches lipidiques, mais la présence d'agents perturbateurs de membranes lui permet de pénétrer à l'intérieur de la bactérie et de se faire hydrolyser dans le cytosol par la  $\beta$ -galactosidase en *ortho*-nitrophénolate (ONP), un composé coloré. En suivant l'absorbance de la solution par UV-vis à 420 nm, il est possible de suivre directement la perméabilisation de la membrane bactérienne par un agent perturbateur (**fig.2.3**).



Figure 2.3 Hydrolyse de l'ONPG lors de la perméabilisation de la membrane bactérienne

# Article 1: Membrane Permeabilization and Perturbation Induced by Alkylbiguanidium Salts

Audrey Hébert<sup>[a]</sup>, Maxime Parisotto<sup>[a]</sup>, Gerardo Ferbeyre<sup>[b]</sup>, and Andreea R.  
Schmitzer\*<sup>[a]</sup>

<sup>[a]</sup> Département de Chimie - Faculté des Arts et des Sciences, Université de Montréal, 2900  
Edouard Montpetit, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, H3C3J7, Québec, Canada. <sup>[b]</sup>

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire - Faculté de Médecine, Université de  
Montréal.

*Supramolecular Chemistry*, **2019**, *31*, 127-139

Adapted with minor corrections, with permission, from *Supramolecular Chemistry*, Audrey  
Hébert, Maxime Parisotto, Gerardo Ferbeyre and Andreea R. Schmitzer, "Membrane  
permeabilization and perturbation induced by alkylbiguanidium salts", **2019**, *31*, 127-139

## 2.3 Abstract

Alkylbiguanidium salts show membrane perturbing properties toward simple phospholipid bilayer (liposomes) and complex phospholipid membranes (bacterial membranes). Compared to metformin and phenformin, alkylbiguanidium salts induce a more significant permeabilization of the phospholipid membranes, leading to highly selective  $H^+/OH^-$  ion transport and subsequent depolarization of the membrane. Although alkylbiguanidium salts with shorter  $C_6$  and  $C_8$  chains are too hydrophilic to be inserted into the membrane and perturb it, those with  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ , and  $C_{16}$  alkyl chains show high membrane permeabilization and depolarization activity. In addition, the  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ , and  $C_{14}$  compounds possess interesting antimicrobial activity, and, at concentrations close to their minimal inhibitory concentrations, they show low hemolytic activity and toxicity.

## 2.4 Introduction

Biguanides in general, particularly *N,N*-dimethylbiguanide, commonly known as metformin (**fig. 2.4**), have been used worldwide for decades for the treatment of type-II diabetes and have recently drawn attention for their antitumorigenic effects. Pollak *et al.*<sup>8</sup> reported evidence of the antineoplastic activity of metformin, confirming a reduction of 37% in the incidence of certain types of cancer in diabetic patients treated with metformin.<sup>9</sup> Unfortunately, phase II clinical trials on patients with advanced pancreatic cancer treated with metformin did not show any improvement in their survival rate. The poor *in vivo* results were attributed to the high concentrations of metformin required (*in vitro* activity at millimolar concentrations), in addition to a low internalization rate and the need for accumulation.<sup>10</sup> Metformin, which has  $pK_a$ s of 2.8 and 11.5, is monoprotonated at physiological pH, very hydrophilic, and unable to permeate biological membranes through passive diffusion.<sup>11</sup> Recently, Tomic *et al.*<sup>12</sup> reported that alkyl and alkene-substituted biguanides and their salts have good antiproliferative activity for lung, breast, and pancreatic cancer cells. Unfortunately, no evidence of improved cell penetration and internal accumulation of these biguanide derivatives has been reported to date.

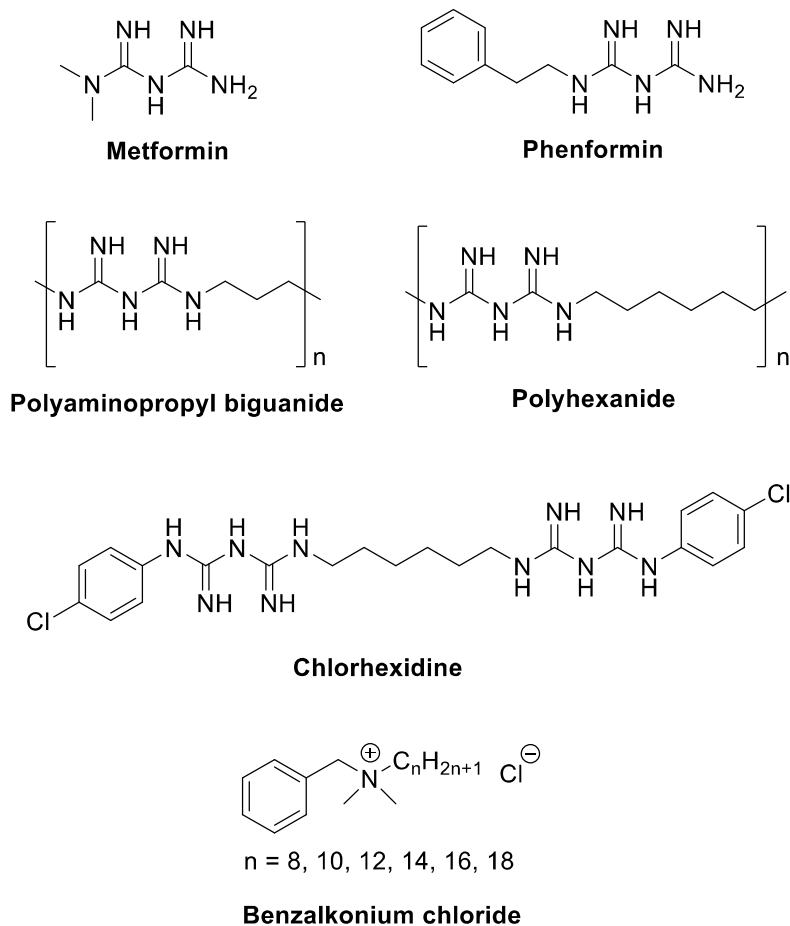


Figure 2.4 Structures of commercially available biguanides and benzalkonium chloride.

Alkylbiguanidium salts are expected to influence cellular membrane permeability because their structures are very similar to those of quaternary ammonium compounds (QACs), surfactants with membrane perturbing properties that are widely used as antibacterial agents.<sup>13</sup> The positively charged ammonium group of QACs interacts with the negatively charged phosphate groups of phospholipids, facilitating the insertion of the hydrophobic tail of the QAC into the bacterial membrane and the formation of transmembrane pores.<sup>14,15</sup> The resulting membrane lysis and bacterial death explain the use of these compounds since the 1930s as antibacterial agents in hospitals and industry. Possessing a similar structure, alkylbiguanidium salts can be expected to show important membrane disrupting properties and improved antibacterial activity compared to metformin. Additionally, when biguanide derivatives such as

chlorhexidine,<sup>15</sup> polyhexanide,<sup>15,16</sup> or polyaminopropyl biguanide<sup>15</sup> (**fig. 2.4**) are used as antibacterial agents, they superficially interact with bacterial membranes and displace membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , resulting in increased rigidity and loss of membrane structural integrity.<sup>15</sup> As commercially available QACs such as benzalkonium chloride (**BAC, figure 2.4**) have been linked to an increased expression of the membrane-affiliated efflux pump QacA in resistant bacteria,<sup>17</sup> new compounds are required to compensate for the development of bacterial resistance.

Thus, we wanted to address whether alkylbiguanidium salts act as membrane disruptors or membrane perturbators (through permeabilization, depolarization, or ion transport) and identify whether this effect can be correlated to their antibacterial activity. To address these questions, we synthesized simple alkylbiguanidium salts (**fig. 2.5**) possessing different alkyl chains and studied their interactions with model membranes, Gram-positive and Gram-negative bacteria, and yeast membranes.

## 2.5 Material and methods

### 2.5.1 General

All chemicals were purchased from Aldrich Chemicals in their highest purity and used without further purification. Deuterated dimethylsulfoxide ( $\text{DMSO-}d_6$ ) was purchased from CDN Isotopes. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400. Coupling constants are given in hertz (Hz) and chemical shifts are given in parts per million (ppm,  $\delta$ ) measured relative to the residual solvent (the multiplicity of the signals are given as s: singlet, d: doublet, t: triplet, and m: multiplet). High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific) triple quadrupole with accurate mass option instrument. (Université de Montréal Mass Spectrometry Facility). *L*- $\alpha$ -Phosphatidylcholine was purchased from Avanti Polar Lipids. Transport and depolarization studies were performed on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer. The antimicrobial (minimum inhibitory concentration (MIC) assays were performed on a Fluostar Optima plate reader. UV-vis permeabilization experiments



were performed on a Tecan Infinite M200 microplate reader. Bacterial cell lysis was carried out by sonication using a Branson sonicator (5 to 15 rounds of 30-s sonication until the optical density at 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) was equal to 0). The *Escherichia coli* (MG1655, DH5 $\alpha$  and SK037) and *Bacillus thuringiensis* (HD73) strains were provided by Prof. J. Pelletier, Chemistry Department, Université de Montréal. Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a Mobius Mobility Laser Photometer.

### 2.5.2 General procedure for the synthesis of alkylbiguanidium salts.

The alkylamine (1.19 mmol), dicyandiamide (1.19 mmol), and FeCl<sub>3</sub> (1.19 mmol) were dissolved in dioxane (1.19 mL, 1 M) and heated to 100 °C overnight. After the reaction had cooled down, HCl 12 M (0.3 mL) was added to the mixture and a white precipitate formed. The solid was filtered and washed with ethyl acetate to afford the alkylbiguanidium compounds (C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, and C<sub>16</sub>) as chloride salts (52% to 99% yields).

#### **1-Hexylbiguanidium chloride (2.1 - C<sub>6</sub>Cl)**

**Yield:** 99%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 0.86 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 9.0 Hz, 3H; CH<sub>3</sub>), 1.26 (s, 6H; (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1.49 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 3.18 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 5.7 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>), 7.35 (s, 1H; NH), 8.29 (s, 3H; NH), 8.87 (s, 1H; NH), 9.28 (s, 1H; NH).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 13.0 (CH<sub>3</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>), 26.1 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>), 152.4 (CNH), 155.2 (CNH).

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 186.17 (100) ([C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 187.17 (11) (M + H)<sup>+</sup>.

**Elemental analysis calcd (%) for [C<sub>14</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>] 2 HCl:** N = 20.46, C = 49.12, H = 9.72; found: N = 21.14, C = 47.28, H = 10.35.

### **1-Octylbiguanidium chloride (2.2 - C<sub>8</sub>Cl)**

**Yield:** 73%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 0.84 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 8.0 Hz, 3H; CH<sub>3</sub>), 1.24 (s, 10H; (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>), 1.50 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 3.19 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 7.50 (s, 1H; NH), 8.42 (s, 3H; NH), 8.97 (s, 1H; NH), 9.38 (s, 1H; NH).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 13.0 (CH<sub>3</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 28.9 ((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>), 152.4 (CNH), 155.2 (CNH).

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 214.20 (100) ([C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 215.20 (20) (M + H)<sup>+</sup>.

**Elemental analysis calcd (%)** for [C<sub>10</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub> 2 HCl: N = 23.02, C = 39.48, H = 8.94; found: N = 23.72, C = 39.03, H = 9.03.

### **1-Decylbiguanidium chloride (2.3 - C<sub>10</sub>Cl)**

**Yield:** 69%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 0.85 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 9.4 Hz, 3H; CH<sub>3</sub>), 1.19 (s, 14H; (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>), 1.49 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 3.15 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 5.9 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>), 7.27 (s, 1H; NH), 8.18 (s, 3H; NH), 8.77 (s, 1H; NH), 9.25 (s, 1H; NH).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 13.0 (CH<sub>3</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 27.5 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>), 152.4 (CNH), 155.2 (CNH).

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 242.20 (100) ([C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 243.20 (17) (M + H)<sup>+</sup>.

**Elemental analysis calcd (%)** for [C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>] 2 HCl H<sub>2</sub>O: N = 21.07, C = 43.37, H = 9.40; found: N = 22.27, C = 43.83, H = 9.92.

### **1-Dodecylbiguanidium chloride (2.4 - C<sub>12</sub>Cl)**

**Yield:** 82%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS *d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0.85 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 9.4 Hz, 3H; CH<sub>3</sub>), 1.25 (s, 18H; (CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>), 1.49 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 3.15 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 9.4 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>), 7.34 (s, 1H; NH), 8.17 (s, 3H; NH), 8.77 (s, 1H; NH), 9.27 (s, 1H; NH).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 15.2 (CH<sub>3</sub>), 23.4 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>), 30.3 ((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 30.4 (CH<sub>2</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>), 153.2 (CNH), 156.3 (CNH).

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 270.20 (100) ([C<sub>14</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 271.26 (25) (M + H)<sup>+</sup>.

**Elemental analysis calcd (%) for [C<sub>14</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>] 2 HCl:** N = 20.46, C = 49.12, H = 9.72; found: N = 21.14, C = 47.28, H = 10.35.

### **1-Tetradecylbiguanidium (2.5 - C<sub>14</sub>Cl)**

**Yield:** 52%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS *d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0.84 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 9.1 Hz, 3H; CH<sub>3</sub>), 1.23 (s, 22H ; (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>), 1.49 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 3.15 (d, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 6.2 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>), 7.17 (s, 1H; NH), 8.13 (s, 3H; NH), 8.73 (s, 1H; NH), 9.15 (s, 1H; NH).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 13.0 (CH<sub>3</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>), 27.5 (CH<sub>2</sub>), 28.9(CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>), 152.5 (CNH), 155.2 (CNH).

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 298.30 (100) ([C<sub>16</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 299.30 (20) (M + H)<sup>+</sup>.

**Elemental analysis calcd (%) for [C<sub>16</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>] 2 HCl H<sub>2</sub>O:** N = 16.48, C = 45.23, H = 9.49; found: N = 17.16, C = 45.82, H = 9.81.

### **1-Hexadecylbiguanidium (2.6 - C<sub>16</sub>Cl)**

**Yield:** 52%.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS *d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 0.85 (t, <sup>3</sup>*J*(H,H) = 8.9 Hz, 3H; CH<sub>3</sub>), 1.23 (s, 26H; (CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>), 1.49 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 3.15 (s, 2H; CH<sub>2</sub>), 7.25 (s, 1H; NH), 8.22 (s, 3H; NH), 8.80 (s, 1H; NH), 9.21 (s, 1H; NH).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 13.0 (CH<sub>3</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 27.5 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.4 ((CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 42.9(CH<sub>2</sub>), 152.4 (CNH), 155.2 (CNH).

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 326.32 (100) ([C<sub>18</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 327.33 (20) (M + H)<sup>+</sup>.

**Elemental analysis calcd (%)** for [C<sub>18</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>] 2 HCl H<sub>2</sub>O: N = 15.46, C = 47.73, H = 9.79; Found: N = 15.87, C = 46.73, H = 9.93.

### **2.5.3 Dynamic light scattering**

A 2 mL volume of a 25 mg/mL solution of egg-yolk phosphatidyl choline in chloroform (EYPC - purchased from Avanti Polar Lipids) was slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of the flask. Then, 1 mL of phosphate buffered saline (PBS buffer, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, adjusted to pH = 7.4) was added, and the resulting suspension was subjected to 10 freeze/thaw cycles (1 cycle = 1 min at -20 °C followed by 1 min at 37 °C). The mixture was extruded by loading the solution in the syringe of the extruder and passing it to another syringe through a 100-nm polycarbonate membrane 21 times. The liposome solution was then diluted to obtain a final concentration of 10 mM. To a plastic cuvette, 2 mL of ultrapure water, 20  $\mu$ L of the liposome solution, and the alkylbiguanidium salt in DMSO were added to yield a concentration of 10  $\mu$ g/mL or 100  $\mu$ g/mL, and the size of the liposomes in solution was measured<sup>20</sup>. The blank was realised with DMSO.

### **2.5.4 Lucigenin assay**

A 2 mL volume of a 25 mg/mL solution of EYPC in chloroform was slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of the flask. Then, 1 mL of a lucigenin solution (2 mM

lucigenin, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaCl) was added, and the resulting suspension was subjected to 10 freeze/thaw cycles (1 cycle = 1 min at -20 °C and 1 min at 37 °C). The mixture was extruded onto a 100-nm polycarbonate membrane 21 times and passed through a Sephadex G-25 column to remove the extravesicular lucigenin. The eluent used for the column was phosphate buffer with sodium chloride (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaCl), and the resulting liposome solution was diluted to obtain a final concentration of 10 mM (the progression of the vesicles on the column was followed by their residual absorbance and the product was assumed to have been completely recuperated after separation. For further precision, small volumes of eluting buffer were included in the recuperation before and after the eluted vesicles). To a quartz cuvette, 2.5 mL phosphate buffer with sodium nitrate (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaNO<sub>3</sub>) and 40 µL of liposome solution were added with light stirring ( $\lambda_{\text{ex.}} = 372 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 503 \text{ nm}$ ). At  $t = 50 \text{ s}$ , a solution of the alkylbiguanidium salt in methanol was added to the cuvette to obtain a 5 mM final solution (50 mol% relative to the concentration of EYPC)<sup>27</sup>. At  $t = 350 \text{ s}$ , Triton-X 10% v/v was added to lyse the liposomes. The fluorescence was monitored for 400 s.<sup>27</sup> The blank was realised with methanol, and controls were performed to ensure that the fluorescence of the probe was not directly affected by the presence of alkylbiguanidium salts.

### 2.5.5 HPTS assay

Here, 2 mL of a 25 mg/mL solution of EYPC in chloroform was slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of the flask. Then, 1 mL of a solution of the trisodium salt of 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) (1 mM HPTS, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) salt, and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4) was added, and the resulting suspension was subjected to 10 freeze/thaw cycles (1 cycle = 1 min at -20 °C and 1 min at 37 °C). The mixture was extruded onto a 100-nm polycarbonate membrane 21 times and passed through a Sephadex G-25 column to remove the extravesicular HPTS. HEPES buffer (10 mM HEPES and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4) was used as the eluent for the column (the progression of the vesicles on the column was followed by their residual absorbance and the product was assumed to have been completely recuperated after separation. For further precision, small volumes of eluting buffer were included in the recuperation before

and after the eluted vesicles). The resulting liposome solution was diluted to obtain a final concentration of 10 mM. To a quartz cuvette, 1.9 mL of HEPES buffer and 25  $\mu$ L of liposome solution were added with light stirring ( $\lambda_{\text{ex.}} = 405/450$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 510$  nm). At  $t = 50$  s, a solution of alkybiguanidium salt in methanol was added to obtain a 5 mM final concentration. At  $t = 300$  s, NaOH was added to obtain a 5 mM final concentration, and, at  $t = 350$  s, Triton-X 10% v/v was added to lyse the liposomes. The fluorescence was monitored for 600 s.<sup>26</sup> The blank was realised with methanol, and controls were performed to ensure that the fluorescence of the probe was not directly affected by the presence of alkybiguanidium salts.

### 2.5.6 Safranin-O assay

Here, 2 mL of a 25 mg/mL solution of EYPC in chloroform was slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of the flask. Then, 1 mL of HEPES buffer (10 mM HEPES salt, 100 mM KCl, adjusted to pH = 7.4) was added, and the resulting suspension was subjected to 10 freeze/thaw cycles (1 cycle = 1 min at -20 °C and 1 min at 37 °C). The mixture was extruded on a 100-nm polycarbonate membrane 21 times, and the resulting liposome solution was diluted to obtain a 10 mM final concentration. To a quartz cuvette, 1.9 mL of HEPES buffer with sodium chloride (10 mM HEPES salt and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4) and 100  $\mu$ L of liposome solution were added with light stirring. Safranin-O dye was added to a 60 nM final concentration ( $\lambda_{\text{ex.}} = 522$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 581$  nm). At  $t = 50$  s, a solution of alkybiguanidium salt in DMSO was added to obtain a 100  $\mu$ g/mL final solution in the cuvette, and the fluorescence was monitored for 300 s.<sup>32</sup> The blank was realised with DMSO, and controls were performed to ensure that the fluorescence of the probe was not directly affected by the presence of alkybiguanidium salts.

### 2.5.7 Bacterial membrane depolarization

A bacterial preculture was prepared by the inoculation of 1 mL of lysogeny broth (LB) with *E. coli* (DH5 $\alpha$  strain) or *B. thuringiensis* (HD73 strain). The preculture was incubated overnight at 37 °C with agitation and was then added to 75 mL of LB and incubated for 2 h at 37 °C with agitation. The culture broth was centrifuged at 1000 g for 10 min, rinsed twice with the buffer (20 mM glucose and 5 mM HEPES), and resuspended in glucose buffer to OD<sub>600nm</sub> = 0.15. The solution was incubated with 1  $\mu$ M 3,3'-diethylthiadicarbocyanine iodide dye (DISC<sub>25</sub>)

at 37 °C for 1 h. The experiment was carried out with 2.5 mL of bacterial solution in a quartz cuvette with light stirring ( $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$ ). The alkylbiguanidium salt in DMSO was added after 50 s, yielding a final concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>27</sup> The blank was realised with DMSO, and controls were performed to ensure that the fluorescence of the probe was not directly affected by the presence of alkylbiguanidium salts.

### 2.5.8 Bacterial growth and MIC determination

A bacterial preculture was prepared by the inoculation of 1 mL lysogeny broth (LB) with *E. coli* (DH5a or SK037) or *B. thuringiensis* (HD073). The preculture was incubated overnight at 37 °C with agitation and then added to 75 mL of LB and incubated for 2 h at 37 °C with agitation. The bacterial culture was then diluted in LB to  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.15$ . To each well of a 96-well plate, 5  $\mu\text{L}$  of alkylbiguanidium salt solution in DMSO with 195  $\mu\text{L}$  of bacterial culture were added. Plates were incubated at 37 °C with light agitation for 24 h and then analyzed by UV-vis spectroscopy. The MIC was considered the minimal concentration of alkylbiguanidium salt at which no bacterial growth was observed after 24 h. The blank was realised with DMSO. Each measurement was performed in triplicate in three different experiments.

### 2.5.9 Yeast growth and MIC determination

A yeast preculture was prepared by the inoculation of 1 mL YPDA (yeast, peptone, dextrose and adenine) broth with *Candida albicans* (SC5314) or *C. krusei* (UM680). The preculture was incubated overnight at 30 °C with agitation and then diluted in YPDA to  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.015$ . To each well of a 96-well plate, 5  $\mu\text{L}$  of alkylbiguanidium salt solution in DMSO with 195  $\mu\text{L}$  of yeast culture were added. The plates were incubated at 30 °C with light agitation for 24 h and then analyzed by UV-vis spectroscopy. The MIC was considered the minimal concentration of alkylbiguanidium salt at which no yeast growth was observed after 24 h. The blank was realised with DMSO. Each measurement was performed in triplicate in three different experiments.

### 2.5.10 Hemolytic activity

Red blood cells in Alsever's solution were centrifuged for 10 min at 300 g, washed 3 times with PBS buffer, and resuspended in PBS at 2% v/v. To each well of a 96-well plate, 195  $\mu$ L of red blood cell solution and 5  $\mu$ L of alkybiguanidium salt in DMSO were added, and the plate was incubated with light agitation for 1 h at 37 °C. The plate was then centrifuged for 10 min at 300 g, and 50  $\mu$ L of the supernatant solution of each well was transferred to another plate. Absorbance was measured at  $\lambda = 405$  nm.<sup>23</sup> The blank was realised with DMSO. Each measurement was performed in triplicate in three different experiments.

## 2.6 Results and discussion

### 2.6.1 Synthesis

The alkybiguanidium salts were synthesized following the procedure developed by Suyama *et al.* starting with the corresponding alkylamine and dicyandiamide (**fig. 2.5**).<sup>18a</sup> All alkybiguanidium salts were obtained as doubly protonated chloride salts.<sup>11b</sup>

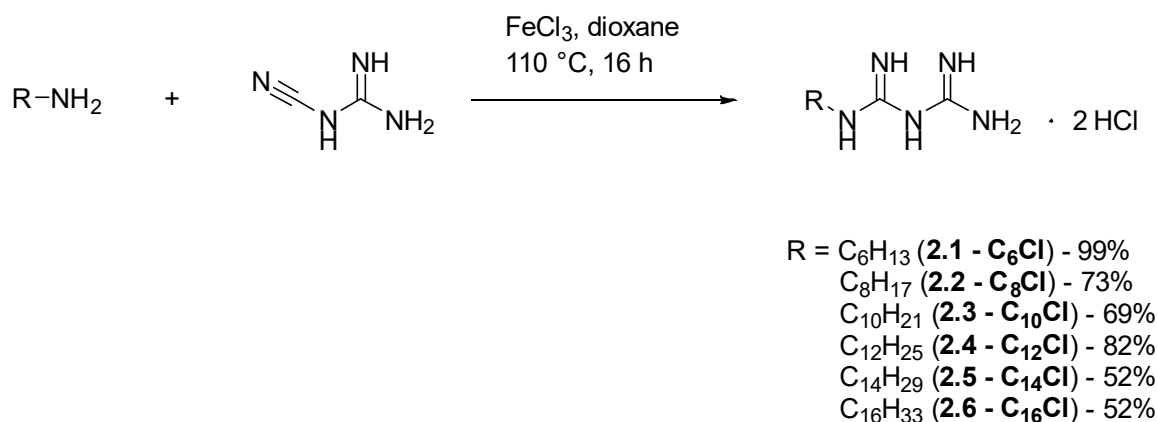


Figure 2.5 Synthesis of alkybiguanidium salts **2.1 - 2.6**



## 2.6.2 Integrity of the phospholipid bilayer

EYPC large unilamellar vesicles (LUVs) were first used as simple phospholipid models to assess the membrane perturbation properties of alkylbiguanidium salts.<sup>19</sup> DLS measurements were performed to determine the variation in the size of the LUVs when in contact with the alkylbiguanidium chlorides. The EYPC LUVs initially had a radius of  $60.6 \pm 0.8$  nm and a high internal ion concentration (mainly  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$ ) when bathing in a salt-free ultrapure water environment.<sup>20</sup> The results summarized in **Table 2.1** show that there was a slight swelling of the liposomes when the alkylbiguanidium chlorides were added at concentrations of 10 or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , indicating the maintenance of the integrity of the phospholipid membrane. A 10% increase in liposome size was observed for **C<sub>16</sub>Cl** at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; this is similar to the results obtained with benzalkonium chloride (**BAC**, with alkyl chain lengths ranging from  $\text{C}_8\text{H}_{17}$  to  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ), which is known for its membrane perturbing properties.<sup>13</sup> The swelling observed for **C<sub>16</sub>Cl** could be a consequence of membrane insertion and accumulation because of its structural similarity to EYPC. The slight swelling observed for the other alkylbiguanidium chlorides presumably indicates the modest movement of water molecules from the salt-free extravesicular solution to the highly concentrated intravesicular solution. Although the liposomes were completely disassembled into small aggregates by the lysing agent, Triton-X, they were still intact even after exposure to a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of alkylbiguanidium chlorides, indicating the perturbation and permeabilization of the phospholipid membrane,<sup>21</sup> as previously shown for other membrane-depolarizing compounds.<sup>22,23</sup>

This experiment informs us that alkylbiguanidium salts can modify the permeability of a phospholipid membrane in a way that allows the passage of small molecules such as water without completely altering its integrity (lysis). The behavior of the alkylbiguanidium salts as selective permeabilizing agents is an unexpected behavior considering that most QACs, which are structurally similar to alkylbiguanidium salts, act as lysing agents.<sup>24</sup> This could provide an interesting solution to the toxicity of QACs toward mammalian cells.<sup>25</sup>

Table 2.1 Radius of EYPC liposomes after exposure to alkylbiguanidium chlorides.<sup>a</sup>

Radius (nm)	At 10 $\mu\text{g/mL}$	At 100 $\mu\text{g/mL}$
DMSO	$60.6 \pm 0.8$	$60.6 \pm 0.8$
Metformin	$62.8 \pm 0.7$	$61.5 \pm 0.4$
Phenformin	$64.5 \pm 0.5$	$63.6 \pm 1.0$
C <sub>6</sub> Cl	$63.7 \pm 1.8$	$61.4 \pm 0.7$
C <sub>8</sub> Cl	$61.5 \pm 0.2$	$62.1 \pm 0.4$
C <sub>10</sub> Cl	$61.6 \pm 0.3$	$62.4 \pm 0.3$
C <sub>12</sub> Cl	$63.6 \pm 0.4$	$62.7 \pm 0.2$
C <sub>14</sub> Cl	$62.2 \pm 0.9$	$62.3 \pm 0.3$
C <sub>16</sub> Cl	$62.3 \pm 0.4$	$70.8 \pm 1.9$
BAC (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> to C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> )	$61.9 \pm 1.0$	$67.9 \pm 0.1$
Triton-X	$4.2 \pm 0.1$	$4.2 \pm 0.1$

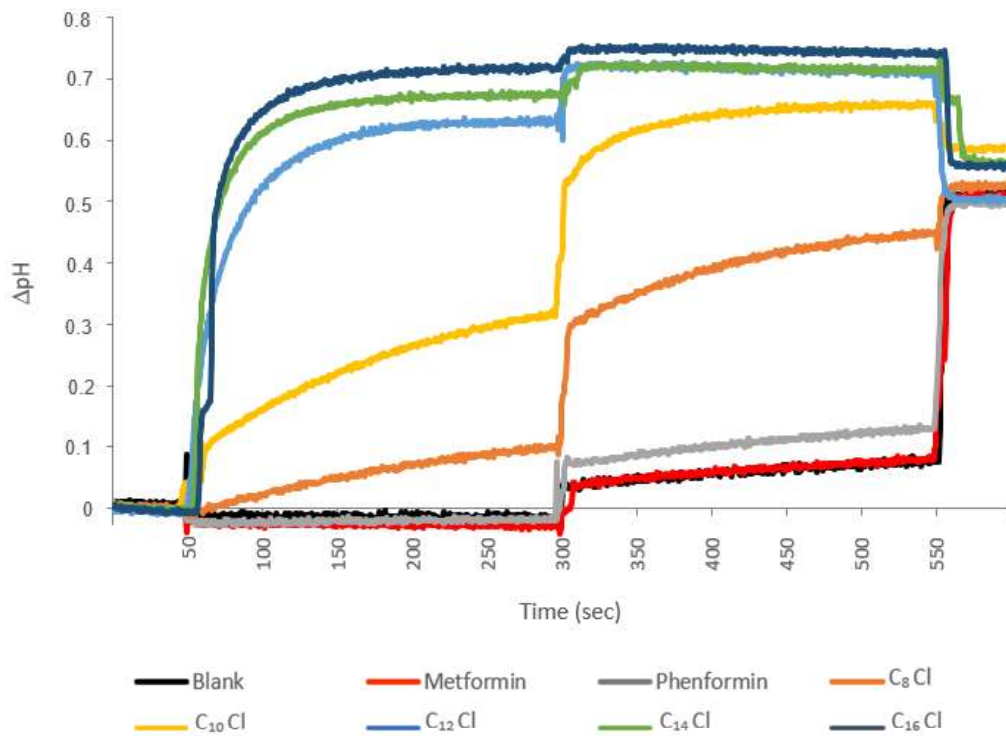
<sup>a</sup> Intravesicular solution of PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, adjusted to pH = 7.4) and extravesicular solution of ultrapure water.

### 2.6.3 Ion transport

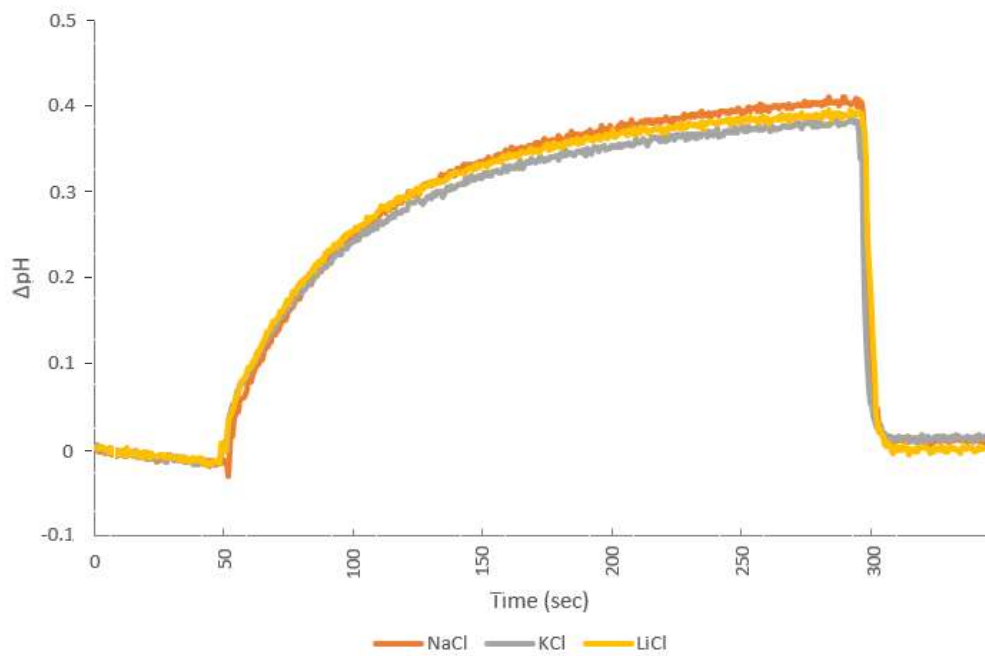
When the permeabilization of liposomal membranes occurs, it is important to know which small molecules or ions can cross the perturbed phospholipid bilayers. To investigate this, we used EYPC LUVs containing HPTS, a pH-sensitive probe having two different excitation wavelengths corresponding to its protonated and neutral forms but having only one emission wavelength. By measuring the intensity of fluorescence for each excitation wavelength and comparing the ratios, it is possible to calculate the ratio of the protonated and neutral form of the probe and determine the internal pH of the LUV.<sup>26</sup> At the beginning of this experiment the pHs of the extra and intravesicular solutions were neutral. After 300 s, a pH pulse was induced by the addition of NaOH to the external solution. This created a driving force for the movement of ions across the membranes. The addition of alkylbiguanidium chlorides to the HPTS-containing liposomes resulted in the basification of the liposome internal solution, either induced by the efflux of protons or the influx of hydroxide anions (**fig. 2.6a**). Although no significant basification of the liposomes was observed for metformin and phenformin, all the alkylbiguanidium chlorides tested, particularly **C<sub>12</sub>Cl**, **C<sub>14</sub>Cl**, and **C<sub>16</sub>Cl**, induced pronounced H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> transport across the phospholipid membrane.

Ion transport through phospholipid membranes can be achieved through electrogenic processes, where the movement of ions results in charge transfer, or electroneutral processes, through either a symport or antiport process. Because the electroneutral process involves the transport of another ion across the membrane, we first investigated the transport of Na<sup>+</sup> by alkylbiguanidium salts. The same EYPC-LUVs with the HPTS probe were used, but the salt in the external solution was changed from NaCl to LiCl and KCl at the same internal and external pH (**fig. 2.6b** for **C<sub>12</sub>Cl**). No variation in the internal pH was observed in the presence of these different cations, which have different sizes and hydration properties, showing that the external cation is not involved in the overall transport process. These results show that alkylbiguanidium salts do not induce an electroneutral H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> antiport or OH<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> symport processes.

A)



B)



C)

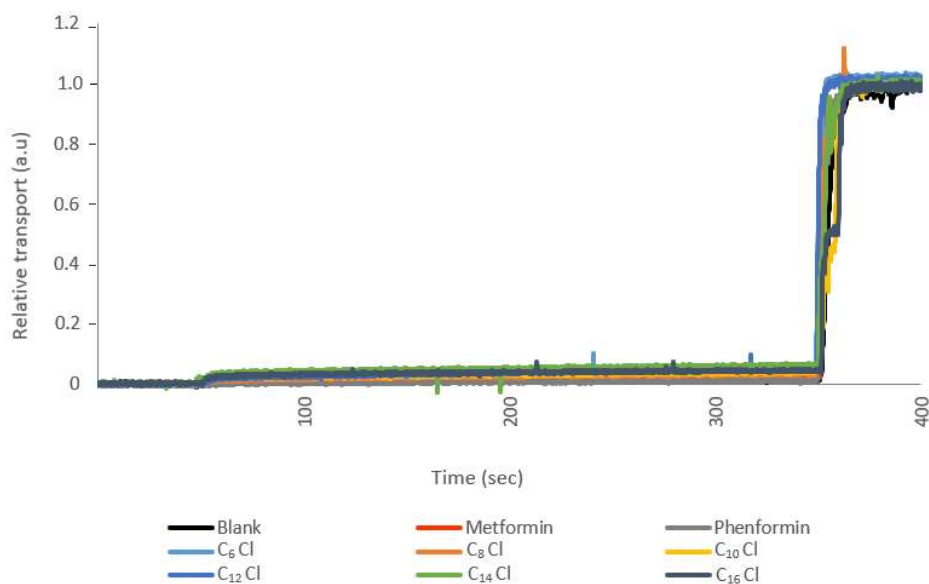


Figure 2.6 Ion transport behavior of alkylbiguanidium. A) Variation in the internal pH of HPTS-containing EYPC liposomes. Intravesicular solution: 1 mM HPTS, 10 mM HEPES, and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4, and extravesicular solution: 10 mM HEPES and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4. Alkylbiguanidium chlorides were injected after 50 s at 5 mM (50 mol% relative to the 10 mM EYPC concentration), a NaOH pulse was induced at 300 s, and the liposomes were lysed with Triton-X at 550 s. B) Variation in the internal pH of the HPTS-containing EYPC liposomes with different external salt solutions. Intravesicular solution: 1 mM HPTS, 10 mM HEPES, and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4, and extravesicular solution: 10 mM HEPES, 100 mM of the corresponding salt (LiCl, NaCl, or KCl), adjusted to pH = 7.4. Alkylbiguanidium chloride C12Cl was injected after 50 s at 5 mM (50 mol% relative to the 10 mM EYPC concentration), and the liposomes were lysed with Triton-X after 300 s. C) Chloride efflux in lucigenin-containing EYPC liposomes. Intravesicular solution: 2 mM lucigenin, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaCl, and extravesicular solution: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaNO<sub>3</sub>. Alkylbiguanidium chlorides were injected after 50 s at 50 mM (50 mol% relative to the 100 mM EYPC concentration), and the liposomes were lysed with Triton-X at 350 s. Each curve is the average of three independent measurements.

In a similar study for  $\text{Cl}^-$  transport, we used EYPC LUVs containing a different fluorophore, lucigenin (10-methyl-9-(10-methylacridin-10-ium-9-yl)acridin-10-ium dinitrate), a probe whose fluorescence is quenched by the presence of chloride. The liposomes are designed to contain a high initial internal concentration of NaCl while suspended in a chloride-free external buffer such that, at the beginning of the experiment, no fluorescence is observed. The addition of a membrane perturbing agent allowing chloride efflux results in a decrease in the internal chloride concentration and an increase in lucigenin fluorescence, which can be measured and quantified.<sup>27</sup> The chloride transport results (**fig. 2.6c**) reveal no significant increase in fluorescence, regardless of the length of the alkyl chain, indicating that chloride is not transported across the liposomal membrane and that electroneutral  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  symport or  $\text{OH}^-/\text{Cl}^-$  antiport are not possible modes of action. The same lack of chloride transport was observed for metformin and phenformin.

Altogether, the results of the transport experiments indicate that neither chloride nor sodium ions were transported through the phospholipid membrane by the alkylbiguanidium salts, eliminating the electroneutral  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  transport hypothesis (**fig. 2.7**). If this highly selective electrogenic  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  transport process<sup>28</sup> is maintained in biological membranes, the disruption of the proton gradient across biological membranes and the resultant membrane potential may lead to cellular regulation problems, such as membrane depolarization and the uncoupling of oxidative phosphorylation.

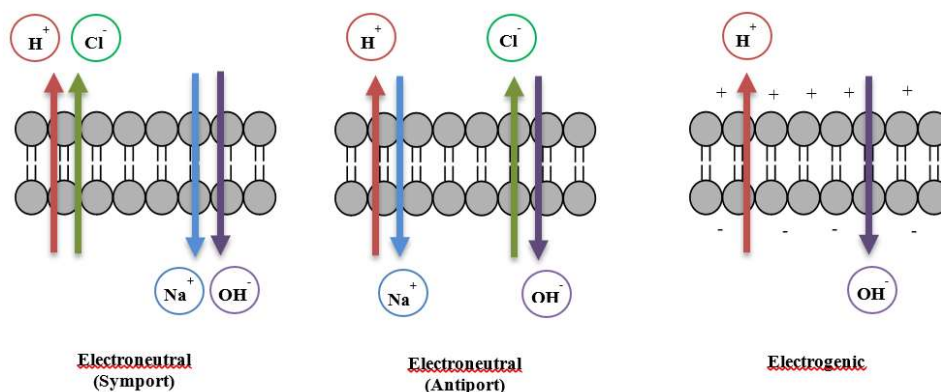


Figure 2.7 Schematic representation of the three possible  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  transport processes induced by alkylbiguanidium salts.

#### 2.6.4 Depolarization of an artificial phospholipid membrane.

The generation of an ionic potential across biological membranes is an important physiological process, crucial for cell homeostasis and survival.<sup>29,30</sup> In any living cell, the disruption of the membrane potential leads to the complete shutdown of the most essential cellular functions and, eventually, cell death.<sup>31</sup>

To study whether the alkylbiguanidium chlorides cause the depolarization of phospholipid membranes, we used EYPC LUVs bathing in a solution of safranin-O<sup>32</sup>, a probe used as a membrane potential indicator. An increase in its fluorescence intensity indicates hyperpolarization, whereas a decrease in its fluorescence intensity is generally correlated with membrane depolarization. The EYPC liposomes contained intravesicular K<sup>+</sup> and extravesicular Na<sup>+</sup> ions, allowing the generation of a small membrane potential at the beginning of the experiment (which caused a slight fluorescence of the sample). As expected, the addition of valinomycin induced the hyperpolarization of the membrane as a result of K<sup>+</sup> efflux. The addition of alkylbiguanidium chlorides in the external LUV solution led to a rapid decrease in the fluorescence intensity, indicating a perturbation of the membrane, equilibration of the ion distribution on both sides of the membrane, and depolarization of the phospholipid membrane (**fig. 2.8a**). Metformin and phenformin had very little effect on the membrane potential (under 10% variation), but the C<sub>12</sub>Cl, C<sub>14</sub>Cl, and C<sub>16</sub>Cl alkylbiguanidium salts were able to induce up to 20% membrane depolarization (**fig. 2.8b**). In the C<sub>12</sub>Cl-valinomycin experiment, we first observed depolarization induced by the alkylbiguanidium salt, followed by a hyperpolarization induced by valinomycin, lower than that induced when used alone. This indicates that the efflux of K<sup>+</sup> induced by valinomycin competes with the fast re-equilibration of the ion distribution on both sides of the membrane. Because the alkylbiguanidium salts with the best depolarization properties were those exhibiting the most intense ion transport in the HPTS experiment, we believe that the observed membrane depolarization is the result of the transport of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> ions, as a result of the membrane permeabilization.

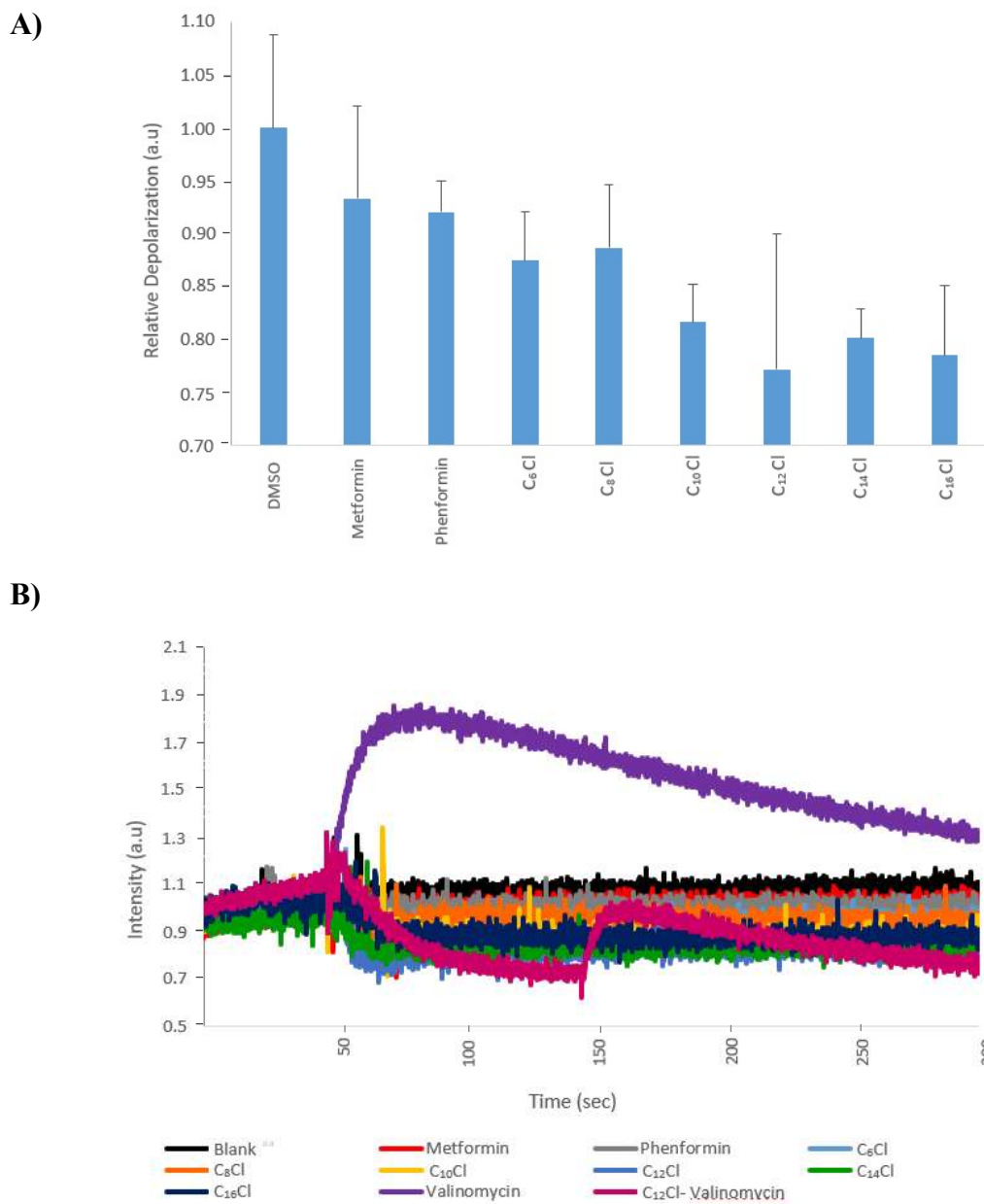


Figure 2.8 Depolarization behavior of alkylbiguanidium. A) Relative depolarization of the EYPC bilayer. The fluorescence was measured at 300 s, and each value is the average of three independent experiments. B) Fluorescence of safranin-O in the EYPC liposomes. The alkylbiguanidium salt was injected at 50 s, and, in the C<sub>12</sub>Cl-valinomycin experiment, the valinomycin was added at 150 s. Each value is the average of three independent experiments.



## 2.6.5 Permeabilization of bacterial membranes

Because the alkylbiguanidium salts induced the permeabilization of simple model membranes, we were interested to see if the same the effect was observed in complex bacterial membranes. For these studies we used the bacterial membrane permeabilization assay initially developed by Lehrer *et al.*<sup>33</sup> using the hydrolysis of extracellular *ortho*-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside (ONPG) by the cytoplasmic  $\beta$ -galactosidase in Gram-negative *E. coli* (MG1655). In the presence of membrane permeabilizing agents, ONPG can penetrate the bacterial envelope and is hydrolyzed in the cytoplasm. The enzymatic hydrolysis of ONPG releases *ortho*-nitrophenol, which can be monitored by UV-vis measurements (**fig. 2.9**), and a mathematical treatment developed by our group allowed us to determine the rate of permeabilization of the *E. coli* membrane induced by the alkylbiguanidium salts.<sup>7</sup> As summarized in **Table 2.2**, **C<sub>6</sub>Cl** and **C<sub>8</sub>Cl** did not permeabilize the membrane of Gram-negative bacteria, but **C<sub>12</sub>Cl**, **C<sub>14</sub>Cl**, and **C<sub>16</sub>Cl** caused significant membrane permeabilization. Another interesting general trend observed in the ONPG assay is the fact that the reaction rate of permeabilization of the

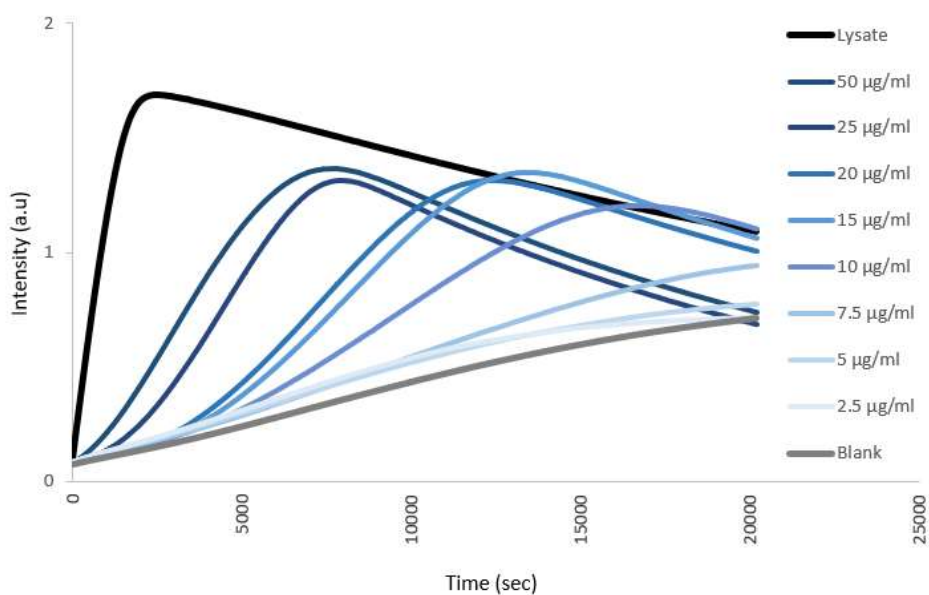


Figure 2.9 Hydrolysis of ONPG at various concentrations of the **C<sub>10</sub>Cl** permeabilizing agent in *E. coli* (MG1655). Alkylbiguanidium salts in DMSO were injected at  $t = 0$  s, and each curve is the average of three independent measurements. The blank was realized with DMSO and the lysate by the sonication of the bacterial culture (see section A.1.3)

alkylbiguanidium chlorides (RRr) were never above 50% of the maximal reaction rate of the lysate ( $RR_{\max}$  – see section A.1.3). In the case of **BAC**, we previously showed that the complete permeabilization and lysis of the *E. coli* envelope was a biphasic process,<sup>7</sup> corresponding first to the perturbation of the outer membrane and then to that of the inner membrane, inducing complete bacterial lysis and  $\beta$ -galactosidase release. This limitation in the reaction rate of ONPG hydrolysis indicates that the alkylbiguanidium salts only permeabilize the bacterial envelope and allow ONPG to penetrate the cytosol without  $\beta$ -galactosidase leakage.<sup>7</sup> This is in accordance with the results from the DLS permeabilization experiment where it was noted that alkylbiguanidiums were able to permeabilize membranes without complete lysis.

Table 2.2 Permeabilization of the *E. coli* (MG1655) membrane by alkylbiguanidium chlorides.

	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>
Metformin	-
Phenformin	-
<b>C<sub>6</sub> Cl</b>	-
<b>C<sub>8</sub> Cl</b>	-
<b>C<sub>10</sub> Cl</b>	$15.2 \pm 0.9$
<b>C<sub>12</sub> Cl</b>	$5.1 \pm 0.1$
<b>C<sub>14</sub> Cl</b>	$6.7 \pm 0.4$
<b>C<sub>16</sub> Cl</b>	$7.6 \pm 0.9$

<sup>a</sup>  $EC_{50}$ : Alkylbiguanidium salt concentration required to induce 50% ONPG hydrolysis

## 2.6.6 Depolarization of bacterial membranes

Because membrane permeabilization was observed in the model EYPC membranes, we were interested to see the effect of alkybiguanidium salts on bacterial membranes composed of a large range of amphiphilic lipids, including phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, and cardiolipin. The depolarization of Gram-positive (*B. thuringiensis*) and Gram-negative (*E. coli*) bacterial membranes was studied using bacteria in combination with the DISC<sub>25</sub> dye.<sup>27</sup> This probe acts similarly to safranin-O, its fluorescence being quenched when inserted into a polarized phospholipid membrane. The change in polarization of the bacterial membrane in the presence of membrane-active compounds can be monitored by fluorescence. The addition of the C<sub>10</sub>–C<sub>16</sub>Cl alkybiguanidium salts to a bacterial suspension resulted in the depolarization of the membranes of both Gram-positive and Gram-negative bacteria (**fig. 2.10**). The C<sub>12</sub>Cl, C<sub>14</sub>Cl, and C<sub>16</sub>Cl alkybiguanidium salts induced the strongest depolarization of the membrane because of the important transport of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> ions across the membrane. The depolarization was more pronounced in the case of Gram-positive bacteria, presumably because they possess only one phospholipid bilayer, and a larger electrical potential variation can arise from the direct interaction of the alkybiguanidium salts with the cytoplasmic membrane. The depolarization was lower in the case of Gram-negative bacteria, which possess an additional phospholipid bilayer.

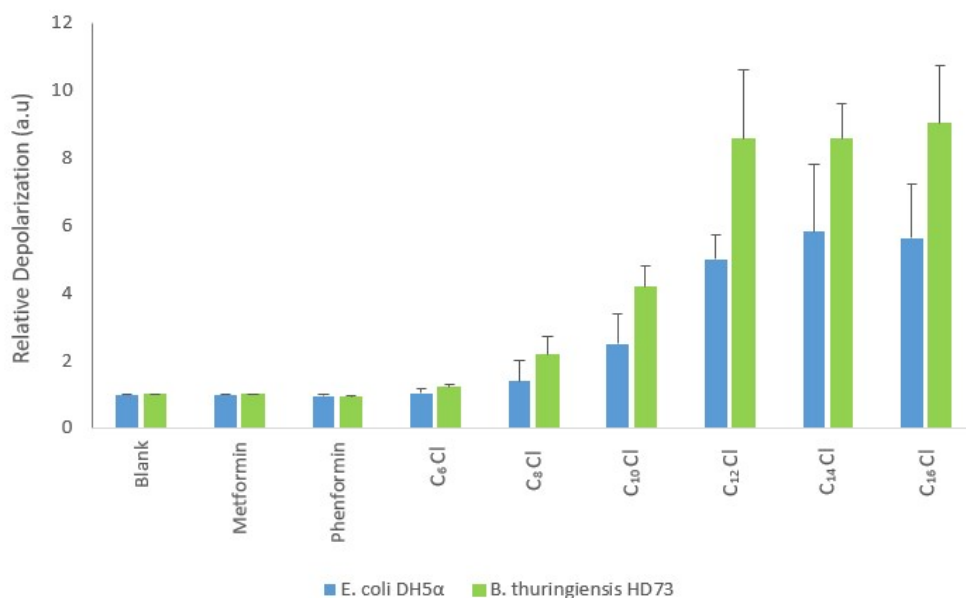


Figure 2.10 Depolarization of the *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) and *B. thuringiensis* (HD73) membranes. Alkylbiguanidium salts were injected at 50 s at 100  $\mu$ g/mL. The relative fluorescence was taken at 1500 s, and each value is the average of three independent experiments.

Because a significant level of membrane potential perturbation was observed for some of the alkylbiguanidium chlorides and knowing that the disruption of the membrane potential may result in cell death, we next investigated the ability of different microorganisms to survive in the presence of different concentrations of the alkylbiguanidium salts.

### 2.6.7 Antimicrobial activity

The MIC, the lowest concentration at which no microbial growth was observed, of the C<sub>6</sub>–C<sub>16</sub>Cl alkylbiguanidium salts were measured for Gram-positive *B. thuringiensis* (HD073), Gram-negative *E. coli* (DH5 $\alpha$  and SK037), and the yeasts *C. albicans* (SC5314) and *C. krusei* (UM680). The results summarized in **Table 2.3** show that the C<sub>6</sub>Cl and C<sub>8</sub>Cl alkylbiguanidium salts have no antimicrobial activity. The antimicrobial activity of C<sub>10</sub>Cl, C<sub>12</sub>Cl, and C<sub>14</sub>Cl on all the studied strains suggests that the main mechanism of action of these compounds is the

permeabilization of the phospholipid bilayer because the most depolarizing compounds are those with better antibiotic activity.

The lower MICs obtained for Gram-positive bacteria indicate the easier penetration of their single phospholipid bilayer and, thus, increased depolarization and antibacterial activity. This has also been observed in the literature for QACs.<sup>31</sup> It is well known that Gram-negative bacterial membranes contain many transmembrane efflux pumps that reject molecules that have crossed the outer membrane; this acts as a protection mechanism.<sup>34</sup> The efficiency of alkybiguanidium chlorides in stopping the proliferation of wild-type *E. coli DH5 $\alpha$*  and the mutant *E. coli SK037* strain, in which the *TolC* efflux pump protein has been deactivated,<sup>36</sup> was further investigated. As shown in **Table 2.3**, the MIC values are up to two-fold lower for the SK037 strain, indicating that the alkybiguanidium salts are able to penetrate and cross the outer membrane but are effluxed when the *TolC* pump is present.

Surprisingly, the C<sub>16</sub>Cl alkybiguanidium salt, which induced a pronounced bacterial membrane depolarization, showed only modest antimicrobial activity. Possible interactions between metformin and the bacterial inner membrane respiratory chain complex NADH-Q oxidoreductase (NDH-I) have been proposed in the past.<sup>30</sup> Given the resemblance between bacterial NDH-I and mitochondrial complex I, which metformin is known to inhibit,<sup>31</sup> we believe that the alkybiguanidium salts may possess the ability to inhibit the NDH-I complex. The alkybiguanidium salt must first penetrate the outer membrane, becoming partitioned into the periplasmic space and, thus, reaching the inner membrane. Alkybiguanidium C<sub>16</sub>Cl is probably too hydrophobic and accumulates in the outer membrane of Gram-negative bacteria and does not reach the inner membrane. This possible mechanism of action of alkybiguanidium salts is under investigation by our group.

Table 2.3 Minimal inhibitory concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>a</sup>

	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
	(DH5 $\alpha$ )	(SK037)	(HD73)	(SC5314)	(UM680)
Metformin	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Phenformin	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
C <sub>6</sub> Cl	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
C <sub>8</sub> Cl	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
C <sub>10</sub> Cl	25	13	> 50	30	30
C <sub>12</sub> Cl	12	6	6	8	8
C <sub>14</sub> Cl	13	13	5	3	3
C <sub>16</sub> Cl	> 50	> 50	13	8	> 50
BAC	36	3	8	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> The uncertainty on MIC value  $x$  is in the interval  $[x/2 - 2x]$ . Each experiment was done in triplicate in three different experiments

## 2.6.8 Hemolytic activity

If the permeabilization of the cellular membrane occurs alone without complete lysis, as suggested by the DLS and bacterial permeabilization results, the alkylbiguanidium salts should not induce the hemolysis of red blood cells (RBC) like QACs. RBCs comprise a plasma

membrane enveloping hemoglobin.<sup>36</sup> If the integrity of this membrane is altered, as is the case when lysis occurs, hemoglobin is released and is easily detected. When exposed to alkylbiguanidium salts at a concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$ , at which they showed relevant antibacterial and antifungal activities, only low levels of hemolysis were observed (under 10%) (**fig. 2.11**). The low toxicity of the alkylbiguanidium salts toward RBCs at concentrations close to their MICs and twice their MICs is encouraging for their application as antibacterial and antifungal agents, in particular, when compared to the hemolytic activity of **BAC**, which is much higher at these concentrations.

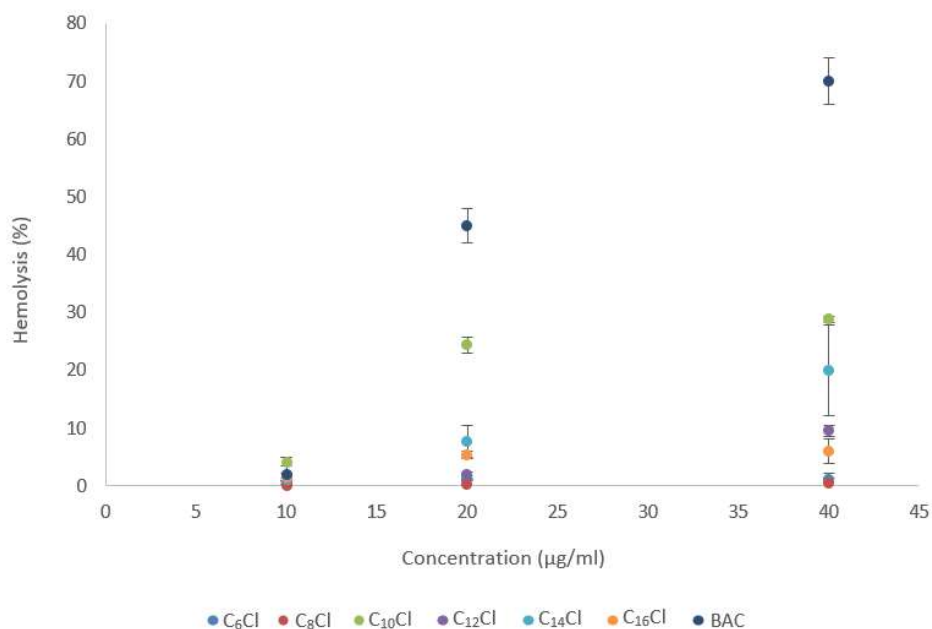


Figure 2.11 Hemolysis of RBCs at various concentrations of alkylbiguanidium salts after 1 h incubation at 37 °C. The values reported are relative to the lysis of RBC induced by Triton-X. Each value is the average of three independent measurements.

## 2.7 Conclusions

We have shown that alkybiguanidium salts have membrane perturbing properties for both simple phospholipid bilayer (liposomes) and complex phospholipid membranes (bacteria and yeast). Compared to metformin and phenformin, the alkybiguanidium salts induce more significant permeabilization of the phospholipid membranes, leading to highly selective  $H^+/OH^-$  transport and subsequent depolarization of the membrane. Although the alkybiguanidium salts with shorter chains ( $C_6$  and  $C_8$ ) are too hydrophilic to be inserted into the membrane and perturb it, those with  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ , and  $C_{16}$  alkyl chains show high membrane permeabilization and depolarization activity. Compounds of the  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ , and  $C_{14}$  salts possess interesting antimicrobial activity and, at concentrations close to their MICs, have low hemolytic activity and toxicity. The mechanism of action and interaction of the alkybiguanidium salts with other eukaryotic membranes are currently under study by our group and should shortly bring new insights into their activity toward healthy, as well as cancerous, cells.

## 2.8 Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Canadian Cancer Society (CCS), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQ-NT), and Fonds Marguerite Ruel pour la Recherche sur le Cancer - Université de Montréal for financial support. We also thank Le Centre Régional de RMN and Le Centre Régional de Spectrométrie de Masse of the Université de Montréal. We thank the Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie - Université de Montréal for bacterial and fungal strains. We thank Pr. K. Wilkinson and J.N. Pelletier for access to instruments in their laboratories.



## 2.9 References

1. McNally, B. A.; Koulov, A. V.; Smith, B. D.; Joos, J. B.; Davis, A. P., *Chem Commun (Camb)* **2005**, (8), 1087.
2. Davis, A. P.; Sheppard, D. N.; Smith, B. D., *Chem Soc Rev* **2007**, 36 (2), 348.
3. Gravel, J.; Schmitzer, A. R., *Supramol Chem* **2014**, 27 (5-6), 364.
4. Zha, H. Y.; Shen, B.; Yau, K. H.; Li, S. T.; Yao, X. Q.; Yang, D., *Org Biomol Chem* **2014**, 12 (41), 8174.
5. Te Winkel, J. D.; Gray, D. A.; Seistrup, K. H.; Hamoen, L. W.; Strahl, H., *Front Cell Dev Biol* **2016**, 4, 29.
6. Epand, R. F.; Pollard, J. E.; Wright, J. O.; Savage, P. B.; Epand, R. M., *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, 54 (9), 3708.
7. Gravel, J.; Paradis-Bleau, C.; Schmitzer, A. R., *Medchemcomm* **2017**, 8 (7), 1408-1413.
8. Pollak, M. N., *Cancer Discov* **2012**, 2 (9), 778.
9. Wang, Z.; Lai, S. T.; Xie, L.; Zhao, J. D.; Ma, N. Y.; Zhu, J.; Ren, Z. G.; Jiang, G. L., *Diabetes Res Clin Pr* **2014**, 106 (1), 19.
10. Kordes, S.; Pollak, M. N.; Zwinderman, A. H.; Mathot, R. A.; Weterman, M. J.; Beeker, A.; Punt, C. J.; Richel, D. J.; Wilmink, J. W., *Lancet Oncol* **2015**, 16 (7), 839.
11. Segal, E. D.; Yasmeen, A.; Beauchamp, M. C.; Rosenblatt, J.; Pollak, M.; Gotlieb, W. H., *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, 414 (4), 694.
12. Aroles, V.; Ballotti, R.; Rocchi, S.; Tomic, T., Biguanide compounds and its use for treating cancer. US20130059916 A1: 2013.
13. Wessels, S.; Ingmer, H., *Regul Toxicol Pharmacol* **2013**, 67 (3), 456.
14. Ioannou, C. J.; Hanlon, G. W.; Denyer, S. P., *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51 (1), 296.
15. Gilbert, P.; Moore, L. E., *J Appl Microbiol* **2005**, 99 (4), 703.
16. Allen, M. J.; White, G. F.; Morby, A. P., *Microbiology* **2006**, 152 (Pt 4), 989.
17. Jennings, M. C.; Buttaro, B. A.; Minbiole, K. P.; Wuest, W. M., *ACS Infect Dis* **2015**, 1 (7), 304.
18. Suyama, T.; Soga, T.; Miyauchi, K., *Nippon Kagaku Kaishi* **1989**, (5), 884.

19. Sessa, G.; Weissmann, G., *J Lipid Res* **1968**, *9* (3), 310.
20. Hupfeld, S.; Holsaeter, A. M.; Skar, M.; Frantzen, C. B.; Brandl, M., *J Nanosci Nanotechno* **2006**, *6* (9-10), 3025.
21. Kempf, J.; Schmitzer, A. R., *Chemistry* **2017**, *23* (26), 6441.
22. Wimley, W. C.; Hristova, K., *J Membr Biol* **2011**, *239* (1-2), 27.
23. Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R., *J Med Chem* **2015**, *58* (5), 2358.
24. Jennings, M. C.; Minbiole, K. P.; Wuest, W. M., *ACS Infect Dis* **2015**, *1* (7), 288.
25. Inacio, A. S.; Costa, G. N.; Domingues, N. S.; Santos, M. S.; Moreno, A. J.; Vaz, W. L.; Vieira, O. V., *Antimicrob Agents Chemother* **2013**, *57* (6), 2631.
26. Davis, J. T.; Okunola, O.; Quesada, R., *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (10), 3843.
27. Elie, C. R.; Noujeim, N.; Pardin, C.; Schmitzer, A. R., *Chem Commun (Camb)* **2011**, *47* (6), 1788.
28. Si, W.; Chen, L.; Hu, X. B.; Tang, G.; Chen, Z.; Hou, J. L.; Li, Z. T., *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50* (52), 12564.
29. Strahl, H.; Hamoen, L. W., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (27), 12281.
30. Zamzami, N., *J Exp Med* **1995**, *182* (2), 367.
31. Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I.; Lee, R. E., *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9* (1), 62.
32. Zha, H. Y.; Shen, B.; Yau, K. H.; Li, S. T.; Yao, X. Q.; Yang, D., *Org Biomol Chem* **2014**, *12* (41), 8174
33. Lehrer, R. I.; Barton, A.; Ganz, T., *J Immunol Methods* **1988**, *108* (1-2), 153.
34. Aono, R.; Tsukagoshi, N.; Yamamoto, M., *J Bacteriol* **1998**, *180* (4), 938.
35. Vidal, M.; Elie, C. R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R., *Med Chem Comm* **2014**, *5* (4), 436.
36. Alberts, B. ; Jonhson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., Molecular Biology of the Cell. *Garlan Publishing, Inc.* : 1983.

# **Chapitre 3 : Biguanides substitués par le groupement phényléthynylbenzyle capables d'inhiber la croissance de tumeurs du cancer du pancréas**

## **3.1 Préface**

Après avoir étudié l'interaction de biguanides simples avec les membranes biologiques, nous nous sommes penchés vers des structures plus variées afin d'obtenir de meilleurs agents anticancéreux que la metformine. Ces nouvelles molécules sont inspirées des travaux de notre groupe sur les transporteurs transmembranaires mais n'en possèdent pas les mêmes propriétés de transport ionique. En effet, l'idée de ce projet est d'utiliser les propriétés de pénétration des transporteurs dans les membranes sans perturber celles-ci trop fortement, ce qui amène alors une trop grande toxicité. Pour ce faire, nous avons utilisé un biguanide avec une seule fonction PEB qui, grâce à son hydrophobie et sa capacité à s'auto-assembler, peut traverser dans le cytoplasme des cellules et inhiber la prolifération cancéreuse. Les connaissances acquises précédemment sur les sels d'alkylbiguanidium nous ont aussi permis de mieux caractériser l'effet de ces biguanides sur les membranes et de mieux comprendre quelles modifications à la structure allaient nous permettre d'augmenter les propriétés anticancéreuses.

Ce chapitre présente ainsi la synthèse des sels de PEB-biguanidium ainsi que leurs propriétés de pénétration et perturbation des membranes biologiques. L'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses ainsi que l'étude du mode d'action de ces nouveaux biguanides sont aussi décrites, de même que les études *in vivo* sur des xénogreffes du cancer du pancréas. Les travaux de ce chapitre ont fait l'objet d'un brevet (US 62/490,823 A.R. Schmitzer, G. Ferbeyre, A. Hébert, M. Parisotto, Biguanide compounds and method for the treatment of cancer, avril 2018).

Ma contribution à l'article présenté dans ce chapitre a été l'élaboration du projet et des procédures, une partie du travail expérimental (synthèse, U-tube, transport et dépolarisation dans les liposomes) ainsi que la rédaction d'une partie du manuscrit. Le Dr. Maxime Parisotto et Marie-Camille Rowell ont contribué à cet article dans l'élaboration du projet et des

procédures, une partie du travail expérimental (M.P. : effet sur les cellules cancéreuses, manipulations *Seahorse*, mode d'action intracellulaire, expériences *in vivo* / M.C.R. : imagerie par fluorescence) ainsi que la rédaction d'une partie du manuscrit. Guillaume Lefrançois, Alexandra Doré, Ana Fernandez et Paloma Kalegari ont contribué à cet article avec une partie du travail expérimental (G.L. : imagerie par fluorescence / A.D. : quantification par spectrométrie de masse / A.F. : quantification par spectrométrie de masse / P.K. : quantification par spectrométrie de masse). Le Prof. Gerardo Ferbeyre et le Prof. Andreea R. Schmitzer ont contribué à cet article dans l'élaboration du projet et des procédures ainsi que la finalisation de la rédaction du manuscrit.

Les informations supplémentaires de cet article se trouvent en annexe à la page 137.

## 3.2 Concepts et méthodes utilisées

### 3.2.1 Pénétration de la membrane cellulaire

Les méthodes utilisées pour caractériser la perturbation membranaire sont en partie les mêmes que celles présentées dans le chapitre 2 : le transport d'ion avec la lucigénine et le HPTS ainsi que la dépolarisation avec la safranine-O. À ces expériences se rajoutent l'expérience de tube en U (U-tube), qui est utilisée pour évaluer la capacité d'un composé à traverser une membrane biologique<sup>1</sup>. Cette expérience utilise un tube de verre en forme de U qui contient deux phases aqueuses séparées par une phase organique (habituellement du chloroforme ou du dichlorométhane) servant à mimer la bicouche phospholipidique (**fig. 3.1**). Dans le côté *cis* du tube, un composé est ajouté avec une concentration connue, alors que la phase aqueuse du côté *trans* n'est composée que d'eau distillée. La concentration du composé est alors mesurée dans le côté *trans* à différents intervalles de temps (ici, 48 h et 72 h) afin de mesurer la vitesse à laquelle un composé est capable de traverser la "membrane", ou s'il est même capable de la traverser tout court.

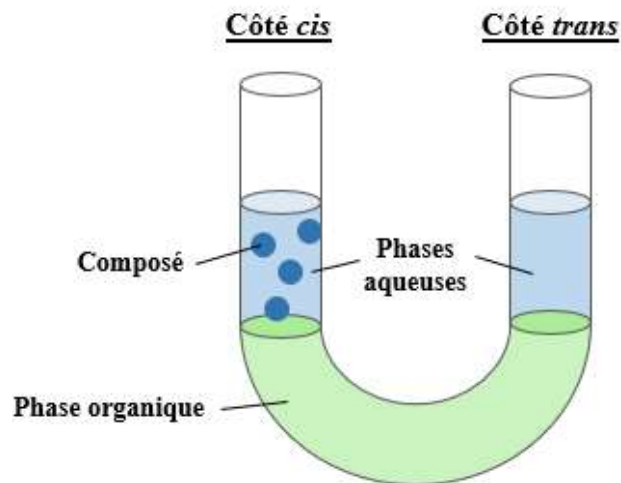


Figure 3.1 Schéma de l'expérience de tube en U

### 3.2.2 Évaluation des propriétés biologiques

Plusieurs expériences furent utilisées dans cet article afin de mesurer les effets anticancéreux des sels de PEB-biguanidium ainsi que leur mode d'action cellulaire. L'inhibition de la croissance des cellules, saines ou cancéreuses, fut simplement réalisée avec une mesure de la quantité de cellules après trois jours d'incubation avec le composé d'intérêt. La quantification est faite par l'absorbance du cristal violet, un chromophore qui colore le cytoplasme des cellules vivantes (**fig. 3.2**)<sup>2</sup>. Pour mesurer la quantité de cellules mortes, un test d'exclusion au bleu de trypan est plutôt utilisé<sup>3</sup>. Ce colorant est imperméable à la membrane cellulaire et ne pénètre que dans les cellules mortes.

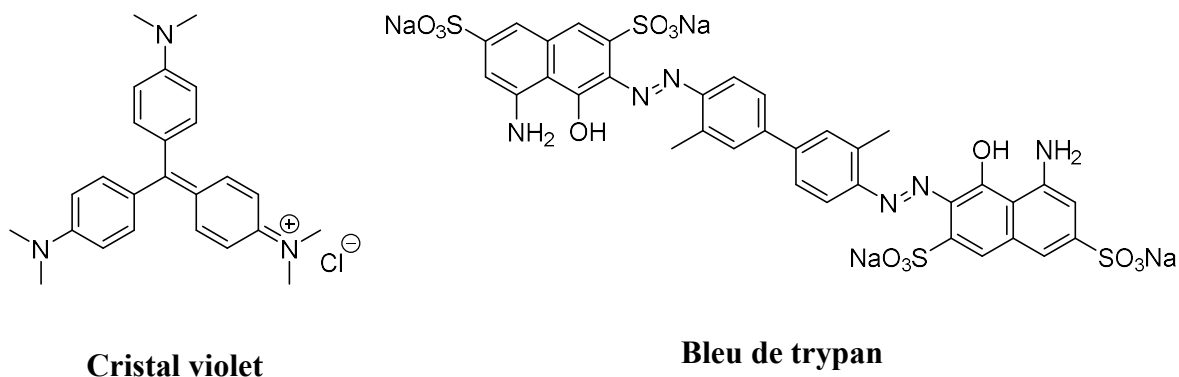


Figure 3.2 Sondes fluorescente utilisées pour la coloration des cellules

Afin de mesurer l'effet des biguanides sur les cellules cancéreuses souches (CSC), un test de croissance de sphères tumorales est utilisé<sup>4</sup>. Les cellules en culture sont mises en conditions non-adhérentes et sans sérum, des conditions dans lesquelles seules les CSC peuvent proliférer. Ce faisant, elles poussent en forme de sphères, typiquement de 50  $\mu\text{m}$  à 250  $\mu\text{m}$ , dans lesquelles les cellules apparaissent fusionnées et sont indistinctes les unes des autres. Il est ainsi possible en comptant le nombre de sphères d'estimer la proportion de CSC dans un échantillon de cellules cancéreuses ainsi que l'effet d'un composé sur leur croissance.

La détermination du mode d'action intracellulaire des biguanides dans cet article se fait en partie avec un transfert de protéines (*western blot*, WB) mesurant l'activation de la protéine AMPK. Le WB est une méthode analytique très commune en biochimie qui utilise l'électrophorèse sur gel pour séparer les protéines d'un échantillon en fonction de leur poids moléculaire. Une fois l'élution terminée, le gel est transféré sur un support solide et baigné dans une solution contenant un anticorps primaire se liant à la protéine d'intérêt. Un deuxième anticorps reconnaissant le premier est alors ajouté et sert à la détection par coloration, immunofluorescence ou radioactivité<sup>5</sup>. Ce faisant il est possible de mesurer la quantité de protéine d'intérêt dans un lysat cellulaire – dans cet article, cette méthode est utilisée pour déterminer la quantité d'AMPK phosphorylée (activée) et la quantité d'acétyl-CoA carboxylase (ACC) dans les cellules traitées par les sels de PEB-biguanidium.

Pour mieux mesurer l'effet des composés sur la respiration cellulaire, l'appareillage *Seahorse* est utilisé<sup>6</sup>. Celui-ci peut mesurer en temps réel la consommation d'oxygène (*oxygen consumption rate*, OCR) et l'acidification du milieu extracellulaire (*extracellular acidification rate*, ECAR) de cellules vivantes dans une plaque multi-puits. Ce dernier paramètre est un indicateur de la glycolyse, dans lequel le glucose est converti en acide pyruvique, qui survient lorsque la cellule est déprivée d'oxygène. Les paramètres OCR et ECAR sont donc souvent interreliés, puisque qu'une diminution de la respiration cellulaire implique souvent l'activation des voies cataboliques de sauvegarde d'énergie.

Enfin, l'effet des sels de PEB-biguanidium sur la morphologie des mitochondries est visualisé par immunofluorescence. Cette technique utilise un fluorophore attaché à un anticorps qui se lie à un antigène d'intérêt dans la cellule. Ce faisant, il est possible de visualiser la position de cet antigène par un microscope à fluorescence (fig. 3.3). Dans cet article, l'antigène reconnu est le TOMM20, une protéine de la membrane mitochondriale, permettant ainsi de localiser la membrane des mitochondries et l'effet des sels de PEB-biguanidium sur leur morphologie. Afin de faciliter la compréhension dans l'article, l'immunofluorescence de TOMM20 est superposée avec celle du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), un fluorophore bleu qui colore l'ADN.

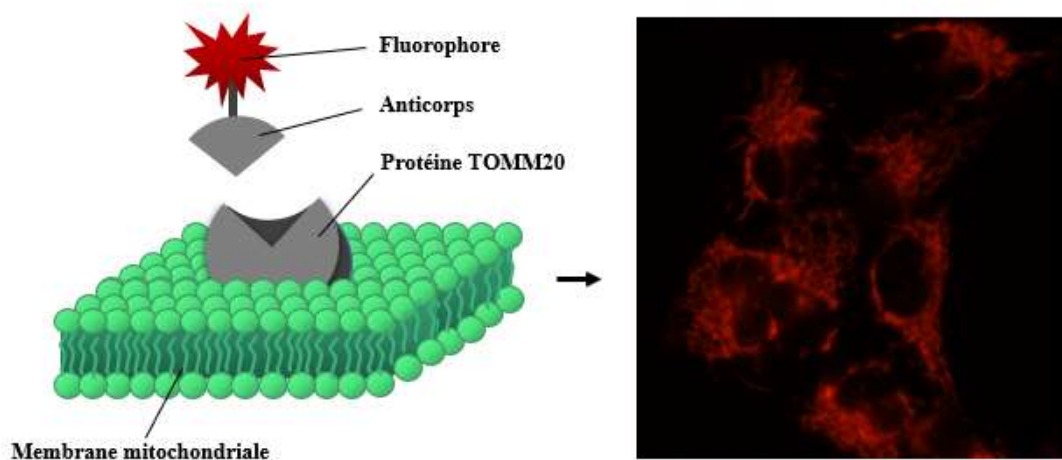


Figure 3.3 Visualisation par immunofluorescence de la protéine TOMM20

## **Article 2: Phenylethynylbenzyl -Modified Biguanides Inhibit Pancreatic Cancer Tumor Growth**

**Audrey Hébert<sup>[a]</sup>✦, Maxime Parisotto<sup>[a]</sup>✦, Marie-Camille Rowell<sup>[b]</sup>, Alexandra Doré<sup>[a]</sup>, Ana Fernandez<sup>[b]</sup>, Guillaume Lefrançois<sup>[a]</sup>, Paloma Kalegari<sup>[b]</sup>, Gerardo Ferbeyre\*<sup>[b]</sup> and Andreea R. Schmitzer\*<sup>[a]</sup>**

<sup>[a]</sup> Département de Chimie - Faculté des Arts et des Sciences, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit, CP 6128 Succursale Centre-Ville, Montréal, H3C3J7, Québec, Canada. <sup>[b]</sup>

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire - Faculté de Médecine, Université de Montréal.

*Submitted, August 26<sup>th</sup>, 2019*



### 3.3 Abstract

We present the design and synthesis of a small library of substituted biguanidium salts and their capacity to inhibit the growth/viability of pancreatic cancer cells. We first present their *in vitro* and membrane activity, before we address their mechanism of action in living cells and *in vivo* activity. We show that phenylethynylbenzyl biguanidium salts possess higher ability to cross hydrophobic barriers than their commercial analogues metformin and phenformin, resulting in improved mitochondrial accumulation and anticancer activity. Mechanistically, the most active compound **3.1b**, like metformin, decreases the  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio and mitochondrial respiration, but at 800-fold lower concentration. *In vivo* studies with the most active compound **3.1b** show a significant growth inhibition of pancreatic cancer xenografts in mice, while phenformin had no significant activity.

### 3.4 Introduction

Although they have been used for decades in the treatment of type II diabetes, it is only quite recently that biguanides have been found to have interesting anticancer properties<sup>7</sup>. Many epidemiological studies have linked the long-term regular intake of metformin (1,1-dimethylbiguanide), a commonly used antidiabetic biguanide, to the reduction of the incidence of a variety of cancers in diabetic patients<sup>8</sup>. These results suggest that biguanides have anticancer activity, an idea that was experimentally verified using cancer models in cell culture and mice<sup>9</sup>. However, several clinical trials featuring metformin as a chemotherapeutic agent in humans have been unsuccessful<sup>10-12</sup>. One of the reasons brought forward to explain this failure is the high hydrophilicity of metformin, administered as a monoprotonated chloride salt at physiological pH (pKa 2.8 and 11.5). While animal models were given very high quantities of metformin (250-350 mg/kg/day) to observe a potent anticancer activity<sup>13</sup>, the antidiabetic doses used in human patients (30 mg/kg/day) were deemed too low to attain the reported antiproliferative concentration of 5 mM *in vitro*<sup>14-15</sup>.

Even if the molecular target of biguanides has not been identified yet, it is clear that membrane insertion and mitochondrial penetration are critical for their activity. Different

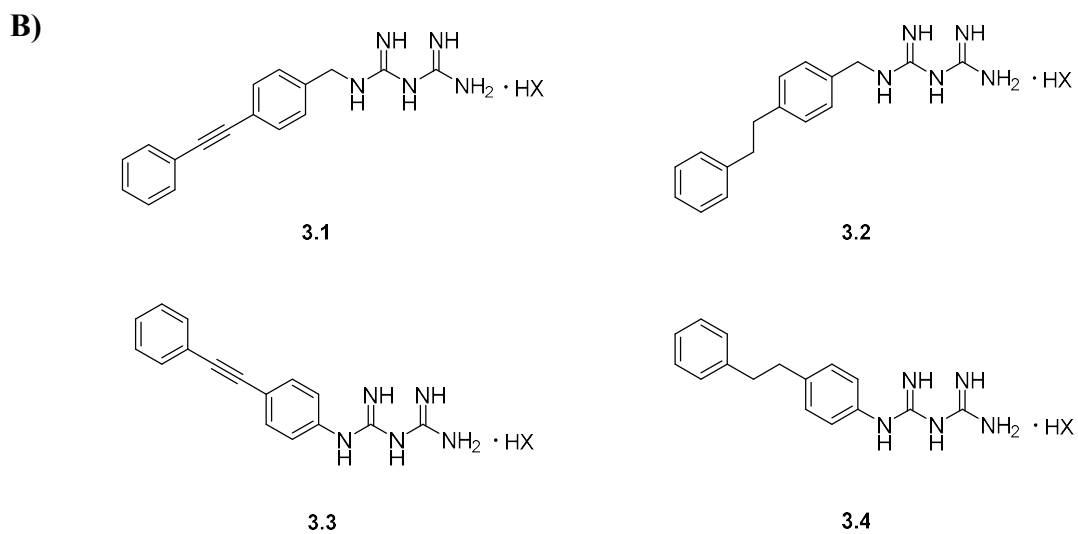
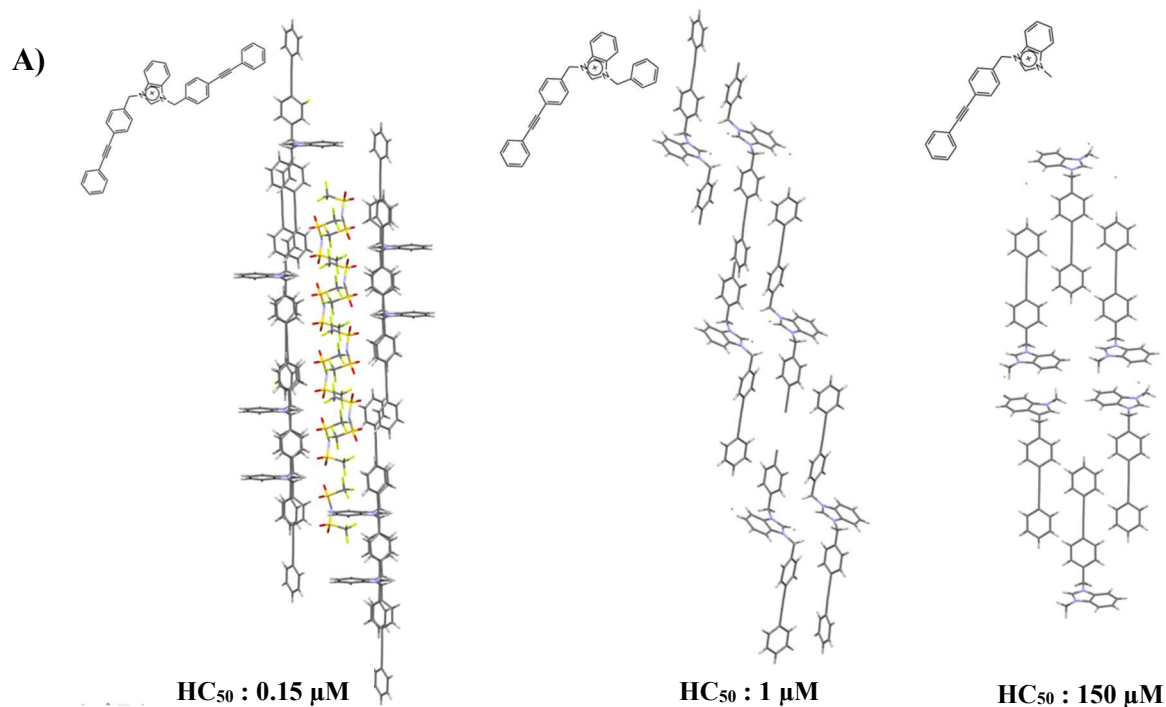
metformin analogues with lipophilic substituents and improved cellular penetration were previously reported. Narise *et al.* proposed in 2014 a series of phenformin derivatives possessing various substituents on the phenyl ring and bioisosteric replacements of the biguanide unit<sup>16</sup>. Neuzil *et al.* showed that biguanides functionalized with a mitochondria-targeting moiety such as triphenylphosphonium (TPP<sup>+</sup>) possess anticancer activities 800-fold higher than metformin<sup>17</sup>. In agreement, it has been shown that metformin exerts its anti-cancer activity at least in part by perturbing mitochondrial respiration<sup>13,18</sup>.

We have actively investigated the membrane perturbation properties of synthetic amphiphilic cationic ion transporters and antibiotics, including derivatives of phenylethynylbenzyl (PEB)-disubstituted imidazolium and benzimidazolium salts. We have demonstrated that the activities of these organic salts in artificial phospholipid bilayers or living prokaryotic and eukaryotic cells were the results of self-assembly, partition in aqueous and hydrophobic domain and phospholipidic membrane penetration<sup>19</sup>. Since all the studied organic salts containing a PEB unit in their structure were active on bacterial membranes and that mitochondria are essentially ancient bacteria trapped in eukaryotic cells, we reasoned that conjugating biguanides with the PEB unit could improve metformin's cellular/mitochondrial uptake. We generated a small library of PEB-substituted biguanidinium salts and their hydrogenated analogues and studied the capacity of these compounds to affect the growth/viability of pancreatic cancer cells. We identified a novel class of biguanide compounds with better membrane crossing abilities and more potent anticancer activity than metformin and phenformin.

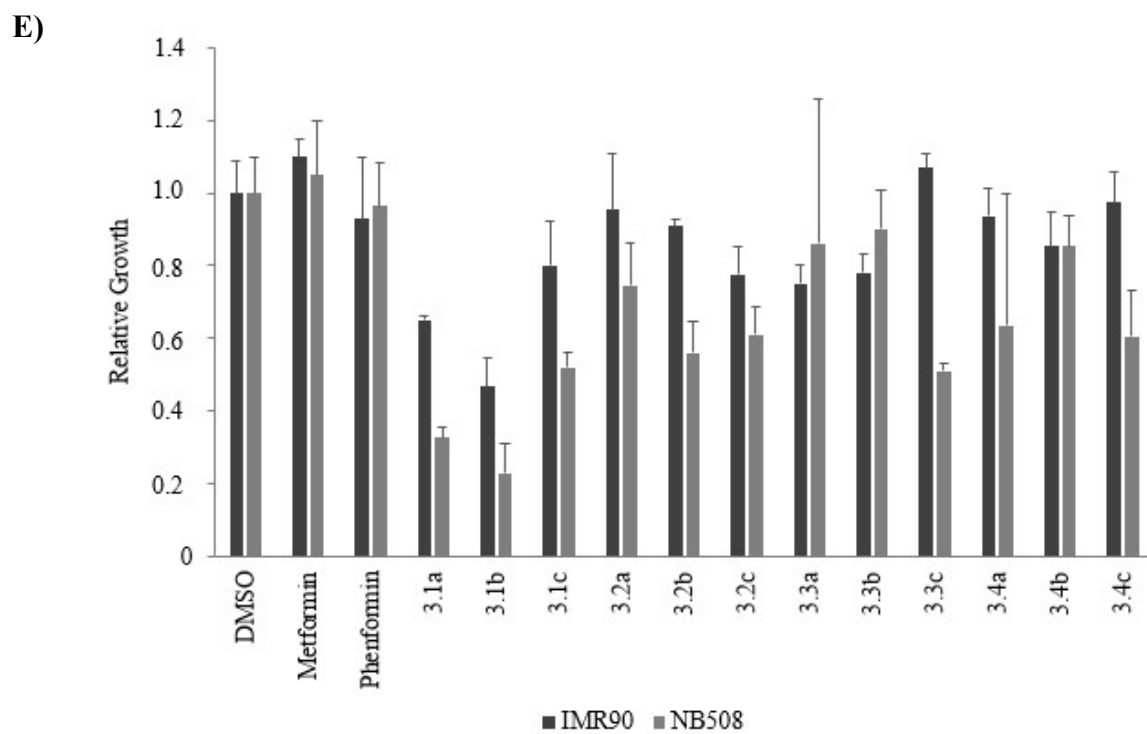
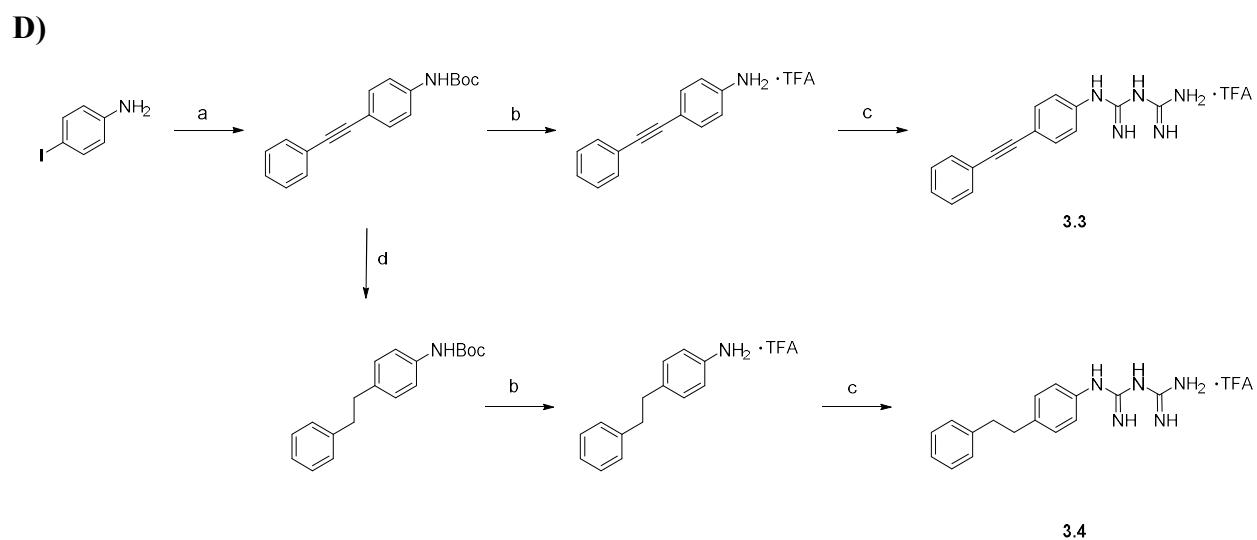
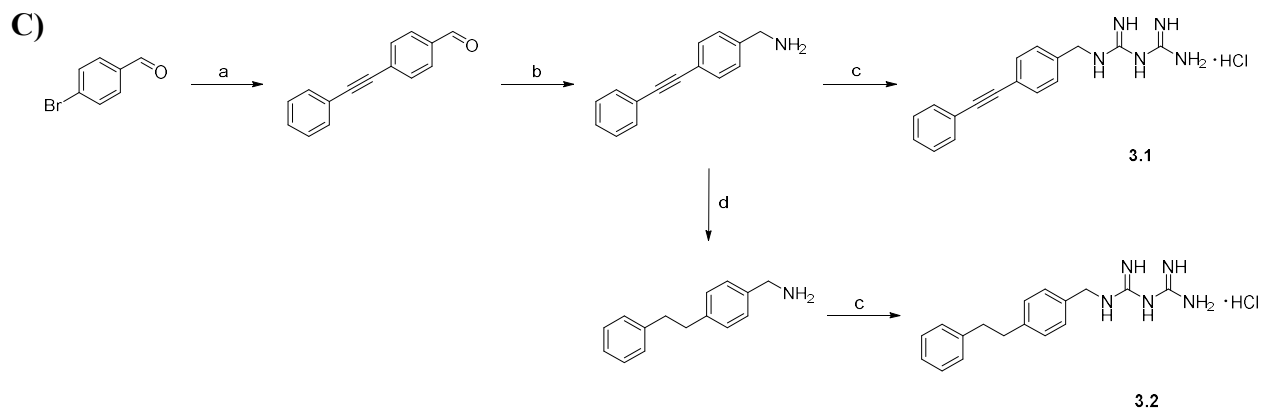
### 3.5 Results and Discussion

Phenylethynylbenzyl (PEB)-disubstituted imidazolium and benzimidazolium were shown to self-assemble inside phospholipid membranes and form stable channels through  $\pi$ - $\pi$  interactions (**fig. 3.4a**)<sup>19</sup>. The transport of protons and ions through these open channels induced membrane perturbation, depolarization and bacterial death. Although the PEB-disubstituted benzimidazolium salts were very active on bacterial membranes, their potential as mitochondrial membrane perturbators was not further explored because of their high toxicity on red blood cells

( $HC_{50}$  at 0.15 mM)<sup>19,20</sup>. The replacement of one PEB unit with a phenyl or a methyl group resulted in less toxic compounds ( $HC_{50}$  at 1  $\mu$ M for the benzyl and 150  $\mu$ M for the methyl substituent), as the crystalline structure suggests the formation of more compact aggregates in the membranes.



X = NTf<sub>2</sub> (a), OTf (b), Cl (c)



F)

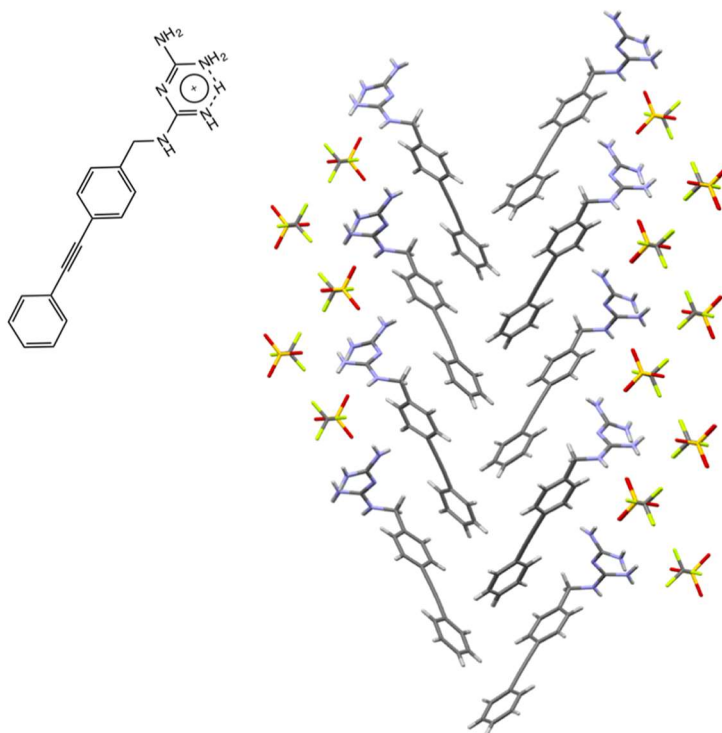


Figure 3.4 Structure and activity screening of PEB-biguanidium salts. A) Crystalline structure of previously studied PEB-substituted benzimidazolium salts<sup>89</sup> B) Structure of phenylethynylbenzyl and phenylethylbenzyl-substituted biguanidium salts C) Synthesis of 4-(phenylethynyl)benzylbiguanide **3.1** and 4-(phenylethyl)benzylbiguanide **3.2** (a) Phenylacetylene, PdCl<sub>2</sub>PPH<sub>3</sub>, CuI, PPH<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, THF, 70 °C, o.n. (b) NaCN(BH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, EtOH<sub>NH<sub>4</sub>OAc sat.</sub>/NH<sub>3</sub>, 80 °C, o.n (c) Dicyandiamide, TMSCl, THF<sub>anh.</sub>, 145 °C, 1 h (d) Pd/C 10%, H<sub>2</sub>, EtOH/AcOEt, 60 °C, 2h. D) Synthesis of 4-(phenylethynylphenyl)biguanidium **3.3** and 4-(phenylethylphenyl)biguanidium **3.4** (a) 1) Boc<sub>2</sub>O, THF, 2h, 2) Phenylacetylene, PdCl<sub>2</sub>PPH<sub>3</sub>, CuI, PPH<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, THF, 70°, o.n. (b) TFA, DCM, 60 °C, 2h (c) Dicyandiamide, TMSCl, THF<sub>anh.</sub>, 145 °C, 1 h (d) Pd/C 10%, H<sub>2</sub>, EtOH/AcOEt, 60 °C, 2h. E) Relative growth of NB508 mouse pancreatic ductal adenocarcinoma cells and IMR90 fibroblasts exposed to 5 μM of PEB-biguanidium salts (a = NTf<sub>2</sub>, b = OTf, c = Cl) . Cells were incubated for 72 h at 37 °C. F) Crystal structure of **3.1b** showing its self-assembly in the solid state.

### 3.5.1 Synthesis

PEB-biguanidium chloride **3.1c** was synthesised by the cross-coupling of 4-bromobenzaldehyde with phenylacetylene followed by the reductive amination of the aldehyde with NaCNBH<sub>3</sub>. The biguanide was then formed by reacting the amine with dicyandiamide to afford PEB-biguanidium chloride **3.1c** with 30% yield. PEB-biguanidium chloride **3.2c** was obtained by hydrogenation of 4-(phenylethynyl)benzyl amine followed by the formation of the biguanidium chloride with 20% yield (**fig.3.4c**).

PEB-biguanidium **3.3** was synthesized by the cross-coupling of BOC-protected 4-iodoaniline with phenylacetylene followed by the deprotection of the amine and the formation of the biguanidium trifluoroacetate with dicyandiamide in a 24% yield. PEB-biguanidium **3.4** was synthesized by the hydrogenation of *tert*-butyl-(4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate, deprotection of the amine and formation of the biguanidium trifluoroacetate with a 35% yield (**fig. 3.4d**).

The counter-anions of PEB-biguanidium chloride **3.1c** and **3.2c** were exchanged through the anion metastasis of chloride with either LiNTf<sub>2</sub> (**a**) or LiOTf (**b**) in methanol in quantitative yields. The counter-anions of PEB-biguanidium **3.3** and **3.4** were exchanged by the same procedure with the addition of a deprotonation step with NaHCO<sub>3</sub> before the ion exchange step.

### 3.5.2 *In vitro* screening

The biguanidium salts possessing various counter-anions were first screened for the growth inhibition of mouse pancreatic ductal adenocarcinoma cells NB508 and normal human fibroblasts IMR90 (**fig 3.4e**), at 5 μM. Almost all the tested compounds inhibited the growth of cancer cells at this concentration, while no effect was observed for metformin and phenformin at the same concentration. The most important antiproliferative activities were observed for **3.1a** and **3.1b**, both with selectivity towards cancer cells among the best observed.

The toxicity of PEB-biguanidium salts was estimated through their hemolytic activity by incubating red blood cells (RBC) with the compounds for 1 hour (*See supporting information*). A very low hemolytic activity (under 10%) was observed for all the compounds,

even at concentrations up to 150  $\mu\text{M}$ . As RBC are mainly composed of a plasma membrane enveloping hemoglobin, the low hemolysis observed indicates that PEB-biguanidium salts are not disrupting RBC's membranes, contrary to the previously reported benzimidazolium salts<sup>21,22</sup>.

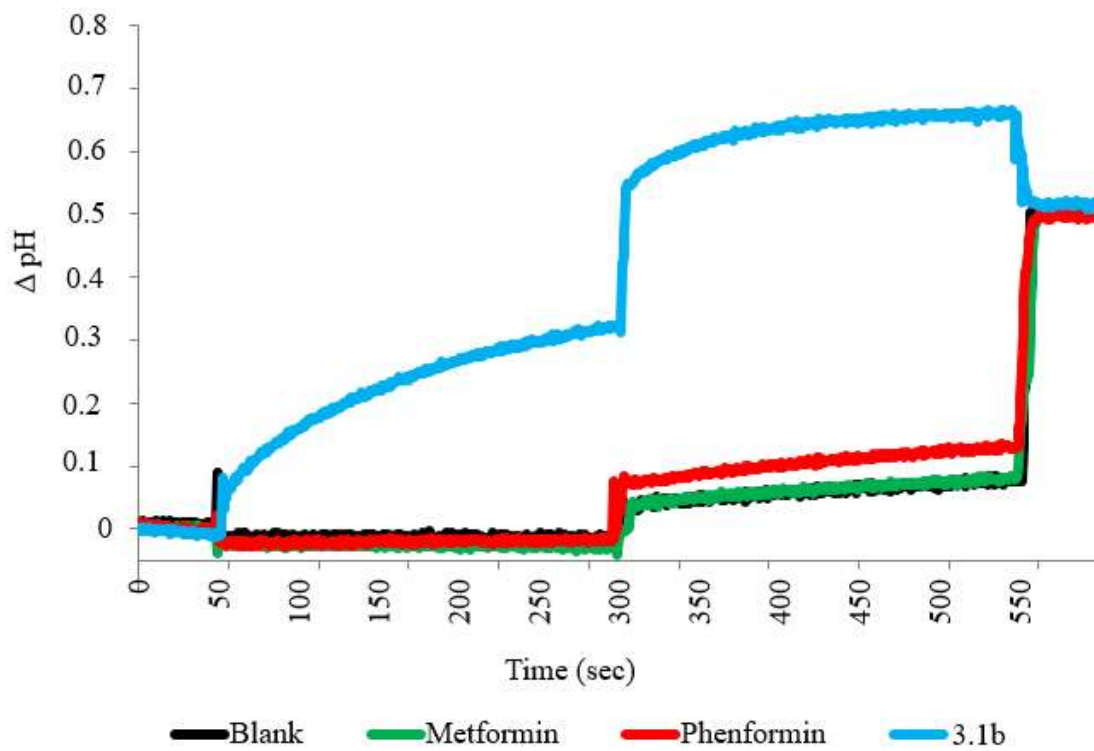
### 3.5.3 Membrane activity

As compounds **3.1a-c** showed good inhibition of cancer cells growth and low activity on fibroblasts, they were considered for further investigation. Among these, compound **3.1b** was the only one with good methanol and DMSO solubility even at high concentrations and was taken forward for further investigation. The logP of compound **3.1b** (0.4) is much higher than metformin (-1.4)<sup>23</sup> and phenformin (-0.8)<sup>24</sup>, indicating its higher hydrophobicity and higher membrane permeability. The ability of **3.1b** to penetrate and cross phospholipid membranes, compared to metformin and phenformin, was studied by a U-tube experiment, where two aqueous phases are separated by a bulk hydrophobic solvent such as chloroform, to mimic a bilayer membrane. A compound able to penetrate and cross a phospholipid bilayer is able, in these conditions, to partition into water and chloroform. A concentration of 250  $\mu\text{M}$  of biguanide was added to the *cis*-aqueous side and the concentration of the *trans*-side was measured after 48h and 72h. Compound **3.1b** was able to partition rapidly into the chloroform and cross to the *trans*-aqueous side, while only traces of metformin and phenformin were measured even after 72h (**fig. 3.5a**).

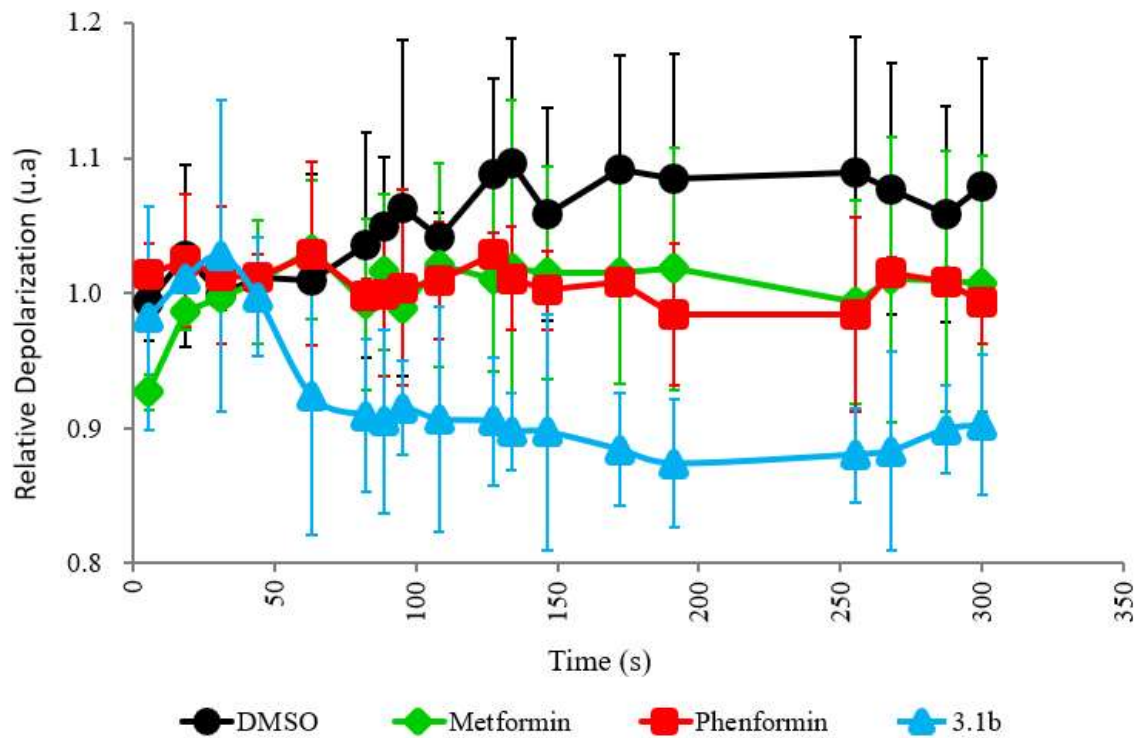
A)

	48 h ( $\mu\text{M}$ )	72 h ( $\mu\text{M}$ )
<b>Metformin</b>	-	-
<b>Phenformin</b>	-	-
<b>3.1b</b>	65 $\pm$ 23	92 $\pm$ 12

B)



C)





D)

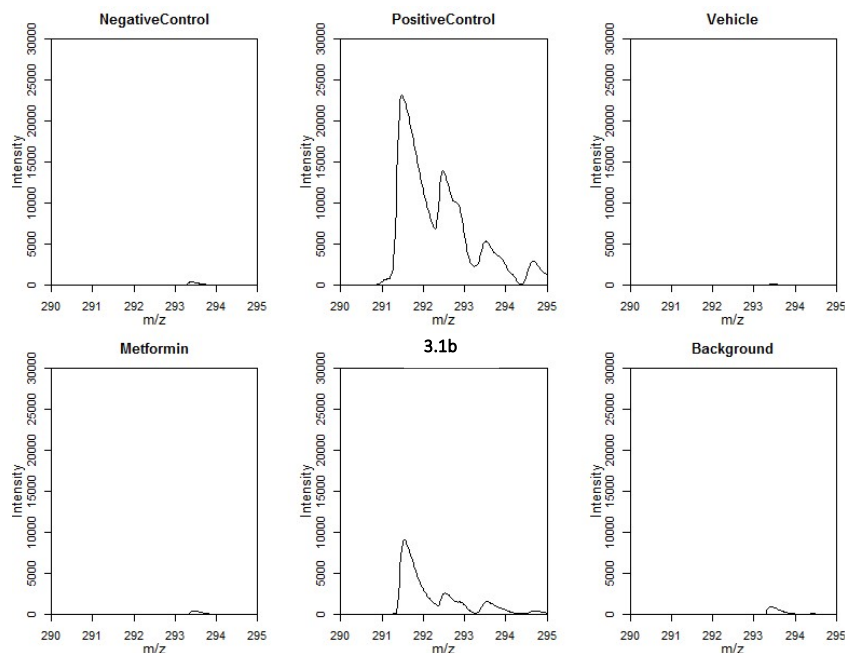


Figure 3.5 Membrane activity of PEB-biguanidium salts. A) Partitioning of biguanidium salts in a U-tube experiment. Concentration of biguanide on the *trans*-side of the U-tube at 48 h and 72 h at 25 °C, after addition of 250  $\mu$ M of biguanide on the *cis*-side. B) Variation in the internal pH of HPTS-containing EYPC liposomes. Intravesicular solution: 1 mM HPTS, 10 mM HEPES, and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4, and extravesicular solution: 10 mM HEPES and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4. Biguanidium salts were injected after 50 sec at 5 mM (50 mol% relative to the 10 mM EYPC concentration), a NaOH pulse was induced at 300 sec, and the liposomes were lysed with Triton-X at 550 sec. Each curve is the average of three independent measurements. C) Fluorescence of safranin-O in the EYPC liposomes. Biguanidium salts were injected at 5 mM (50 mol% relative to the 10 mM EYPC concentration) at 50 sec. Each curve is the average of three independent measurements. D) Mitochondrial penetration of compound **3.1b** and metformin determined by mass spectrometry. Mitochondrial isolation was performed according to<sup>25</sup>. For each experiment, an anti-HA IP was performed on KP4 cells expressing pMXs-3XHA-EGFP-OMP25 that were treated for 3 hours with 15  $\mu$ M metformin, 15  $\mu$ M compound 3.1b or vehicle (DMSO). Negative control was realized with MeOH, positive control with **3.1b** directly.

Despite its structural similarity with the PEB-substituted benzimidazolium synthetic transporters and its ability to penetrate phospholipid membranes, compound **3.1b** did not transport chloride across the phospholipid membrane of EYPC-LUVs (*See supporting information*). As it can be observed in the solid-state structure obtained from chloroform, **3.1b** does not form channel-like supramolecular architectures but self-assembles into herringbone-shaped interlocked dimers that do not seem to possess chloride transport properties (**fig. 3.4f**).

However, when using EYPC-LUVs containing 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) as a pH-sensitive probe, a change of the internal vesicular pH was observed when compound **3.1b** was added (**fig. 3.5b**). Initially, the pH was neutral and equal in both the extra and intravesicular solution. Upon injection of the compound we observed a basification of the internal liposomal solution. This basification was further enhanced with the addition of a base pulse to the external solution at 300 sec, indicating either a transport of protons to the extravesicular solution or the transport of hydroxide to the intravesicular solution. This was also reported for alkylbiguanidium salts and was described as an electrogenic process, *i.e.* the transmembrane transport of an ion without the balance of the charge through the movement of another ion, which usually results in a charge transfer<sup>21</sup>. Compound **3.1b**, like alkylbiguanidium salts, was not able to transport chloride, so the electroneutral hypothesis of a  $H^+/Cl^-$  antiport or  $OH^-/Cl^-$  symport can be rejected and the hypothesis of the electrogenic transport mechanism can be suggested. Metformin and phenformin showed no membrane activity in these experiments.

The transport of  $H^+/OH^-$  ions across the membrane is an electrogenic mechanism that usually causes the depolarization of the electrochemical gradient across phospholipid membranes. When EYPC liposomes containing intravesicular  $K^+$  ions are bathing in an extravesicular solution containing  $Na^+$  ions, a small membrane potential is generated at their membranes and the fluorescence of safranin-O can be used as a membrane potential probe<sup>26</sup>. The addition of **3.1b** to the external solution of these safranin-O-containing liposomes resulted in a decrease of the safranin-O's fluorescence intensity, indicating a depolarization of the membrane (**fig. 3.5c**).

Mitochondrial membrane potential together with the proton gradient are responsible for ATP production<sup>27</sup> and maintenance of cellular health and function. Compounds able to penetrate mitochondria and alter their membrane potential are usually used as chemotherapeutics.

Compound **3.1b**, but not metformin, was able to efficiently penetrate mitochondria after a short incubation of cells with 15  $\mu\text{M}$  concentration of each drug (**fig. 3.5d**). This indicates that compound **3.1b** easily diffuses into mitochondria, unlike metformin that requires a specialized transporter<sup>28</sup>. These experiments altogether indicate that **3.1b** is able to penetrate phospholipid and mitochondrial membranes and alter their potential.

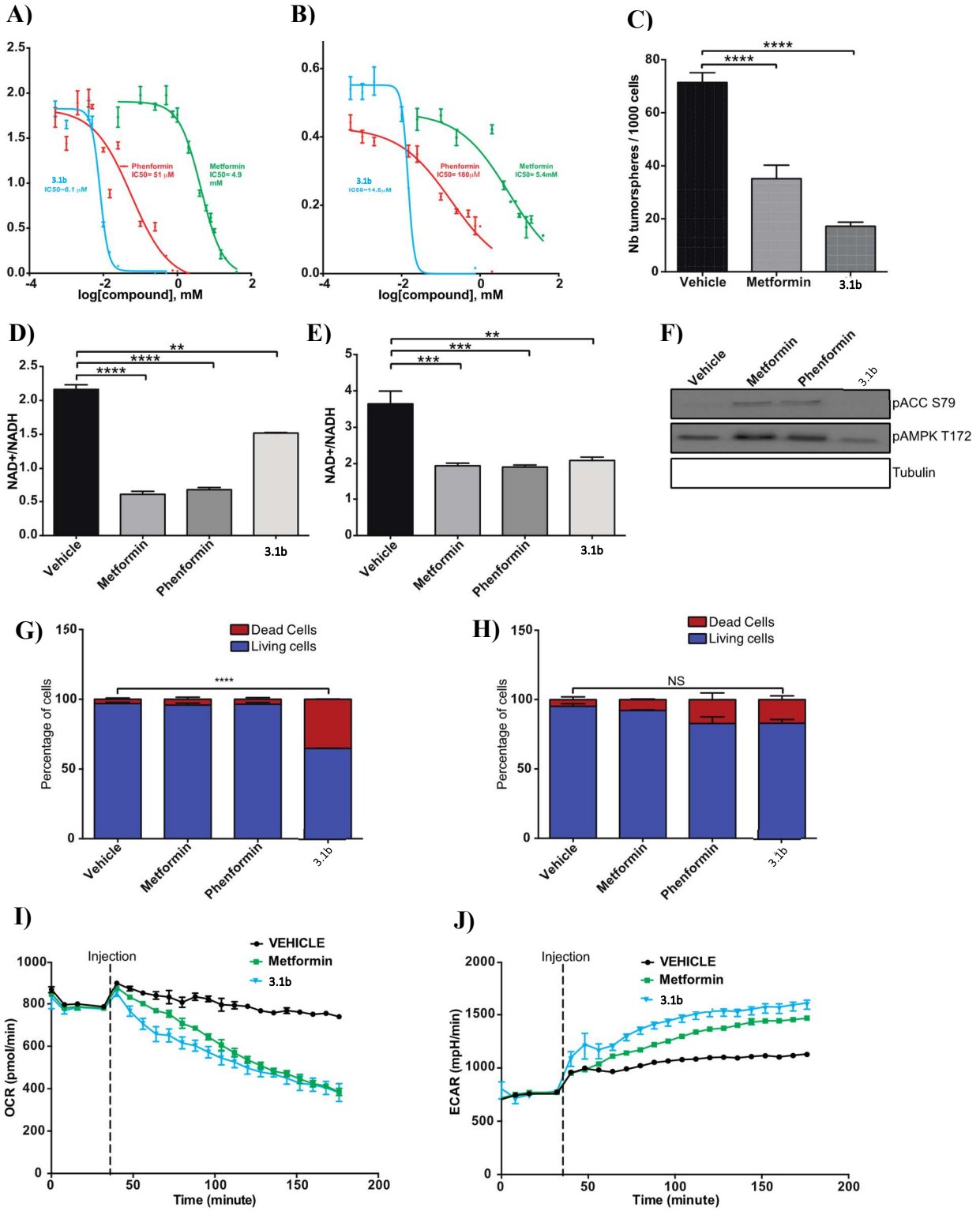
### 3.5.4 Antiproliferative activity *in vitro* and mechanism of action

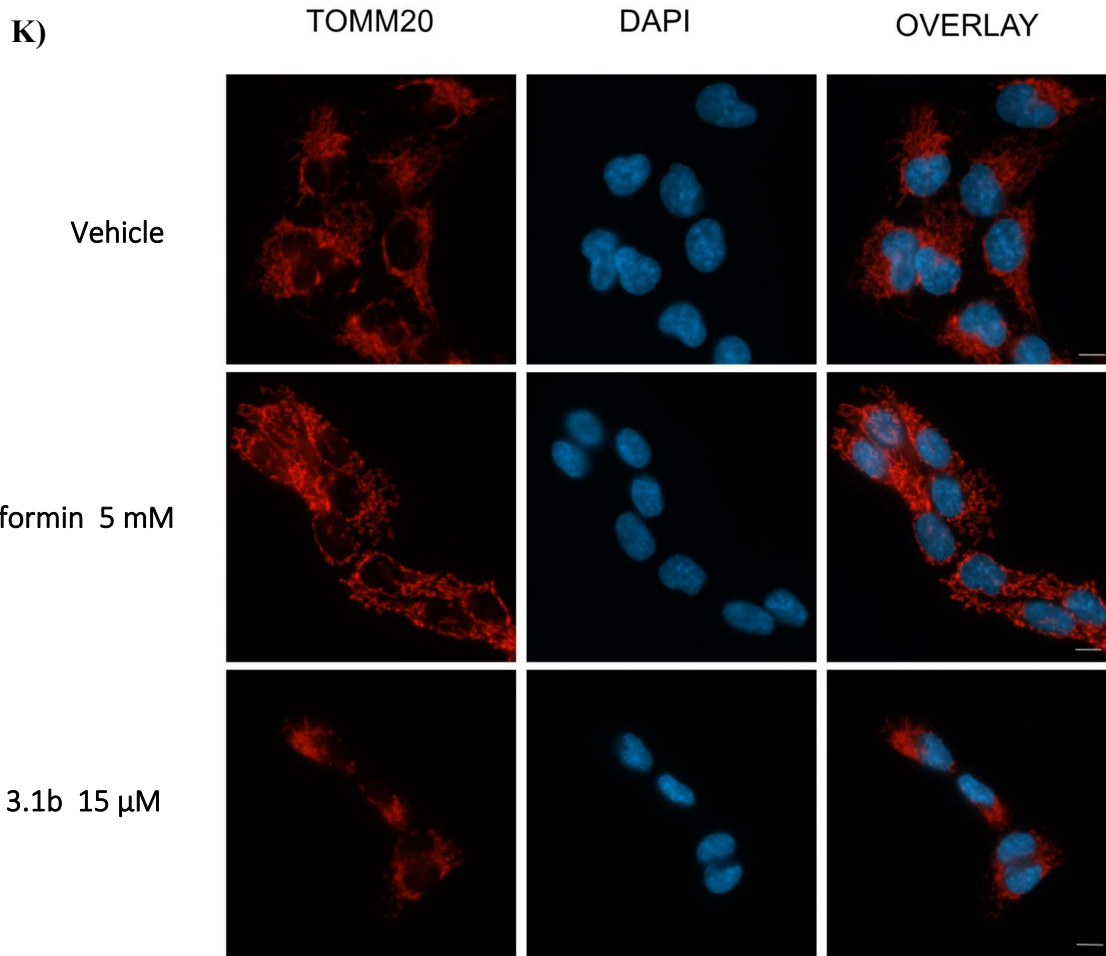
In order to compare the antiproliferative/anticancer activity of compound **3.1b** to that of the most commonly studied biguanides metformin and phenformin, we performed growth assays with human PDAC cell lines over 3 days in the presence of various concentrations of these compounds. The results showed that both in KP4 cells (**fig. 3.6a**) and in Panc1 cells (**fig. 3.6b**) metformin has an  $\text{IC}_{50}$  of about 5 mM. Phenformin, with a hydrophobic phenyl group, has a lower  $\text{IC}_{50}$ : 51  $\mu\text{M}$  in KP4 and 180  $\mu\text{M}$  in Panc1 cells. Compound **3.1b** showed  $\text{IC}_{50}$  of 6.1  $\mu\text{M}$  in KP4 cells and 15  $\mu\text{M}$  in Panc1 cells, 100-800 fold lower than metformin and 8-12 fold lower than phenformin.

We have recently shown that a short treatment (24 h) with metformin on the mouse PDAC cell line AH375 grown adherent in 2 dimensions decreases the ability of this cell line to subsequently grow as spheres in suspension, indicating an effect on cancer initiating cells with stem-like properties<sup>29</sup>. Here again compound **3.1b** shows a better biological activity than metformin (**fig. 3.6c**) as it decreases by 75% the number of AH375 spheres when treated for 24 h with 5  $\mu\text{M}$  of **3.1b**, while metformin at 1 mM results in a less marked decrease of 50%. In agreement the higher ability of **3.1b** to inhibit cancer cells, we observed that compound **3.1b** induces a significant increase ( $\sim 20\%$ ) of the fraction of dead KP4 cells (**fig. 3.6g**) treated at 15  $\mu\text{M}$  for 24 h (measured by trypan blue exclusion) while metformin (5 mM) and phenformin (50  $\mu\text{M}$ ) had no significant effects. In contrast with its effect in PDAC cells (KP4), compound **3.1b** did not significantly increase the fraction of dead cells in normal immortalized non-tumorigenic pancreatic human cells HPNE hTERT in the same conditions (**fig. 3.6h**), suggesting selectivity towards cancer cells.

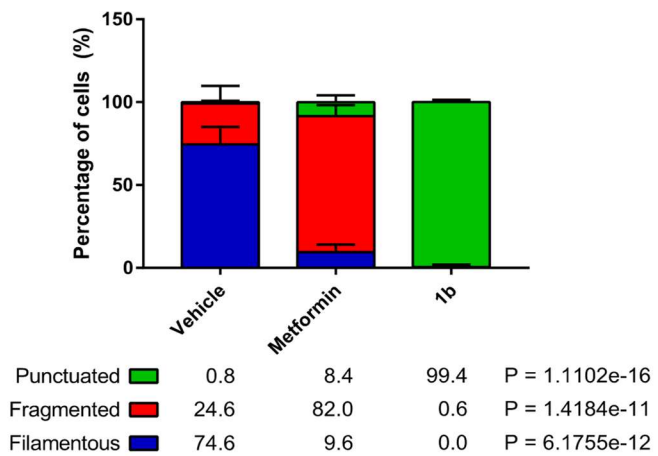
To better characterize the molecular mechanism of action of compound **3.1b** we measured the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio as it was shown that metformin decreases this ratio through inhibition of mitochondrial respiration<sup>30</sup>. In agreement, both in pancreatic cancer PSN1 cells (**fig. 3.6d**) and KP4 cells (**fig. 3.6e**) compound **3.1b** (15 μM) decreased NAD<sup>+</sup>/NADH ratio by 25 % and 40 % respectively, as did phenformin (50 μM) and metformin (5 mM). These results suggest that, as metformin and phenformin do, compound **3.1b** is able to inhibit mitochondrial respiration, but at a much lower concentration. However, contrary to metformin and phenformin<sup>31</sup>, compound **3.1b** does not activate phosphorylation of AMPK on T172 and that of the AMPK-target ACC (acetyl-CoA carboxylase) (**fig. 3.6f**).

Next, we used the Seahorse analyser to quantify the ability of compound **3.1b** to affect oxygen consumption rate (OCR) in KP4 cells. We were able to determine that compound **3.1b** inhibited OCR at 15 μM, similarly to metformin at 5 mM (**fig. 3.6i**). Inhibition of OCR by metformin was simultaneously associated with an increase of the ECAR (roughly: glycolysis), which was also observed with compound **3.1b** (**fig. 3.6j**). These data suggest that the anticancer activity of compound **3.1b** is due at least in part to the inhibition of mitochondrial respiration, similar to metformin, but at much lower concentration. To further confirm this idea we visualized mitochondria in cells treated with biguanides. Both compound **3.1b** and metformin led to a lost of the filamentous mitochondrial network but compound **3.1b** had a bigger impact in mitochondrial morphology leading to a punctuated pattern typical of very dysfunctional mitochondria (**fig. 3.6k**). Together these data show that compound **3.1b** functions as metformin or phenformin but with a much higher activity, presumably due to its intrinsic chemical characteristics and membrane activity.





**L) Mitochondrial Ultrastructure**



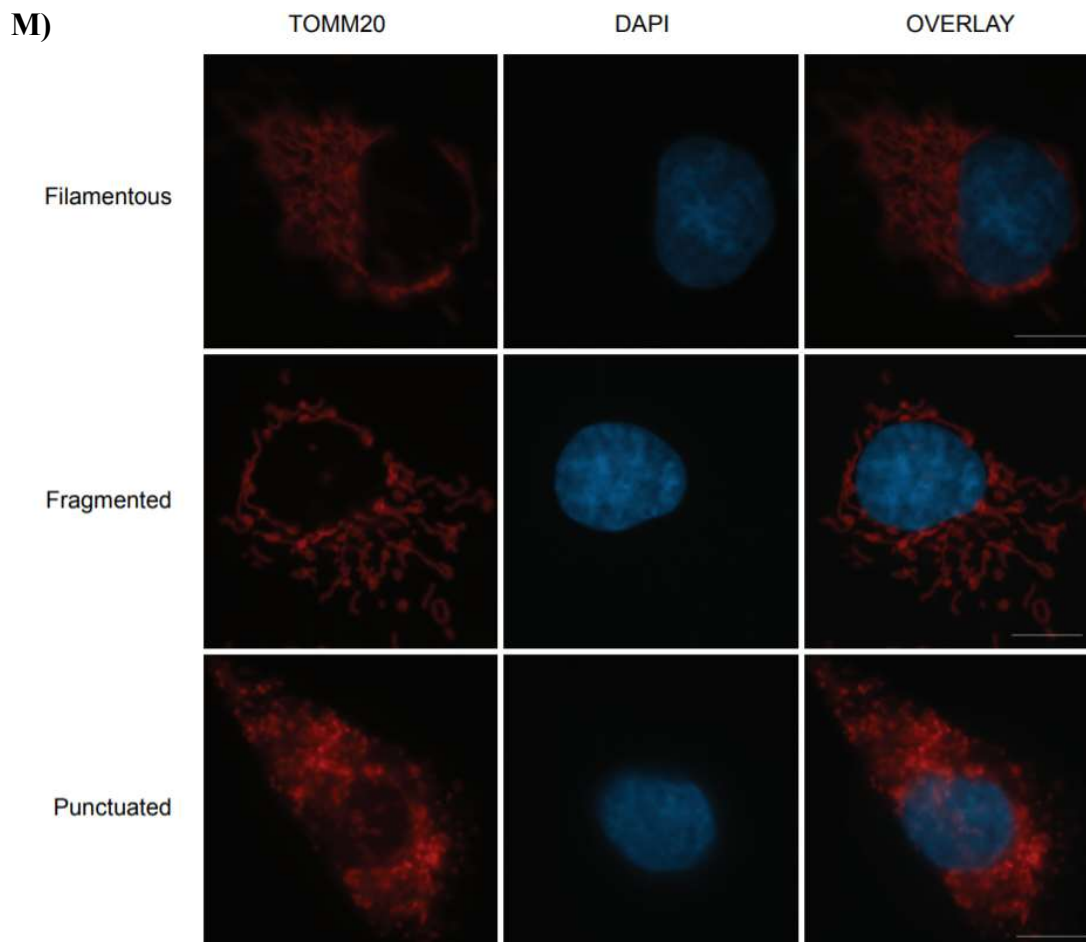


Figure 3.6 Antiproliferative activity and mechanism of action of PEB-biguanidium **3.1b**. A) IC<sub>50</sub> of metformin, phenformin and compound **3.1b** performed *in vitro* over 3 days on KP4 cells. B) IC<sub>50</sub> of metformin, phenformin and compound **3.1b** performed *in vitro* over 3 days on Panc1 cells. C) Effect on the formation of tumorspheres in AH375 cells grown in suspension (mouse pancreatic ductal adenocarcinoma) treated for 24 h with metformin (1 mM) or compound **3.1b** (5 μM). \*\*\*\* p≤0.0001 (ANOVA). D) Effect on NAD<sup>+</sup>/NADH ratio in PSN1 cells treated for 6 h with metformin (10 mM), phenformin (100 μM) or compound **3.1b** (25 μM). \*\* p≤0.01, \*\*\*\* p≤0.0001 (ANOVA). E) Effect on NAD<sup>+</sup>/NADH ratio in KP4 cells treated for 18 h with metformin (5 mM), phenformin (50 μM) or compound **3.1b** (15 μM). \*\* p≤0.01, \*\*\* p≤0.001 (ANOVA). F) Effect on phosphorylation level of AMPK T172 and ACC S79 in KP4 cells treated for 24 h with metformin (5 mM), phenformin (50 μM) or compound **3.1b** (15 μM). G) Effect on cell

viability in KP4 cells treated for 24 h with metformin (5 mM), phenformin (50  $\mu$ M) or compound **3.1b** (15  $\mu$ M). H) Effect on cell viability in HPNE hTERT cells treated for 24 h with metformin (5 mM), phenformin (50  $\mu$ M) or compound **3.1b** (15  $\mu$ M). \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , NS: not significant (ANOVA). I) Effect on oxygen consumption rate (OCR) measured by Seahorse analysis in KP4 cells treated with metformin (10 mM) or compound **3.1b** (15  $\mu$ M). J) Effect on extracellular acidification rate (ECAR) measured by Seahorse analysis in KP4 cells treated with metformin (10 mM) or compound **3.1b** (15  $\mu$ M). K) Mitochondrial morphology in KP-4 cells 24h following the indicated treatments as visualised by anti-TOMM20 immunofluorescence. Scale bar = 10  $\mu$ M. L) Quantification of the percentage of cells exhibiting filamentous, fragmented or punctuated mitochondria following indicated treatments. The data represents the mean of 2 biological replicates and for each replicate three counts of 50 cells were done.  $n = 300$  cells per treatment. Data was analyzed with one way Anova followed by Tukey HSD test. M) Mitochondrial morphology as visualised by immunofluorescence with anti-TOMM20 antibody. The filamentous structure is from KP4 cells treated with vehicle, the fragmented structure is from KP4 cells treated with metformin, and the punctuated structure is from KP4 cells treated with **3.1b**. Scale bar = 10  $\mu$ m.

### 3.5.5 Antiproliferative activity *in vivo*

To determine whether compound **3.1b** is also superior to phenformin *in vivo*, mice were engrafted with subcutaneous KP4 PDAC cells tumors. After randomization, mice received either phenformin ( $n = 6$  mice, 2 tumors per mouse), compound **3.1b** ( $n = 17$  mice, 2 tumors per mouse) both at (50 mg/kg/d IP, 5 d/week) or vehicle ( $n = 10$  mice, 2 tumors per mouse). Compound **3.1b** significantly reduced tumor volume (**fig. 3.7a**) and mice survival time (see section A2.11) while phenformin administered at the same dose had only modest or non-significant effects. Together our data show that *in vivo*, compound **3.1b** is well tolerated and more effective than the most active biguanide used currently in human, phenformin.



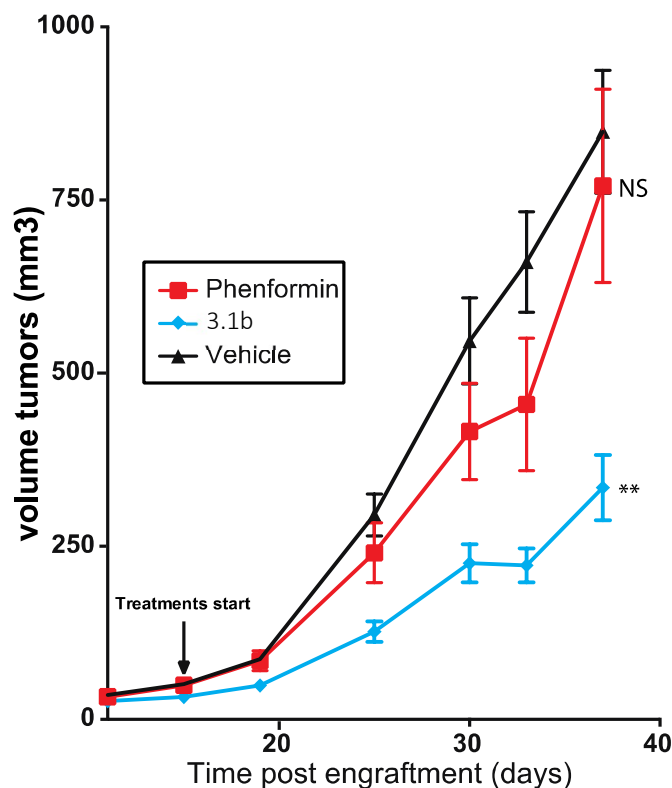


Figure 3.7 Progression of the volume of KP4 cells sub-cutaneous xenografts performed in nude mice over 37 days. Treatments with phenformin or compound **3.1b** (both at 50 mg/kg/d, 5 days a week) or vehicle were started 11 days post engraftment. \*\*  $p \leq 0.01$ , NS: not significant (ANOVA).

### 3.6 Conclusion

In conclusion, by screening a small library of phenylethynylbenzyl-modified metformin analogs we identified a compound able to penetrate mitochondrial membranes, 800-fold more antiproliferative than metformin. Compound **3.1b** selectively induces the death of PDAC cells (KP4), at least in part by the inhibition of mitochondrial respiration, in a similar way to metformin but at much lower concentration (15  $\mu\text{M}$  versus 5 mM). Compound **3.1b** is more active than metformin and phenformin to inhibit the proliferation of PDAC cells *in vivo*, as it

significantly inhibits the growth of xenografts and increases mouse survival time. We demonstrate herein that the anticancerous properties of biguanides can be improved by chemical modifications. Our new PEB-biguanidium constitute a first-class lead compound that can be used to target mitochondria in pancreatic cancer and other cancers.

### 3.7 Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Canadian Cancer Society (CCS), the Cancer Research Society, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQ-NT), and Fonds Marguerite Ruel pour la Recherche sur le Cancer - Université de Montréal for financial support. G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research at the CRCHUM.

### 3.8 References

1. Gokel, G. W.; Daschbach, M. M., *Coord Chem Rev* **2008**, 252 (8-9), 886.
2. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M., *Cold Spring Harb Protoc* **2016**, 2016 (4).
3. Crowley, L. C.; Marfell, B. J.; Christensen, M. E.; Waterhouse, N. J., *Cold Spring Harb Protoc* **2016**, 2016 (7).
4. Johnson, S.; Chen, H.; Lo, P.-K., *Bio-Protocol* **2013**, 3 (3).
5. Mahmood, T.; Yang, P. C., *N Am J Med Sci* **2012**, 4 (9), 429.
6. Zhang, J.; Zhang, Q., *Methods Mol Biol* **2019**, 1928, 353.
7. Barone, B. B.; Yeh, H. C.; Snyder, C. F.; Peairs, K. S.; Stein, K. B.; Derr, R. L.; Wolff, A. C.; Brancati, F. L., *JAMA* **2008**, 300 (23), 2754.
8. Giovannucci, E.; Harlan, D. M.; Archer, M. C.; Bergental, R. M.; Gapstur, S. M.; Habel, L. A.; Pollak, M.; Regensteiner, J. G.; Yee, D., *CA Cancer J Clin* **2010**, 60 (4), 207.
9. Ben Sahra, I.; Le Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J. F.; Bost, F., *Mol Cancer Ther* **2010**, 9 (5), 1092.

10. Kordes, S.; Pollak, M. N.; Zwinderman, A. H.; Mathôt, R. A.; Weterman, M. J.; Beeker, A.; Punt, C. J.; Richel, D. J.; Wilmink, J. W., *Lancet Oncol* **2015**, *16* (7), 839.
11. Coyle, C.; Cafferty, F. H.; Vale, C.; Langley, R. E., *Ann Oncol* **2016**, *27* (12), 2184.
12. Bhaw-Luximon, A.; Jhurry, D., *J Cancer Res Clin Oncol* **2016**, *142* (10), 2159.
13. Wheaton, W. W.; Weinberg, S. E.; Hamanaka, R. B.; Soberanes, S.; Sullivan, L. B.; Anso, E.; Glasauer, A.; Dufour, E.; Mutlu, G. M.; Budigner, G. S.; Chandel, N. S., *Elife* **2014**, *3*, e02242.
14. Owen, M. R.; Doran, E.; Halestrap, A. P., *Biochem J* **2000**, *348* (3), 607.
15. Chandel, N. S.; Avizonis, D.; Reczek, C. R.; Weinberg, S. E.; Menz, S.; Neuhaus, R.; Christian, S.; Haegebarth, A.; Algire, C.; Pollak, M., *Cell metab* **2016**, *23* (4), 569.
16. Narise, K.; Okuda, K.; Enomoto, Y.; Hirayama, T.; Nagasawa, H., *Drug Des Devel Ther* **2014**, *8*, 701.
17. Boukalova, S.; Stursa, J.; Werner, L.; Ezrova, Z.; Cerny, J.; Bezawork-Geleta, A.; Pecinova, A.; Dong, L.; Drahotka, Z.; Neuzil, J., *Mol Cancer Ther* **2016**, *15* (12), 2875.
18. Andrzejewski, S.; Gravel, S. P.; Pollak, M.; St-Pierre, J., *Cancer Metab* **2014**, *2*, 12.
19. Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R., *Org Biomol Chem* **2013**, *11* (6), 923.
20. Vidal, M.; Elie, C. R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R., *Med Chem Comm* **2014**, *5* (4), 436.
21. Hébert, A.; Parisotto, M.; Ferbeyre, G.; Schmitzer, A. R., *Supramol Chem* **2018**, *31* (3), 127-139.
22. Vidal, M.; Elie, C.-R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R., *Med Chem Comm* **2014**, *5* (4), 436.
23. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Metformin, C., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin> (accessed on July 19, 2019).
24. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Phenformin, C., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenformin> (accessed on July 19, 2019).
25. Chen, W. W.; Freinkman, E.; Wang, T.; Birsoy, K.; Sabatini, D. M., *Cell* **2016**, *166* (5), 1324.
26. Zha, H. Y.; Shen, B.; Yau, K. H.; Li, S. T.; Yao, X. Q.; Yang, D., *Org Biomol Chem* **2014**, *12* (41), 8174.

27. Zorova, L. D.; Popkov, V. A.; Plotnikov, E. Y.; Silachev, D. N.; Pevzner, I. B.; Jankauskas, S. S.; Babenko, V. A.; Zorov, S. D.; Balakireva, A. V.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J.; Zorov, D. B., *Anal Biochem* **2018**, *552*, 50.
28. Kimura, N.; Okuda, M.; Inui, K.-i., *Pharm. Res.* **2005**, *22* (2), 255.
29. Deschenes-Simard, X.; Parisotto, M.; Rowell, M. C.; Le Calve, B.; Igelmann, S.; Moineau-Vallee, K.; Saint-Germain, E.; Kalegari, P.; Bourdeau, V.; Kottakis, F.; Bardeesy, N.; Ferbeyre, G., *Aging Cell* **2019**, e12889.
30. Birsoy, K.; Possemato, R.; Lorbeer, F. K.; Bayraktar, E. C.; Thiru, P.; Yucel, B.; Wang, T.; Chen, W. W.; Clish, C. B.; Sabatini, D. M., *Nature* **2014**, *508* (7494), 108.
31. Hardie, D. G., *Gastroenterology* **2006**, *131* (3), 974.

# Chapitre 4 : Propriétés antibactériennes et anticancéreuses de nouveaux sels de biguanidium

## 4.1 Introduction

Nos travaux précédents sur les transporteurs ioniques synthétiques nous ont permis de mettre en évidence le fait que des petites modifications de la structure affectent largement leur capacité de pénétration membranaire. Par exemple, l'addition d'un bras aromatique qui favorise l'assemblage supramoléculaire du transporteur, le changement du contre-ion ou encore l'ajout d'un atome de carbone supplémentaire dans la structure sont tous des facteurs qui jouent sur l'amphiphilie et la partition d'un composé dans la membrane hydrophobe<sup>1-3</sup>. Cet effet fut déjà remarqué sur les propriétés de transport des sels de biguanidium présentées au chapitre 2, où la simple modification de la longueur de la chaîne carbonée amène un changement drastique des propriétés de dépolarisation membranaire et des propriétés antibactériennes. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à l'effet des modifications structurales sur les propriétés biologiques des sels de biguanidium, dans le but de trouver des composés présentant une meilleure activité anticancéreuse que les sels de biguanidium présentés au chapitre 3.

Pour ce faire, nous avons synthétisé une petite librairie de nouveaux composés simples inspirés de la phenformine, présentés à la **figure 4.1**. Les propriétés d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses et des cellules saines et l'activité hémolytique sur les globules rouges de ces composés ont été étudiées. Nous avons inclus dans ces études les sels d'alkylbiguanidium présentés au chapitre 2 et les sels de PEB-biguanidium présentés au chapitre 3 avec différents contre-ions. Les sels de biguanidium étant généralement reconnus pour leurs propriétés antibactériennes, nous avons aussi étudié la librairie de composés sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

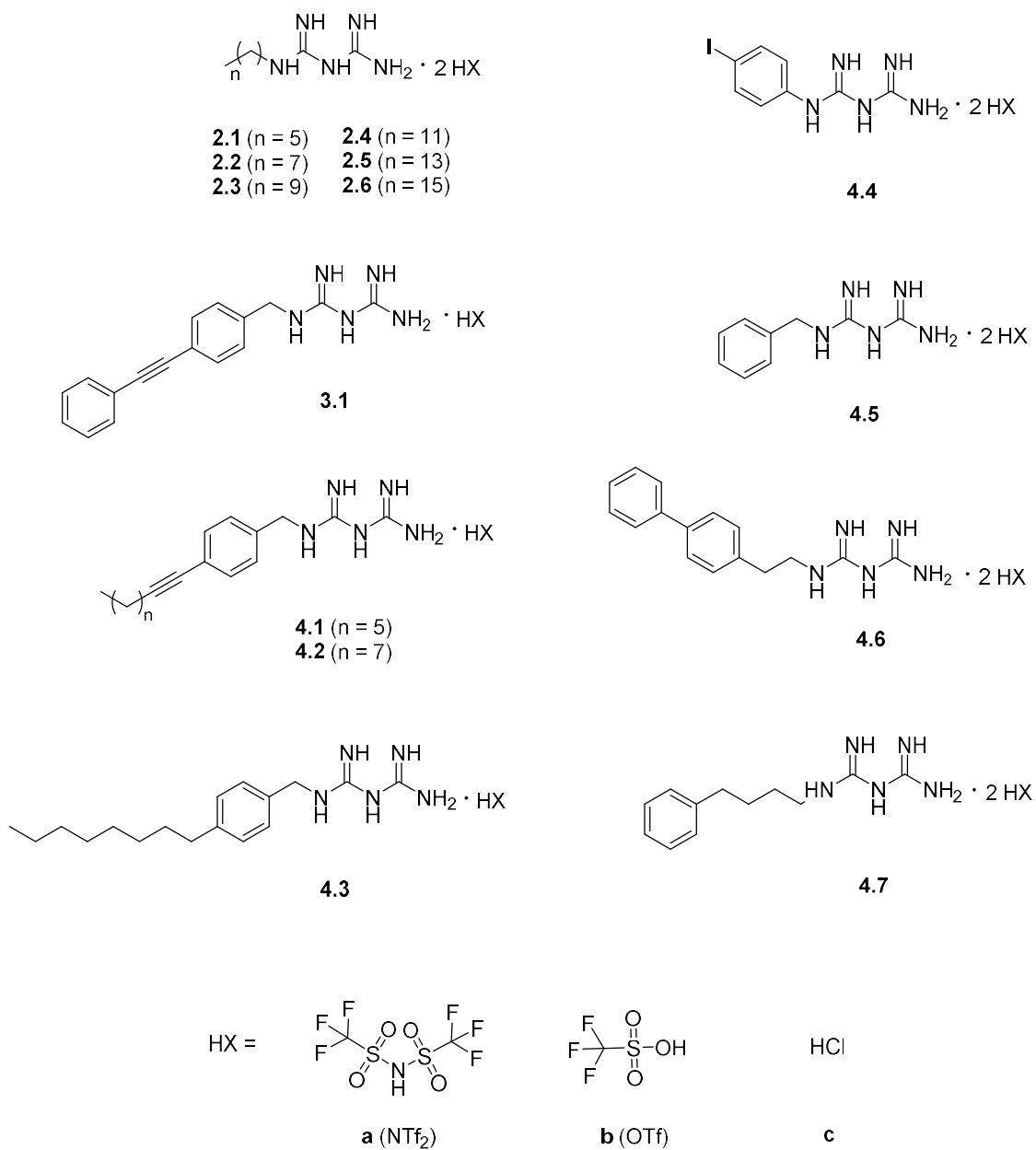
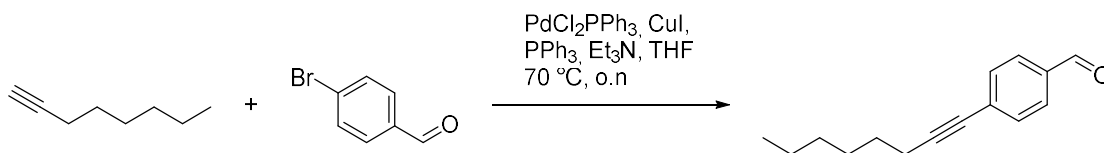


Figure 4.1 Structure des sels de biguanidium étudiés dans ce chapitre

## 4.2 Partie expérimentale

Tous les produits chimiques furent achetés chez Aldrich Chemicals à la plus grande pureté et utilisés sans plus de purification. Le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO- $d_6$ ) et le chloroforme deutéré ( $CDCl_3$ ) furent achetés chez CDN isotopes. Les spectres RMN furent enregistrés sur un Bruker Advance 400. Les constantes de couplages sont données en hertz (Hz) et les déplacements chimiques en partie par million (ppm,  $\delta$ ) mesurés relativement au solvant résiduel (la multiplicité des signaux est donnée comme s : singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet, qn : quintuplet). La spectrométrie de masse de haute résolution (HRMS) est enregistrée sur un TSQ Quantum Ultra Triple Quadrupole (Thermo Scientific) avec des instruments de mesure de masse adaptés (Laboratoire de spectrométrie de masse, Université de Montréal). Les mesures d'hémolyse furent effectuées sur un Fluostar Optima Plate Reader. Les mesures d'absorbance des  $IC_{50}$  furent effectuées sur une lectrice de plaque Spectra Max 190.

### 4-(oct-1-yn-1-yl)benzaldéhyde

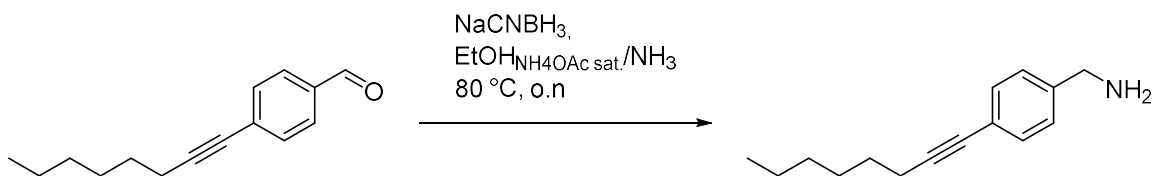


Le 4-bromobenzaldéhyde (0.30 g, 1.62 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.023 g, 0.03 mmol), CuI (0.006 g, 0.03 mmol) et la triphénylphosphine (0.009 g, 0.03 mmol) furent dissous dans un mélange de THF et triéthylamine (1.68 ml, 13.0 mmol). Le 1-octyne (0.240 ml, 1.62 mmol) fut ajouté lentement et le mélange fut chauffé à 70 °C pour une nuit. Le mélange fut refroidi à température pièce, filtré et concentré *in vacuo*. Le résidu fut alors purifié par chromatographie flash (gradient AcOEt/hexane) pour donner le 4-(oct-1-yn-1-yl)benzaldéhyde (0.347 g, 1.62 mmol, rendement quantitatif)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 0.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.36 (s, 4H), 1.49 (m, 2H), 1.65 (qn, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.47 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 10.01 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS.):** δ = 14.0, 19.6, 22.6, 28.5, 28.6, 31.3, 80.1, 95.4, 129.5, 130.6, 132.1, 134.9, 191.5

**(4-(oct-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine**



Le 4-(oct-1-yn-1-yl)benzaldéhyde (3.30 g, 10.2 mmol) et le cyanoborohydrure de sodium (1.91 g, 30.4 mmol) furent dissous dans un mélange d'éthanol saturé au NH<sub>4</sub>OAc et NH<sub>4</sub>OH 5:2 (30 mM), et le mélange réactionnel fut chauffé à 80 °C pour une nuit. L'éthanol fut évaporé sous pression réduite, puis le mélange résultant fut extrait avec DCM et lavé avec NaHCO<sub>3</sub> et NaCl. Le mélange fut concentré *in vacuo* et purifié par chromatographie flash (gradient DCM/MeOH) pour donner le (4-(oct-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine (0.678 g, 3.15 mmol, 31%)

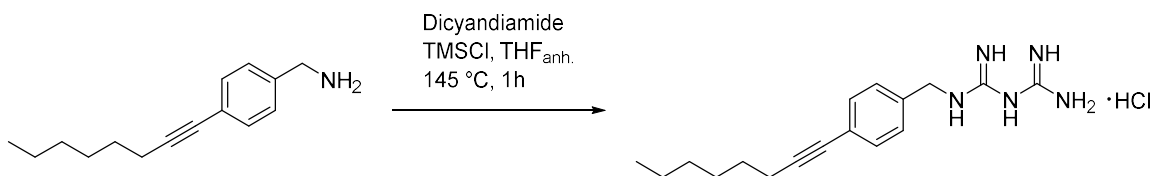
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 0.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.30 (s, 4H), 1.42 (m, 2H), 1.53 (qn, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), 7.34 (s, 4H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 14.4, 19.0, 22.5, 28.5, 28.7, 31.2, 81.0, 90.7, 128.1, 131.5.

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 216.45 ([C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>1</sub>]+H)<sup>+</sup>



### Chlorure de (4-(oct-1-yn-1-yl)benzyl)biguanidim (4.1)



Le (4-(oct-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine (0.31 g, 1.44 mmol), dicyandiamide (0.24 g, 2.88 mmol) et chlorure de triméthylsilyle (0.73 ml, 5.76 mmol) furent dissous dans le THF anhydre (4,0 ml, 360 mM) dans un tube scellé. Le mélange fut chauffé à 145 °C pour 1 h. Le mélange fut filtré, lavé au THF, concentré sous pression réduite et purifié par CCM prep. (DCM:MeOH 9:1) pour donner le (4-(oct-1-yn-1-yl)benzyl)biguanidim en tant que sel de chlorure (0.346 g, 1.15 mmol, 80%)

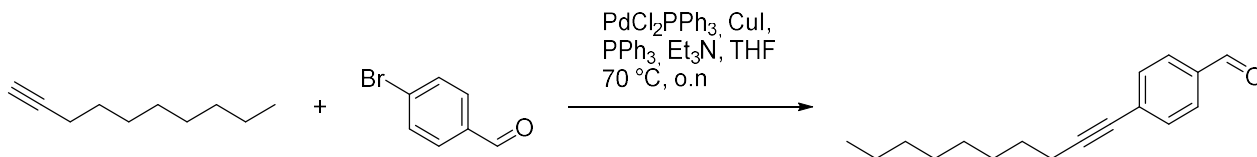
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 0.87 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 1.27 (s, 4H), 1.41 (m, 2H), 1.52 (qn,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.40 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 4.34 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 6.97 (s, 6H), 7.26 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 14.4, 19.0, 22.5, 28.5, 28.7, 31.2, 80.7, 93.0, 128.4, 131.7, 156.1, 163.0.

**MS (120.0 V, ES+):**  $m/z$  (%) = 300.2185 ([C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>.

Pureté déterminée par HPLC, > 99%

### 4-(déc-1-yn-1-yl)benzaldéhyde

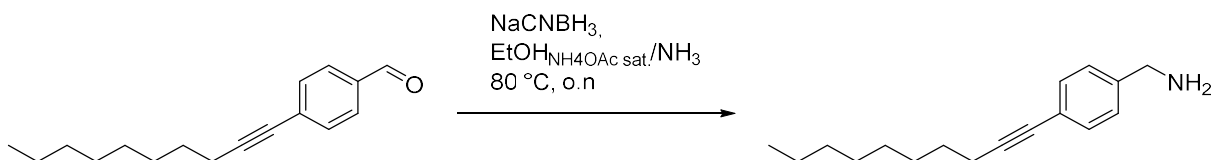


Le 4-bromobenzaldéhyde (3.00 g, 16.2 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.23 g, 0.32 mmol), CuI (0.062 g, 0.32 mmol) et la triphénylphosphine (0.085 g, 0.32 mmol) furent dissous dans un mélange de THF (75 ml) et triéthylamine (16.8 ml, 130 mmol). Le 1-décyne (2.92 ml, 16.2 mmol) fut ajouté lentement et le mélange fut chauffé à 70 °C pour une nuit. Le mélange fut refroidi à température pièce, filtré, lavé au THF et concentré *in vacuo*. Le résidu fut alors purifié par chromatographie flash (gradient AcOEt/hexane) pour donner le 4-(déc-1-yn-1-yl)benzaldéhyde (0.87 g, 3.56 mmol, 22%)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 0.92 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.32 (s, 8H), 1.49 (m, 2H), 1.63 (qn, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 10.01 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS.):** δ = 14.2, 19.6, 22.6, 28.5, 28.9, 29.1, 29.2, 31.8, 80.1, 95.4, 129.5, 130.6, 132.1, 134.9, 191.5

#### (4-(déc-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine



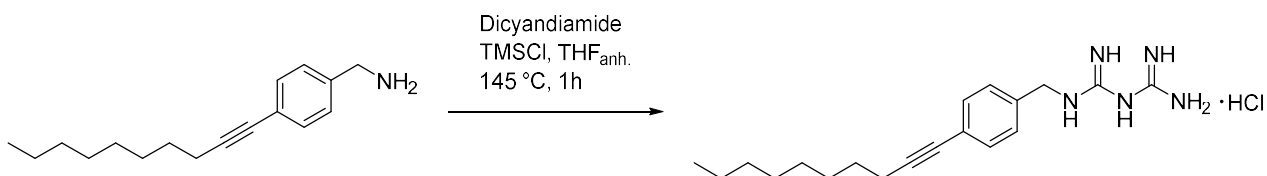
Le 4-(déc-1-yn-1-yl)benzaldéhyde (0.87 g, 3.59 mmol) et le cyanoborohydrure de sodium (0.68 g, 10.7 mmol) furent dissous dans un mélange d'éthanol saturé au NH<sub>4</sub>OAc et NH<sub>4</sub>OH 5:2 (30 mM), et le mélange réactionnel fut chauffé à 80 °C pour une nuit. L'éthanol fut évaporé sous pression réduite, puis le mélange résultant fut extrait avec DCM et lavé avec NaHCO<sub>3</sub> et NaCl. Le mélange fut concentré *in vacuo* et purifié par chromatographie flash (gradient DCM/MeOH) pour donner le (4-(déc-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine (0.39 g, 1.62 mmol, 45%)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 0.89 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 1.30 (s, 8H), 1.40 (m, 2H), 1.53 (qn, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.43 (s, 2H), 7.34 (m, 4H), 7.58 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 14.4, 19.0, 22.5, 28.5, 28.9, 29.1, 29.2, 31.7, 80.7, 128.5, 131.7.

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 244.48 ([C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>1</sub>]+H)<sup>+</sup>

### **Chlorure de (4-(déc-1-yn-1-yl)benzyl)biguanidium (4.2)**



Le (4-(déc-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine (0.20 g, 0.82 mmol), dicyandiamide (0.14 g, 1.64 mmol) et chlorure de triméthylsilyle (0.42 ml, 3.29 mmol) furent dissous dans le THF anhydre (2.28 ml, 360 mM) dans un tube scellé. Le mélange fut chauffé à 145 °C pour 1 h. Le mélange fut filtré, lavé au THF, concentré sous pression réduite et purifié par CCM prep (DCM:MeOH 9:1) pour donner le (4-(déc-1-yn-1-yl)benzyl)biguanidium en tant que sel de chlorure (0.090 g, 0.27 mmol, 33%).

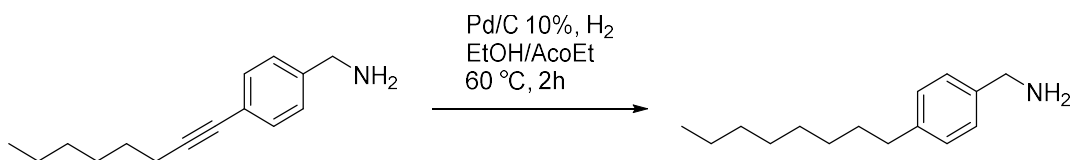
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 0.87 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.27 (s, 8H), 1.41 (m, 2H), 1.53 (qn, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.34 (s, 2H), 7.19 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.28 (s, 3H), 8.96 (s, 2H), 9.61 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 14.4, 19.0, 22.5, 28.5, 28.9, 29.1, 29.2, 31.7, 44.2 80.8, 91.0, 122.3, 127.8, 131.7, 159.0, 160.9.

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 328.2499 ([C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>.

**Pureté déterminée par HPLC, > 99%**

### (4-octylphényl)méthanamine



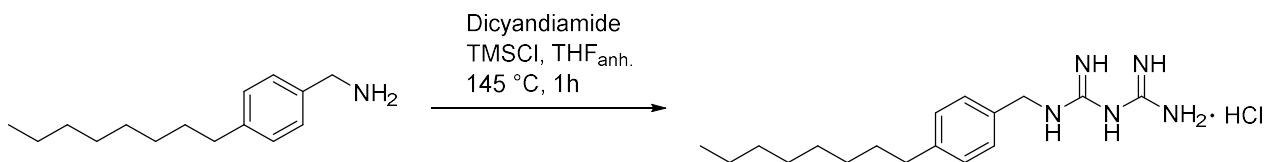
Le (4-(oct-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine (1.06 g, 4.92 mmol) et le palladium sur charbon 10w% (0.11 g, 0.98 mmol) furent mélangé dans 400 ml d'un mélange EtOH:AcOEt 1:1 sous azote. Le mélange réactionnel fut mis sous atmosphère de H<sub>2</sub> et chauffé à 60 °C pour 2 h. Le mélange réactionnel fut filtré sur Celite et évaporé sous pression réduite pour donner la (4-octylphényl)méthanamine (0.99 mg, 4.53 mmol, 92%)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 0.86 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 3H), 1.26 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 10H), 1.53 (m, 2H), 2.53 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.73 (s, 2H), 7.09 (s, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 7.25 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 14.4, 22.6, 29.1, 29.3, 31.5, 31.8, 35.3, 45.2, 127.7, 128.5, 141.1.

**MS (120.0 V, ES+):**  $m/z$  (%) = 220.21 ([C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>1</sub>]+H)<sup>+</sup>

### Chlorure de (4-octylbenzyl)biguanidium (4.3)



Le (4-octylphényl)méthanamine (0.400 g, 1.82 mmol), dicyandiamide (0.31 g, 3.65 mmol) et chlorure de triméthylsilyle (0.93 ml, 7.29 mmol) furent dissous dans le THF anhydre (5.07 ml, 360 mM) dans un tube scellé. Le mélange fut chauffé à 145 °C pour 1 h. Le mélange fut filtré,

lavé au THF, concentré sous pression réduite et purifié par CCM prep (DCM:MeOH 9:1) pour donner le (4-octylbenzyl)biguanidium en tant que sel de chlorure (0.080 g, 0.24 mmol, 13%)

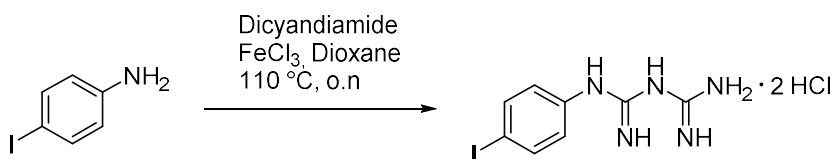
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 0.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.26 (s, 10H), 1.53 (m, 2H), 2.55 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.31 (s, 2H), 7.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.09 (s, 4H), 8.82 (s, 2H), 9.38 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 14.4, 22.6, 29.1, 29.3, 31.5, 31.8, 35.3, 128.7, 159.0, 160.9.

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 304.2498 ([C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>.

Pureté déterminée par HPLC, 95%

#### **Chlorure de (4-iodophényl)biguanidium (4.4)**



Le 4-iodoaniline (0.30 g, 1.37 mmol), dicyandiamide (0.12 g, 1.37 mmol) et FeCl<sub>3</sub> (0.22 g, 1.37 mmol) furent dissous dans le 1,4-dioxane (1.37 mL, 1 M) et chauffé à 110 °C pour une nuit. Après avoir laissé le mélange réactionnel refroidir, du HCl 12 M (0.34 mL) fut ajouté au mélange et le précipité fut filtré. Le composé fut purifié par chromatographie flash (gradient de DCM:MeOH) pour donner le (4-iodophényl)biguanidium en tant que sel de chlorure (0.14 g, 0.40 mmol, 29%).

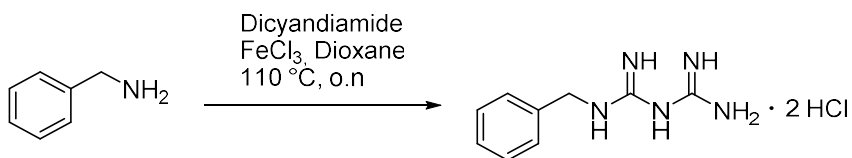
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 7.10 (s, 3H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.40 (s, 3H), 7.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.20 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 87.1, 123.2, 137.7, 154.8, 155.2, 155.9.

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 304.0054 ([C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub>I]+H)<sup>+</sup>.

Pureté déterminée par HPLC, > 99%

#### **Chlorure de 1-benzylbiguanidium (4.5)**



La benzylamine (0.300 g, 2.80 mmol), dicyandiamide (0.24 g, 2.80 mmol), et FeCl<sub>3</sub> (0.45 g, 2.80 mmol) furent dissous dans le 1,4-dioxane (2.80 mL, 1 M) et chauffé à 110 °C pour une nuit. Après avoir laissé le mélange réactionnel refroidir, du HCl 12 M (0.70 mL) fut ajouté au mélange et le précipité fut filtré et lavé au THF pour donner le benzylbiguanidium en tant que sel de chlorure (0.274 g, 1.20 mmol, 43%).

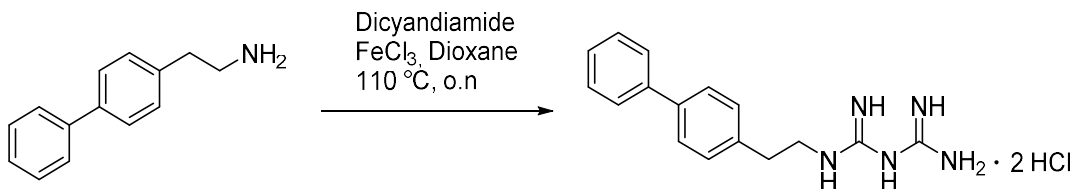
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS): δ = 4.50 (s, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.39 (s, 4H), 8.13 (s, 3H), 8.81 (s, 2H), 9.48 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS): δ = 44.7, 127.5, 127.7, 128.9, 135.9, 152.9, 155.5.

MS (120.0 V, ES<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 192.1251 ([C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>]<sup>+</sup>H)<sup>+</sup>.

Pureté déterminée par HPLC, 95%

#### **Chlorure de 2-(4-biphényl)éthanbiguanidium (4.6)**



La 2-(4-biphényl)éthanamine (0.50 g, 2.53 mmol), dicyandiamide (0.21 g, 2.53 mmol), et FeCl<sub>3</sub> (0.41 g, 2.53 mmol) furent dissous dans le 1,4-dioxane (1.00 mL, 1 M) et chauffé à 110 °C pour une nuit. Après avoir laissé le mélange réactionnel refroidir, du HCl 12 M (0.25 mL) fut ajouté au mélange et le précipité fut filtré et lavé au THF pour donner le 2-(4-biphényl)éthanbiguanidium en tant que sel de chlorure (0.356 g, 1.12 mmol, 44%)

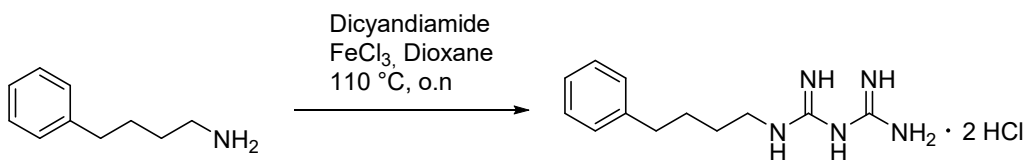
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 2.94 (s, 2H), 3.07 (s, 2H), 7.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H), 7.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 7.64 (m, 5H), 8.06 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 33.4, 44.0, 127.0, 127.1, 127.8, 129.4, 129.9, 138.0, 138.8, 140.4, 153.0, 155.7.

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 282.1714 ([C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>.

Pureté déterminée par HPLC, > 99%

#### Chlorure de 4-phénylbutylbiguanidium (4.7)



4-phénylbutylamine (0.20 g, 1.34 mmol), dicyandiamide (0.11 g, 1.34 mmol), et FeCl<sub>3</sub> (0.22 g, 1.34 mmol) furent dissous dans le 1,4-dioxane (1.34 mL, 1 M) et chauffé à 110 °C pour une nuit. Après avoir laissé le mélange réactionnel refroidir, du HCl 12 M (0.33 mL) fut ajouté au mélange et le précipité fut filtré et lavé au THF pour donner le 4-phénylbutylbiguanidium en tant que sel de chlorure (0.075 g, 0.28 mmol, 21%)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 1.49 (m, 2H), 1.58 (m, 2H), 2.58 (m, 2H), 3.15 (s, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 7.91 (s, 3H), 8.60 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 28.8, 35.2, 126.2, 128.8, 142.6, 153.2, 156.1.

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 234.1711 ([C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>.

**Pureté** déterminée par HPLC, 95%

### **Échange d'anion, procédure générale**

Le biguanidium en tant que sel de chlorure et le sel de lithium bis(trifluorométhane)sulfonamide (LiNTf<sub>2</sub>, 2.5 équivalents) ou le sel de lithium trifluorométhanesulfonate (LiOTf, 2.5 eq) furent dissous dans le méthanol et agités pour une nuit à température pièce. Le mélange fut concentré sous pression réduite et le résidu fut trituré avec l'AcOEt. Le précipité fut filtré et lavé à l'AcOEt pour donner le biguanidium en tant que sel de bis(trifluorométhane)sulfonamide ou sel de trifluorométhanesulfonate avec un rendement quantitatif.

### **OTf:**

**MS (120.0 V, ES-):** *m/z* (%) = 148.9487 ([CF<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SH]-H)<sup>-</sup>

**<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 77.75 (s, 3F)

### **NTf<sub>2</sub>:**

**MS (120.0 V, ES-):** *m/z* (%) = 279.9189 ([C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>H]-H)<sup>-</sup>

**<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 78.73 (s, 6F)



## 4.3 Résultats et discussion

### 4.3.1 Synthèse

Les composés étudiés dans ce chapitre sont présentés à la **figure 4.1**, à côté des alkylbiguanidium **2.1 – 2.6** et du sel de PEB-biguanidium **3.1** précédemment rapportés dans la littérature,<sup>4,5</sup> qui serviront d'éléments de comparaison. Le contre-ion  $\text{Cl}^-$  fut aussi échangé par  $\text{NTf}_2^-$  ou  $\text{OTf}^-$  puisque, comme mentionné plus haut, il fut démontré que le contre-ion joue un grand rôle sur l'amphiphilie et l'insertion dans les membranes, et donc sur les propriétés biologiques de ces sels. La synthèse des sels d'alkylbiguanidium **2.1 – 2.6** fut réalisée en suivant le protocole décrit dans la littérature<sup>5</sup> par la réaction de l'alkylamine correspondante avec le dicyandiamide et le  $\text{FeCl}_3$  dans du 1,4-dioxane à reflux<sup>6</sup> (**fig. 4.2A**). La synthèse du sel de PEB-biguanidium **3.1**<sup>4</sup> fut plutôt réalisée avec le  $\text{TMSCl}$  dans le THF<sup>7</sup>, puisque la présence de la triple liaison dans la structure interfère avec la réaction au  $\text{FeCl}_3$  (**fig. 4.2B**). Le changement de contre-ions fut, quant à lui, réalisé par métathèse d'anion avec le  $\text{LiNTf}_2$  (**a**) ou le  $\text{LiOTf}$  (**b**), dans le méthanol, avec des rendements quantitatifs<sup>2</sup>.

Les composés **4.1**, **4.2** et **4.3** ont des structures mixtes entre la structure des sels d'alkylbiguanidium et des sels de PEB-biguanidium, avec la présence d'une chaîne alkyle attachée à un cycle aromatique et contenant la triple liaison. Les composés **4.1** et **4.2** furent obtenus par le couplage de Sonogashira du 4-bromobenzaldéhyde avec le 1-octyne et le 1-décyne, respectivement. L'aldéhyde fut par la suite réduit à l'amine avec du  $\text{NaCNBH}_3$ , puis réagit avec le dicyandiamide et le  $\text{TMSCl}$  pour former le chlorure de biguanidium monoprotone (**fig. 4.2C**). Le sel de biguanidium **4.3** fut obtenu par l'hydrogénation de la (4-(oct-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine à la (4-octylphényl)méthanamine, suivi de la formation du chlorure de biguanidium. Les composés **4.4** à **4.7** sont des analogues de la phenformine qui diffèrent au niveau du nombre de carbones entre le biguanide et le cycle aromatique, ainsi qu'au niveau des substituants sur celui-ci. Ces petites variations de la structure permettent d'obtenir une plus grande gamme d'hydrophobie chez ces composés et des propriétés d'assemblage supramoléculaire différentes. Ces sels de biguanidium furent synthétisés en utilisant la méthode de synthèse au  $\text{FeCl}_3$ , conduisant à l'obtention des chlorures de biguanidium diprotone (**fig. 4.2D**)

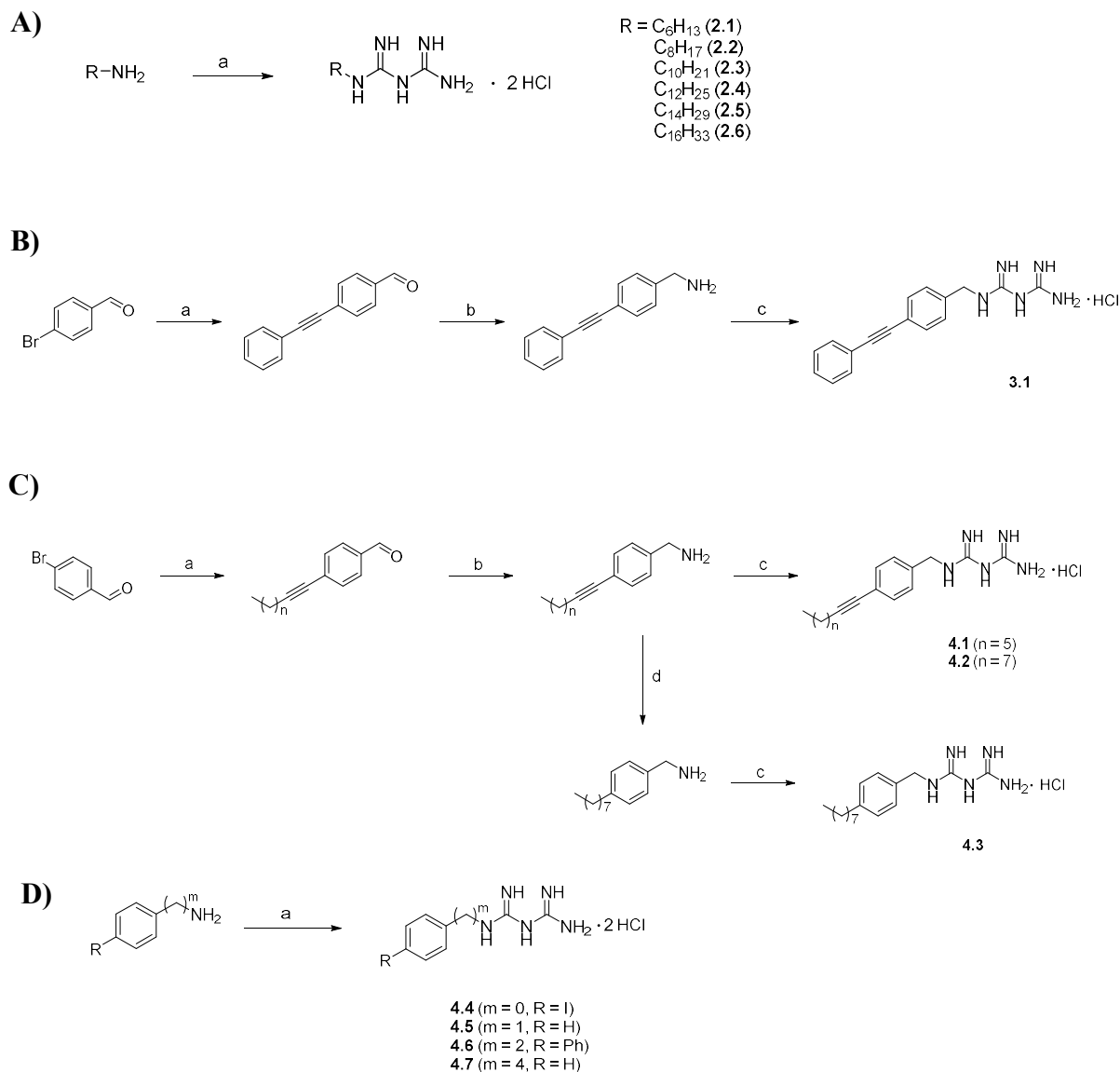


Figure 4.2 Synthèse des sels de biguanidiums étudié A) Synthèse des alkylbiguanidium **2.1** à **2.6** (a) Dicyandiamide,  $FeCl_3$ , dioxane,  $110\text{ }^\circ C$ , o.n. B) Synthèse du sel de PEB-biguanidium **3.1** (a) Phénylacétylène,  $PdCl_2PPH_3$ ,  $CuI$ ,  $PPH_3$ ,  $Et_3N$ , THF,  $70^\circ$ , o.n. (b)  $NaCN(BH_3)_3$ ,  $EtOH_{NH_4OAc\ sat.}/NH_3$ ,  $80\text{ }^\circ C$ , o.n (c) Dicyandiamide,  $TMSCl$ ,  $THF_{anh.}$ ,  $145\text{ }^\circ C$ , 1 h. C) Synthèse des sels de biguanidium **4.1** à **4.3** (a) 1-octyne ou 1-decyne,  $PdCl_2PPH_3$ ,  $CuI$ ,  $PPH_3$ ,  $Et_3N$ , THF,  $70^\circ$ , o.n. (b)  $NaCN(BH_3)_3$ ,  $EtOH_{NH_4OAc\ sat.}/NH_3$ ,  $80\text{ }^\circ C$ , o.n (c) Dicyandiamide,  $TMSCl$ ,  $THF_{anh.}$ ,  $145\text{ }^\circ C$ , 1 h (d) du (4-(oct-1-yn-1-yl)phényl)méthanamine,  $Pd/C\ 10\%$ ,  $H_2$ ,  $EtOH/AcOEt$ ,  $60\text{ }^\circ C$ , 2 h. D) Synthèse des sels de biguanidium **4.4** à **4.7** (a) Dicyandiamide,  $FeCl_3$ , dioxane,  $110\text{ }^\circ C$ , o.n.

### 4.3.2 Propriétés anticancéreuses et sélectivités

Les propriétés anticancéreuses des sels de biguanidium furent évaluées en déterminant la valeur de l'IC<sub>50</sub>, soit la concentration minimale pour obtenir 50% d'inhibition de la croissance, sur des cellules cancéreuses pancréatiques KP4 et sur des cellules pancréatiques saines HPNE. Les résultats présentés dans le **tableau 4.1** montrent que tous les composés ont des activités anticancéreuses plus grandes que la phenformine (51 μM sur les KP4) et la metformine (4.9 mM sur les KP4)<sup>4</sup>. Les composés les plus efficaces, **2.2a** (0.61 μM), **2.3a** (0.49 μM) et **2.4a** (0.54 μM), sont jusqu'à 10 000 fois plus actifs que la metformine, alors que les meilleurs composés rapportés dans la littérature jusqu'à date se limitent à une efficacité 1 000 fois supérieure<sup>4,8</sup>. De façon très intéressante, les composés possédant le contre-ion NTf<sub>2</sub><sup>-</sup> ont de meilleures propriétés anticancéreuses que leurs analogues OTF<sup>-</sup> et Cl<sup>-</sup> à travers toute la librairie. Cet effet est encore plus marqué sur les plus petites molécules telles que les composés **2.2** et **2.3**. Ces résultats confirment encore une fois l'importance de la nature du contre-ions sur les propriétés biologiques de ces sels organiques.

Un facteur très important à prendre en considération est la sélectivité des composés. Puisque les membranes lipidiques sont des structures retrouvées dans une grande variété d'organismes, les composés qui les affectent ont souvent tendance à cibler tous les types de cellules, sans sélectivité, ce qui résulte en une forte toxicité<sup>9</sup>. Pour notre librairie de sels de biguanidium, nous avons évalué la toxicité en déterminant le facteur de sélectivité et le HC20%, soit la concentration induisant 20% d'hémolyse des globules rouges. Le facteur de sélectivité est calculé selon le rapport des IC<sub>50</sub> des cellules saines HPNE versus les cellules cancéreuses KP4. La majorité des sels de biguanidium étudiés ont une sélectivité moyenne entre 2 et 7, qui est généralement corrélée avec une plus forte hémolyse des globules rouges. C'est le cas des sels d'alkylbiguanidium à longue chaîne alkyle **2.4** à **2.6** et des composés **4.1** à **4.3**. Nous avons montré que les sels d'alkylbiguanidium à longue chaîne étaient des perturbateurs membranaires très efficaces qui transportent des ions H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> et dépolarisent les membranes, ce qui explique leur toxicité<sup>5</sup>. Les sels de biguanidium **4.1** à **4.3**, qui sont des analogues des sels d'alkylbiguanidium possèdent donc potentiellement les mêmes propriétés de perméabilisation membranaire. Des études sont actuellement en cours afin de caractériser celles-ci.

Table 4.1 Activités anticancéreuses des sels de biguanidium et toxicité

	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ M)		Facteur de sélectivité	HC20% ( $\mu$ M)
	KP4	HPNE		
2.1a	2.02 $\pm$ 0.48	159.8 $\pm$ 0.7	80	> 100
2.1b	2.7 $\pm$ 1.0	306 $\pm$ 12	110	> 100
2.1c	5.1 $\pm$ 1.4	581 $\pm$ 18	110	> 100
2.2a	0.61 $\pm$ 0.43	22.79 $\pm$ 0.38	37	> 100
2.2b	0.78 $\pm$ 0.28	38 $\pm$ 7	49	> 100
2.2c	1.14 $\pm$ 0.43	74 $\pm$ 26	65	> 100
2.3a	0.49 $\pm$ 0.33	5.4 $\pm$ 0.6	11	> 100
2.3b	0.83 $\pm$ 0.55	5.6 $\pm$ 0.8	7	> 100
2.3c	0.88 $\pm$ 0.38	13.7 $\pm$ 2.7	16	64
2.4a	0.54 $\pm$ 0.02	1.82 $\pm$ 0.48	3	48
2.4b	0.83 $\pm$ 0.05	2.42 $\pm$ 0.26	3	35
2.4c	1.18 $\pm$ 0.12	4.6 $\pm$ 0.8	4	44
2.5a	1.29 $\pm$ 0.10	1.66 $\pm$ 0.17	1	35
2.5b	1.27 $\pm$ 0.16	2.8 $\pm$ 1.0	2	25
2.5c	1.46 $\pm$ 0.16	3.80 $\pm$ 0.29	3	13
2.6a	0.66 $\pm$ 0.21	1.56 $\pm$ 0.15	2	23
2.6b	1.33 $\pm$ 0.36	2.00 $\pm$ 0.14	2	32
2.6c	1.80 $\pm$ 0.04	3.41 $\pm$ 0.41	2	50
3.1a	2.55 $\pm$ 0.07	16.1 $\pm$ 1.7	6	> 100
3.1b	3.33 $\pm$ 0.13	10.91 $\pm$ 0.44	3	> 100
3.1c	5.2 $\pm$ 0.7	28.1 $\pm$ 2.9	5	> 100
4.1	1.68 $\pm$ 0.18	5.20 $\pm$ 0.32	3	74
4.2	3.13 $\pm$ 0.19	10.8 $\pm$ 3.1	3	69
4.3	3.6 $\pm$ 0.8	14.6 $\pm$ 1.6	4	74
4.4	38.0 $\pm$ 1.2	133.6 $\pm$ 4.2	4	> 100
4.5	31.3 $\pm$ 2.3	635 $\pm$ 50	20	> 100
4.6	5.4 $\pm$ 1.2	29 $\pm$ 10	5	> 100
4.7	7.0 $\pm$ 1.8	350 $\pm$ 43	50	> 100

<sup>a</sup> Viabilité des cellules évaluée après 72h

Certains composés ont une sélectivité moyenne mais un faible taux d'hémolyse, comme c'est le cas du composé **3.1** et les analogues de la phenformine **4.4** et **4.5**. Comme le composé **3.1c** n'a pas montré de toxicité lors des études *in vivo* sur les modèles murins<sup>4</sup>, il est attendu que ces autres composés soient aussi bien tolérés par des animaux. Enfin, certains composés ont des sélectivités très grandes tout en montrant une faible hémolyse, comme c'est le cas des composés **2.1**, **2.2**, **4.5** et **4.7**. Ces composés sont tous au moins 20 fois plus sélectifs envers les cellules cancéreuses, et vont même jusqu'à un facteur de sélectivité supérieur à 100 pour **2.1b** et **2.1c**.

En considérant tous les facteurs, les composés les plus prometteurs pour de futures études *in vivo* sont les sels de biguanidium **2.2a** et **2.2b** qui possèdent des activités 10 000 fois supérieures à la metformine, en étant environ 40 fois plus sélectifs envers les cellules cancéreuses et sans démontrer d'hémolyse, même à des concentrations 150 fois plus grandes que celles requises pour obtenir un effet anticancéreux.

### 4.3.3 Propriétés antibactériennes

Malgré qu'elle soit principalement reconnue pour ses propriétés antidiabétiques et anticancéreuses, certaines études ont souligné l'effet de la metformine sur le microbiome intestinal. Plusieurs d'entre elles ont en effet démontré que la prise de metformine affectait presque immédiatement la composition du microbiome chez les souris comme chez les humains, et même qu'elle altérerait la régulation de gènes associés aux métalloprotéines et au transport de métaux dans les bactéries<sup>10,11</sup>. Cet effet sur les bactéries contribuerait entre autres à l'effet thérapeutique antidiabétique de la metformine, mais serait aussi associé indirectement à ses propriétés anticancéreuses. En effet, les changements dans la composition du microbiome intestinal serait associés à un effet anti-inflammatoire de la metformine qui serait bénéfique dans le traitement du cancer (en particulier dans le cas du cancer du côlon)<sup>12</sup>. Ainsi, l'étude des propriétés antibactériennes de la librairie de sels de biguanidiums est pertinente non seulement dans le cadre du développement de nouveaux composés antibactériens mais aussi pour l'étude de leurs propriétés anticancéreuses.

Ces propriétés furent ainsi évaluées en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (MIC), la concentration minimale pour obtenir une inhibition complète de la

croissance des bactéries, qui sont présentées dans le **tableau 4.2**. Les bactéries à Gram négatif *E. coli* DH5a et les bactéries à Gram positif *B. thuringiensis* HD73 furent utilisées.

Les sels d'alkylbiguanidium **2.1** à **2.6** montrent la même tendance en termes d'activités antibactériennes qu'en terme d'activités anticancéreuses: les chaînes de plus en plus longues sont de plus en plus efficaces, ce qui est corrélé avec leurs propriétés de perméabilisation membranaire. De même, les sels contenant des contre-ions  $\text{NTf}_2^-$  sont de meilleurs antibactériens, un effet qui est plus marqué sur les composés avec des chaînes alkyles plus courtes. L'alkylbiguanidium **2.2a**, un des composés ayant démontré l'activité anticancéreuse la plus marquante, montre d'ailleurs des propriétés antibactériennes intéressantes avec une MIC de [81 ; 100]  $\mu\text{M}$  sur les deux souches bactériennes. Les analogues **4.1** à **4.3** montrent aussi des MIC intéressantes, ce qui est attendu de composés capables de perméabiliser les membranes.

Table 4.2 Activités antibactériennes des sels de biguanidium

MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>A</sup>		
	<b><i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	<b><i>B. thuringiensis</i> HD703</b>
2.1a	67	67
2.1b	> 100	> 100
2.1c	> 100	> 100
2.2a	64	64
2.2b	> 100	> 100
2.2c	> 100	> 100
2.3a	44	62
2.3b	65	92
2.3c	> 100	> 100
2.4a	26	13
2.4b	60	30
2.4c	35	18
2.5a	27	7
2.5b	15	8
2.5c	35	13
2.6a	56	15
2.6b	80	40
2.6c	> 100	33
3.1a	> 100	> 100
3.1b	> 100	> 100
3.1c	> 100	> 100
4.1	56	28
4.2	69	17
4.3	37	28
4.4	> 100	> 100
4.5	> 100	> 100
4.6	> 100	> 100
4.7	> 100	> 100

<sup>A</sup> l'incertitude sur les valeurs  $x$  se situe dans l'intervalle  $[x/2 - 2x]$ . Chaque valeur fut mesurée en triplicata dans trois expériences indépendantes.

En comparant les différentes activités biologiques, nous pouvons constater que les composés pouvant affecter les membranes sont de bons antibactériens et anticancéreux mais sont aussi toxiques. Les meilleurs composés semblent être ceux qui peuvent pénétrer facilement dans les membranes phospholipidiques, sans trop les perturber et pouvant se partitionner autant dans la phase hydrophobe que la phase aqueuse. Une fois à l'intérieur de la cellule, ces composés devraient pouvoir affecter le mécanisme intracellulaire – possiblement au niveau du complexe I mitochondrial comme la metformine – sans affecter l'homéostasie de la cellule.

## 4.4 Conclusion

En conclusion, nous avons synthétisé une petite librairie de sels de biguanidium et avons évalué leurs propriétés anticancéreuses, leurs propriétés antibactériennes, ainsi que leur toxicité et sélectivité. Alors que tous les composés montrent une capacité à inhiber la prolifération des cellules tumorales supérieure à la phenformine et la metformine, le composé **2.2a** se démarque en étant 10 000 fois plus efficace que cette dernière avec une excellente sélectivité pour les cellules cancéreuses, aucune activité hémolytique et des propriétés antibactériennes intéressantes. Ces travaux montrent que les propriétés de partition dans la membrane des sels de biguanidium peuvent être finement calibrés par l'amphiphilie, le contre-ion et l'assemblage supramoléculaire. De cette façon il est possible de favoriser la pénétration dans les cellules sans la perturbation membranaire et la toxicité habituellement associées à de tels composés. Le but de ces études étant l'identification de composés plus actifs et sélectifs que le composé **3.1** précédemment étudié *in vivo*, nous sommes confiants que ces résultats nous mettent sur la bonne voie afin de trouver un ou des composés avec un réel potentiel de traitement du cancer du pancréas. Des études sont actuellement en cours pour élucider le mécanisme d'action de ces composés.



## 4.4 Références

1. Gravel, J.; Schmitzer, A. R., *Supramol Chem* **2014**, *27* (5-6), 364.
2. Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R., *Org Biomol Chem* **2013**, *11* (6), 923.
3. Vidal, M.; Schmitzer, A., *Chemistry* **2014**, *20* (32), 9998.
4. Hébert, A. P., M.; Rowel, M.C.; Lefrançois, G.; Doré, A.; Fernandez-Ruis, A.; Ferbere, G.; Schmitzer, A. R., *Submitted* **2019**.
5. Hébert, A.; Parisotto, M.; Ferbeyre, G.; Schmitzer, A. R., *Supramol Chem* **2018**, *31* (3), 127.
6. Suyama, T.; Soga, T.; Miyauchi, K., *Nippon Kagaku Kaishi* **1989**, (5), 884.
7. Mayer, S.; Daigle, D. M.; Brown, E. D.; Khatri, J.; Organ, M. G., *J Comb Chem* **2004**, *6* (5), 776.
8. Boukalova, S.; Stursa, J.; Werner, L.; Ezrova, Z.; Cerny, J.; Bezawork-Geleta, A.; Pecinova, A.; Dong, L.; Drahotka, Z.; Neuzil, J., *Mol Cancer Ther* **2016**, *15* (12), 2875.
9. Vidal, M.; Elie, C.-R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R., *Med Chem Comm.* **2014**, *5* (4), 436.
10. Wu, H.; Esteve, E.; Tremaroli, V.; Khan, M. T.; Caesar, R.; Manneras-Holm, L.; Stahlman, M.; Olsson, L. M.; Serino, M.; Planas-Felix, M.; Xifra, G.; Mercader, J. M.; Torrents, D.; Burcelin, R.; Ricart, W.; Perkins, R.; Fernandez-Real, J. M.; Backhed, F., *Nat Med* **2017**, *23* (7), 850.
11. Elbere, I.; Kalnina, I.; Silamikelis, I.; Konrade, I.; Zaharenko, L.; Sekace, K.; Radovica-Spalvina, I.; Fridmanis, D.; Gudra, D.; Pirags, V.; Klovins, J., *PLoS One* **2018**, *13* (9).
12. Ma, W.; Chen, J.; Meng, Y.; Yang, J.; Cui, Q.; Zhou, Y., *Front Microbiol* **2018**, *9*, 1336.

## Chapitre 5 : Conclusion générale

### 5.1 Bilan des travaux de recherche

Les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour objectif d'étudier les sels de biguanidium et leurs propriétés anticancéreuses et antibactériennes. En faisant varier la structure des composés et en étudiant leurs propriétés de perméabilisation membranaire, nous avons abouti à l'identification de composés de plus en plus efficaces pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du pancréas, tout en limitant leur toxicité sur les cellules saines et les globules rouges.

Nous avons tout d'abord étudié de simples sels d'alkylbiguanidium et leur capacité à perturber des membranes biologiques. Nous avons ainsi déterminé que ces composés étaient capables de transporter des ions  $H^+/OH^-$  au travers de membranes avec un mécanisme électrogénique, c'est-à-dire sans mouvements d'ions complémentaires par antiport ou symport. Ce processus, qui résulte en un transfert de charge, amène la dépolarisation de membrane, autant dans des liposomes simples que dans des bactéries vivantes. En conséquence, cette perturbation membranaire donne des propriétés antibactériennes et antifongiques intéressantes aux sels d'alkylbiguanidium, mais augmente aussi l'hémolyse des globules rouges. Comme la longueur de la chaîne alkyle des alkylbiguanidium joue grandement sur la capacité du sel à perturber les membranes, nous en avons déduit que moduler l'amphiphilie des sels de biguanidium allait nous permettre de mieux contrôler les propriétés biologiques de ceux-ci.

À partir de ces connaissances et des travaux précédents de notre groupe sur les transporteurs synthétiques, nous avons synthétisé des sels de biguanidium substitués par la fonction phényléthylnylbenzyl, un fragment connu pour ses propriétés d'auto-assemblage dans les membranes. Grâce à ce motif, les sels de PEB-biguanidium se sont montrés capables de transporter les ions  $H^+/OH^-$  et dépolariser les membranes phospholipidiques, mais de façon beaucoup moins importante que les sels d'alkylbiguanidium. Les sels de PEB-biguanidium sont ainsi capables de pénétrer dans les membranes cellulaires et s'accumuler dans les mitochondries beaucoup plus facilement que leur analogue commercial, la metformine, sans toutefois causer l'hémolyse des globules rouges. Ce faisant, les propriétés anticancéreuses des sels de PEB-

biguanidium sont grandement améliorées par rapport à la metformine, le plus efficace des composés (**3.1b**) étant 1 000 fois plus actif sur les cellules cancéreuses du pancréas tout en démontrant de la sélectivité par rapport aux cellules saines. Nous avons par la suite étudié le mécanisme d'action intracellulaire de ce nouveau sel de biguanidium **3.1b** qui, de façon similaire à la metformine, inhibe la respiration cellulaire, diminue le rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  et active l'AMPK, une voie de sauvegarde de l'énergie mitochondriale. Tous ces résultats nous ont amené à tester ce composé *in vivo* sur des xénogreffes du cancer du pancréas, où le composé **3.1b** est parvenu à inhiber de façon significative la croissance des tumeurs.

Après les résultats très encourageants obtenus avec les sels de PEB-biguanidium, nous nous sommes intéressés à la synthèse et l'étude de nouveaux analogues, afin d'identifier des composés encore plus efficaces sur les cellules cancéreuses du pancréas. Nous avons ainsi synthétisé une petite librairie de sels de biguanidium inspirés de la structure de la phenformine, et plusieurs de ces composés se sont démarqués en étant très efficaces pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques. Alors que la plus grande activité rapportée dans la littérature est similaire à celle du sel de PEB-biguanidium **3.1b** - soit 1 000 fois plus efficace que la metformine - certains des composés de notre librairie sont 10 000 fois plus efficaces. Grâce à un bon contrôle des propriétés de partition et perturbation membranaire, ceux-ci sont aussi très sélectifs envers les cellules cancéreuses et ne montrent aucune hémolyse des globules rouges.

Nous sommes confiants que l'ensemble de nos travaux vont aider à mieux rationaliser les prochaines synthèses de nouveaux composés, et qu'ils sont les premiers pavés vers le développement d'un médicament pour le traitement du cancer du pancréas.

## 5.2 Perspectives

Comme mentionné plus haut, les travaux de cette thèse ne sont que le début de l'exploitation des sels de biguanidium pour des applications anticancéreuses. Après avoir exploré la base de ce projet, les prochaines étapes se concentreront sur l'application des biguanides dans différents types de cancers, comme le cancer de la prostate, du sein, du foie et plusieurs autres<sup>1-3</sup>, ainsi que sur l'étude de structures plus complexes qui permettront une meilleure pénétration cellulaire.

Une voie intéressante à explorer est le ciblage spécifique des cellules cancéreuses, par exemple en exploitant les récepteurs de folates qui sont surexprimés à leur surface<sup>4</sup>. La conjugaison des sels de biguanidium avec l'acide folique, le substrat naturel des récepteurs folates, permettrait ainsi de favoriser la partition dans les cellules cancéreuses et d'augmenter la sélectivité des composés (**fig. 5.1a**). D'une façon similaire, plusieurs motifs sont connus pour favoriser le ciblage d'organelles spécifiques dans les cellules, tel que le lysosome, le noyau cellulaire, le réticulum endoplasmique ou encore la mitochondrie<sup>5</sup>. Cette dernière est particulièrement intéressante dans le cadre de ce projet puisque les sels de biguanidium sont connus pour leur inhibition du complexe I de la mitochondrie, supposés être leur mode d'action principal. La conjugaison de la metformine avec un élément de reconnaissance des mitochondries, le cation triphénylphosphonium (TPP<sup>+</sup>), fut d'ailleurs déjà rapportée dans la littérature<sup>6</sup>. Les résultats d'une telle combinaison sont encourageants, avec une augmentation de presque 1 000 fois l'activité anticancéreuse versus la metformine. En conjuguant un sel de biguanidium encore plus efficace que cette dernière avec le TPP<sup>+</sup>, par exemple le sel de PEB-biguanidium **3.1b**, il est attendu qu'une activité et une sélectivité plus importante soient obtenues (**fig. 5.1b**).

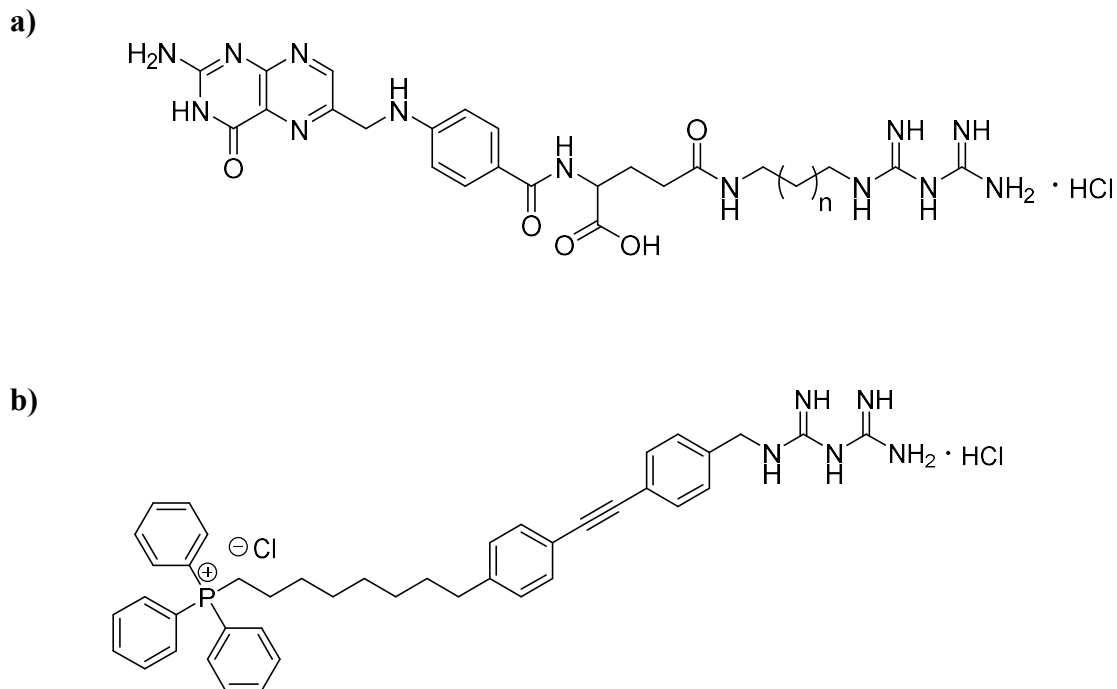


Figure 5.1 A) Conjugé d'acide folique – sel de biguanidium. B) Conjugé TPP-PEB-bi guanidium.

Enfin, plusieurs travaux sont déjà en cours dans notre groupe afin de déterminer la cible intracellulaire de la metformine, jusqu'ici inconnue malgré les recherches extensives sur le sujet. Une stratégie pour y parvenir est la conjugaison d'un sel de biguanidium avec la biotine. En incubant un lysat cellulaire avec ce composé, la metformine peut se lier à sa cible moléculaire. Le lysat cellulaire est par la suite passé sur une colonne de streptavidine, une protéine possédant une immense affinité pour la biotine ( $K_d = 10^{-14}$  M). Le complexe cible-metformine-biotine est alors retenu par la colonne, puis déplacé par un compétiteur ou en utilisant des conditions dénaturantes (**fig. 5.2**). Le complexe ainsi récupéré peut être analysé par spectrométrie de masse afin de déterminer la nature de la cible. Cette méthode a déjà permis à notre groupe d'identifier une première cible jusqu'alors non répertoriée dans la littérature, et d'autres essais sont en cours en conjuguant le sel de PEB-bi guanidium **3.1b** avec la biotine afin de déterminer si la cible moléculaire est la même.

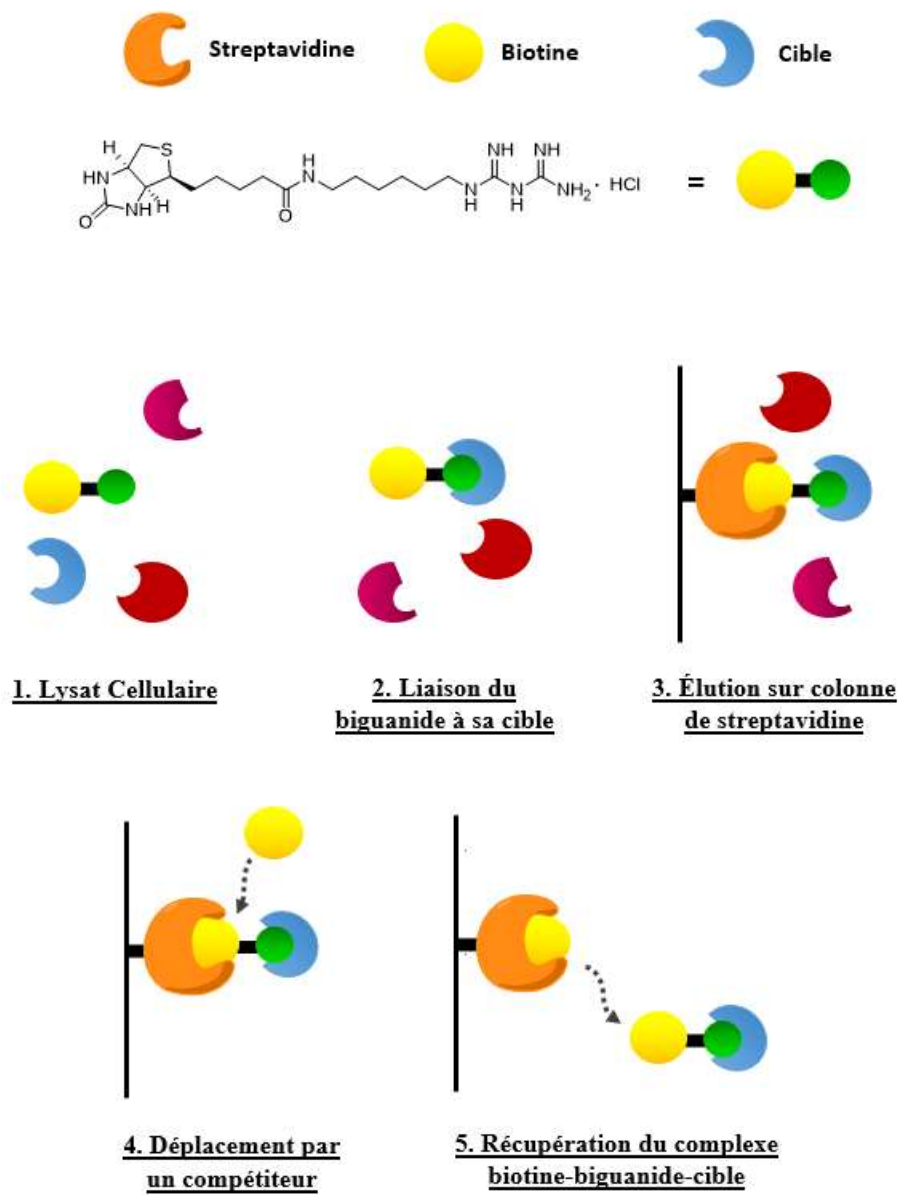


Figure 5.2 Méthode d'identification de la cible de la metformine par conjugaison avec la biotine

## 5.3 Références

1. Lee, M. S.; Hsu, C. C.; Wahlqvist, M. L.; Tsai, H. N.; Chang, Y. H.; Huang, Y. C., *BMC Cancer* **2011**, *11*, 20.
2. He, X. X.; Tu, S. M.; Lee, M. H.; Yeung, S. C., *Ann Oncol* **2011**, *22* (12), 2640.
3. Hadad, S.; Iwamoto, T.; Jordan, L.; Purdie, C.; Bray, S.; Baker, L.; Jellema, G.; Deharo, S.; Hardie, D. G.; Pusztai, L.; Moulder-Thompson, S.; Dewar, J. A.; Thompson, A. M., *Breast Cancer Res Treat* **2011**, *128* (3), 783.
4. Xia, G.; An, Z.; Wang, Y.; Zhao, C.; Li, M.; Li, Z.; Ma, J., *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2013**, *61* (4), 390.
5. Louzoun-Zada, S.; Jaber, Q. Z.; Fridman, M., *Angew Chem Int Ed Engl* **2019**, *58* (44), 15584.
6. Boukalova, S.; Stursa, J.; Werner, L.; Ezrova, Z.; Cerny, J.; Bezawork-Geleta, A.; Pecinova, A.; Dong, L.; Drahota, Z.; Neuzil, J., *Mol Cancer Ther* **2016**, *15* (12), 2875.

**Annexe 1: Informations supplémentaires du chapitre 2**  
**« Membrane permeabilization induced by**  
**alkylbiguanidium salts »**



## A1.1 NMR Spectra

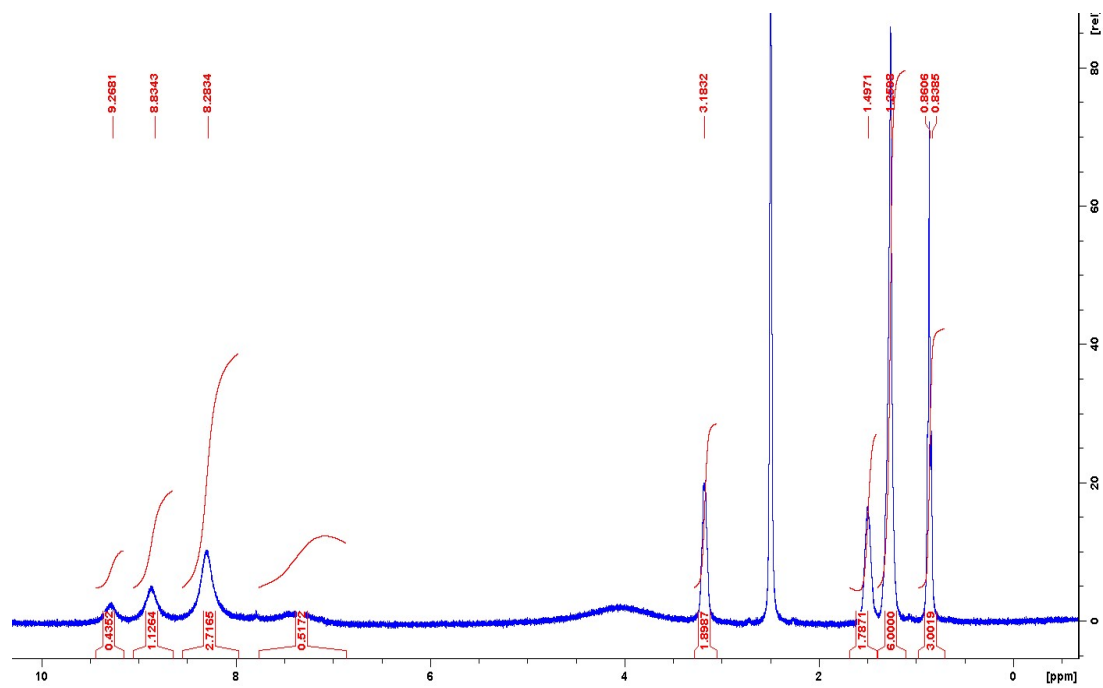


Figure A1.2 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) spectrum of 1-Hexylbiguanidium chloride (C<sub>6</sub>Cl)

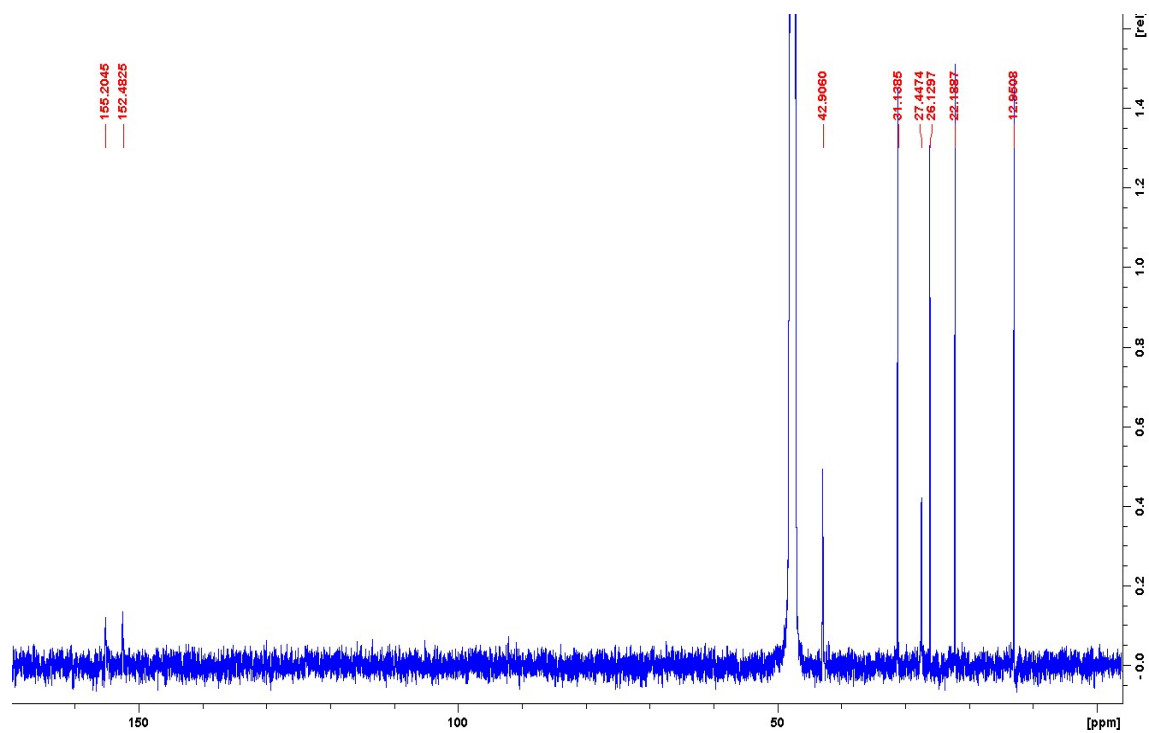


Figure A1.3 <sup>13</sup>C NMR (MeOD) spectrum of 1-Hexylbiguanidium chloride (C<sub>6</sub>Cl)

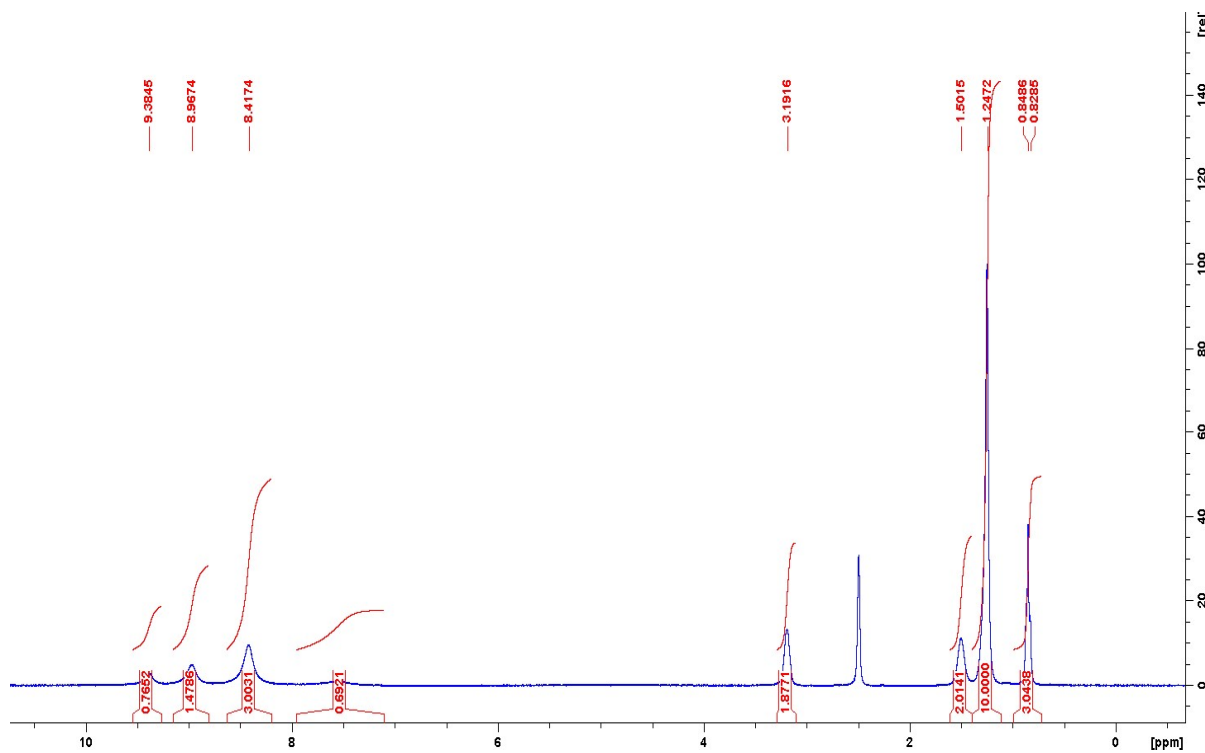


Figure A1.4  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 1-Octylbiguanidium chloride ( $\text{C}_8\text{Cl}$ )

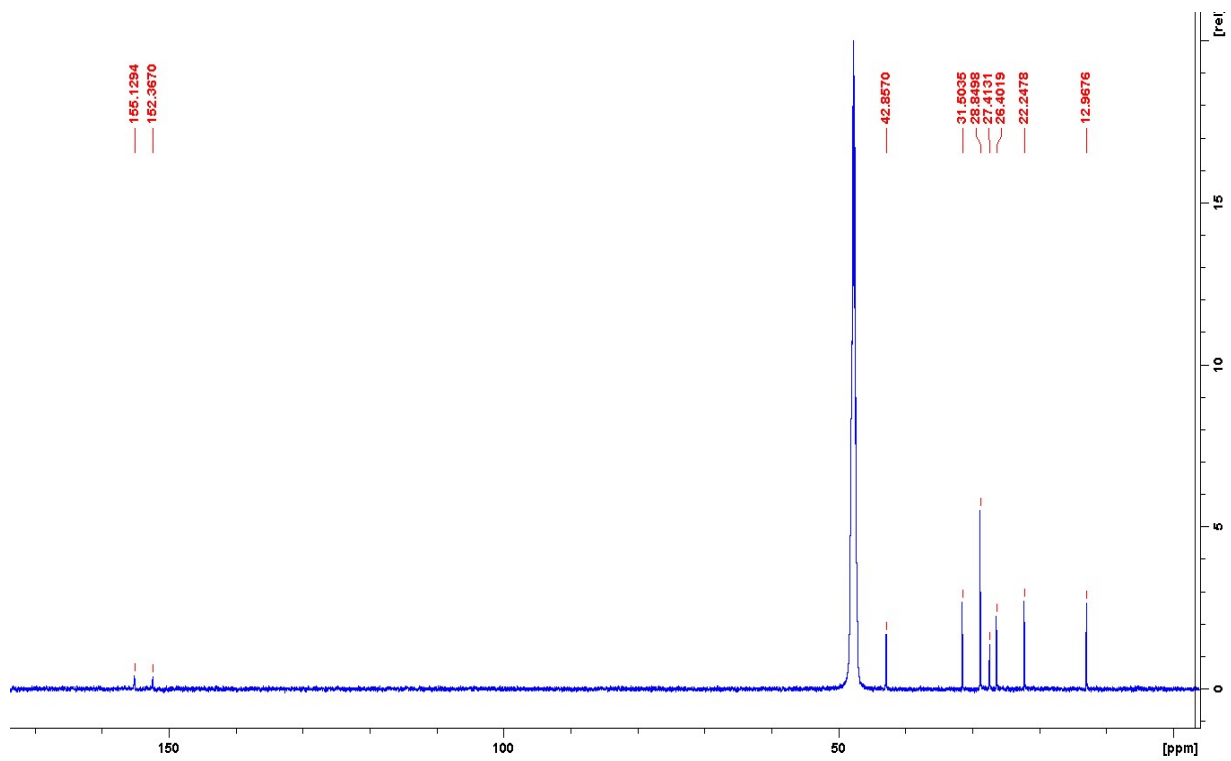


Figure A1.5  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) spectrum of 1-Octylbiguanidium chloride ( $\text{C}_8\text{Cl}$ )

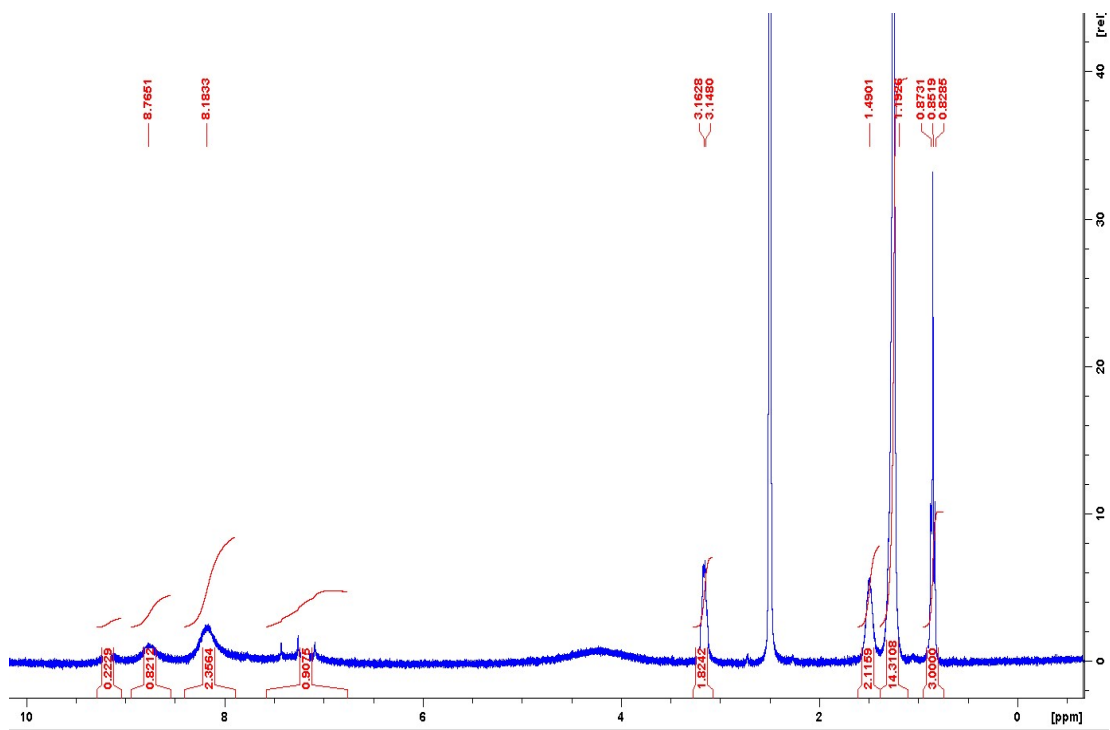


Figure A1.6  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 1-Decylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{10}\text{Cl}$ )

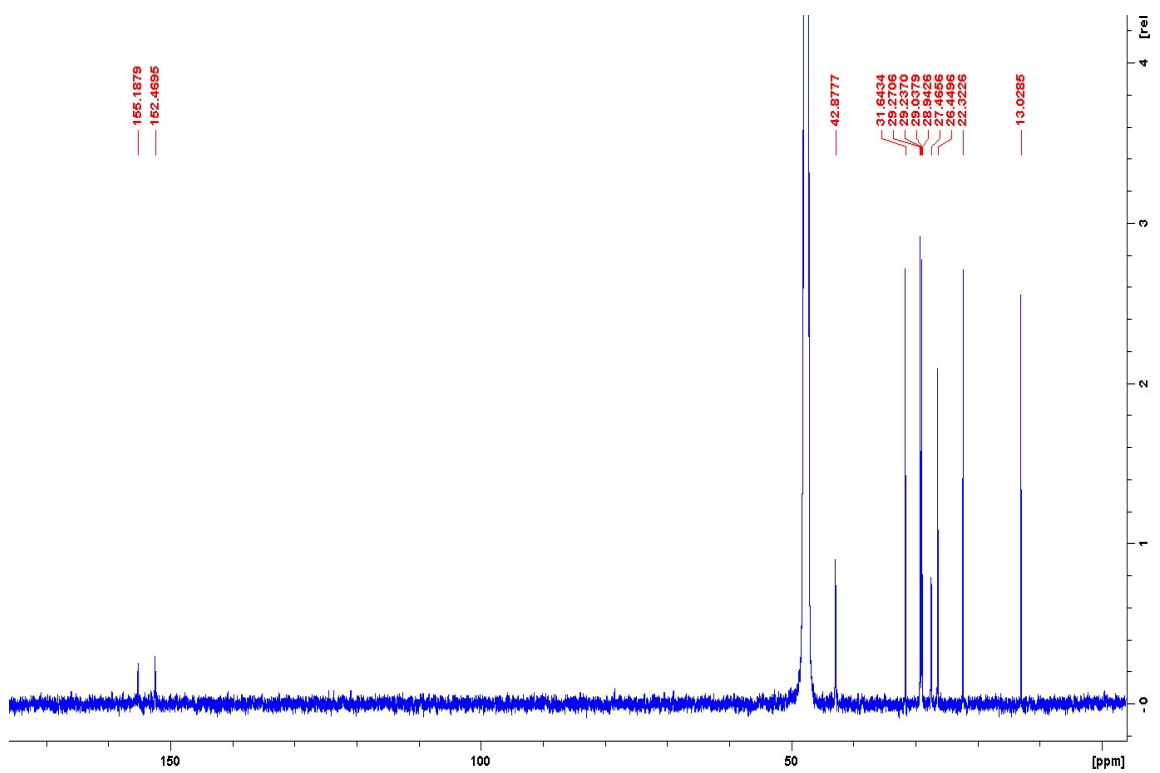


Figure A1.7  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) spectrum of 1-Decylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{10}\text{Cl}$ )

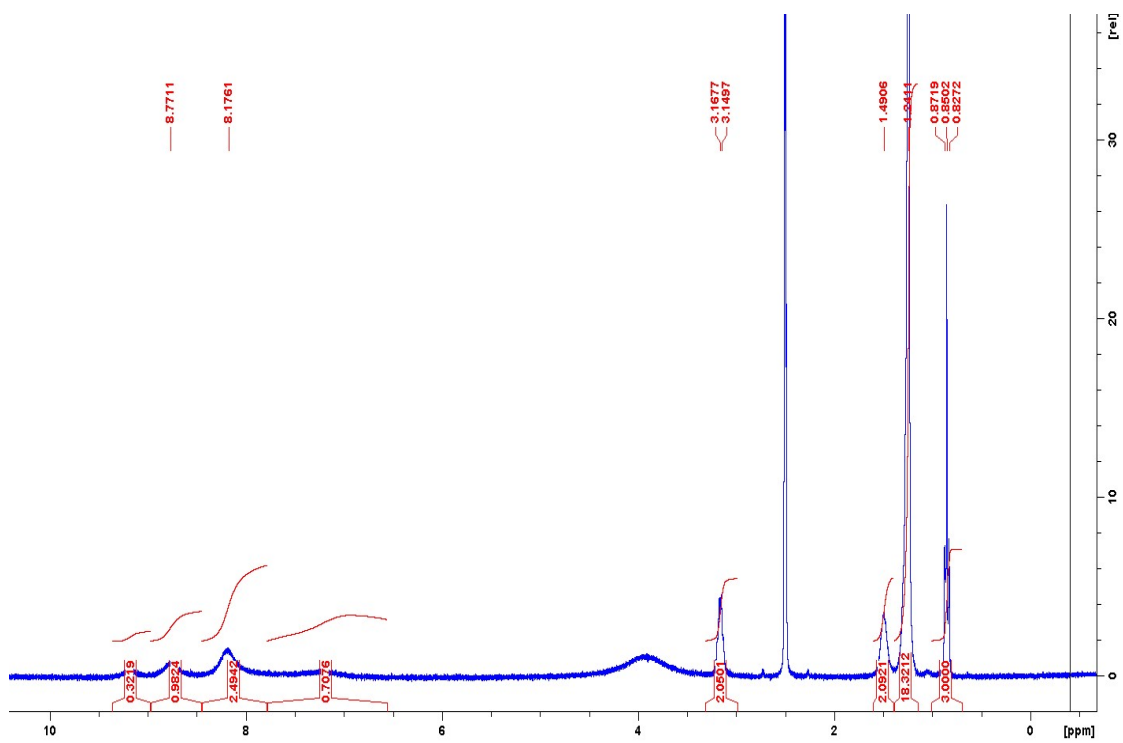


Figure A1.8  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 1-Dodecylbiguanidinium chloride salt ( $\text{C}_{12}\text{Cl}$ )

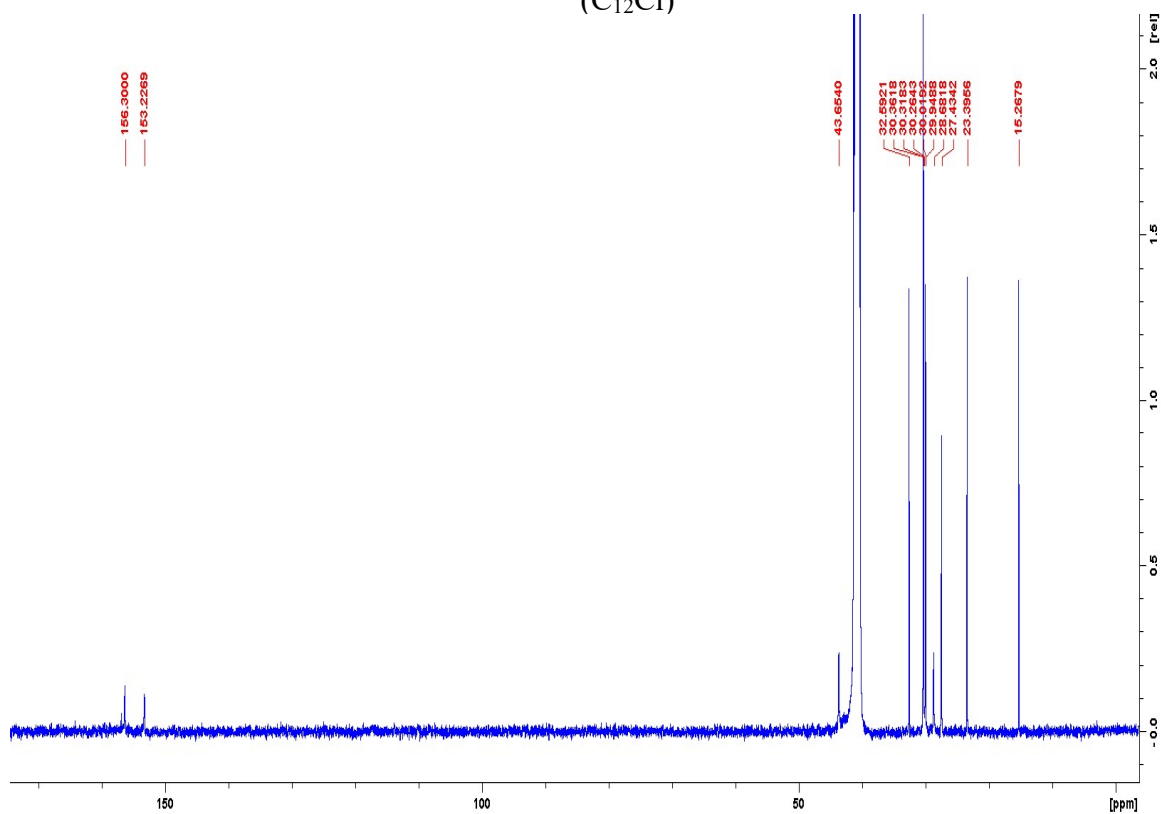


Figure A1.9  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) spectrum of 1-Dodecylbiguanidinium chloride salt ( $\text{C}_{12}\text{Cl}$ )

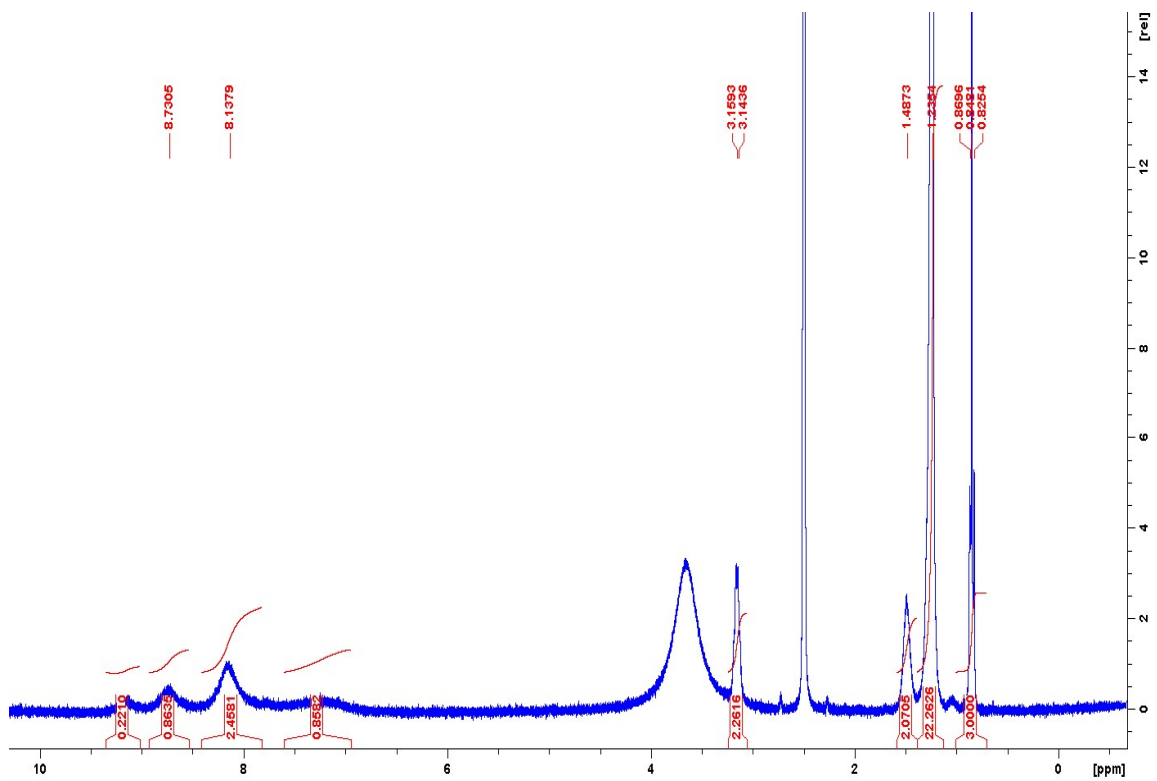


Figure A1.10  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 1-Tetradecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{14}\text{Cl}$ )

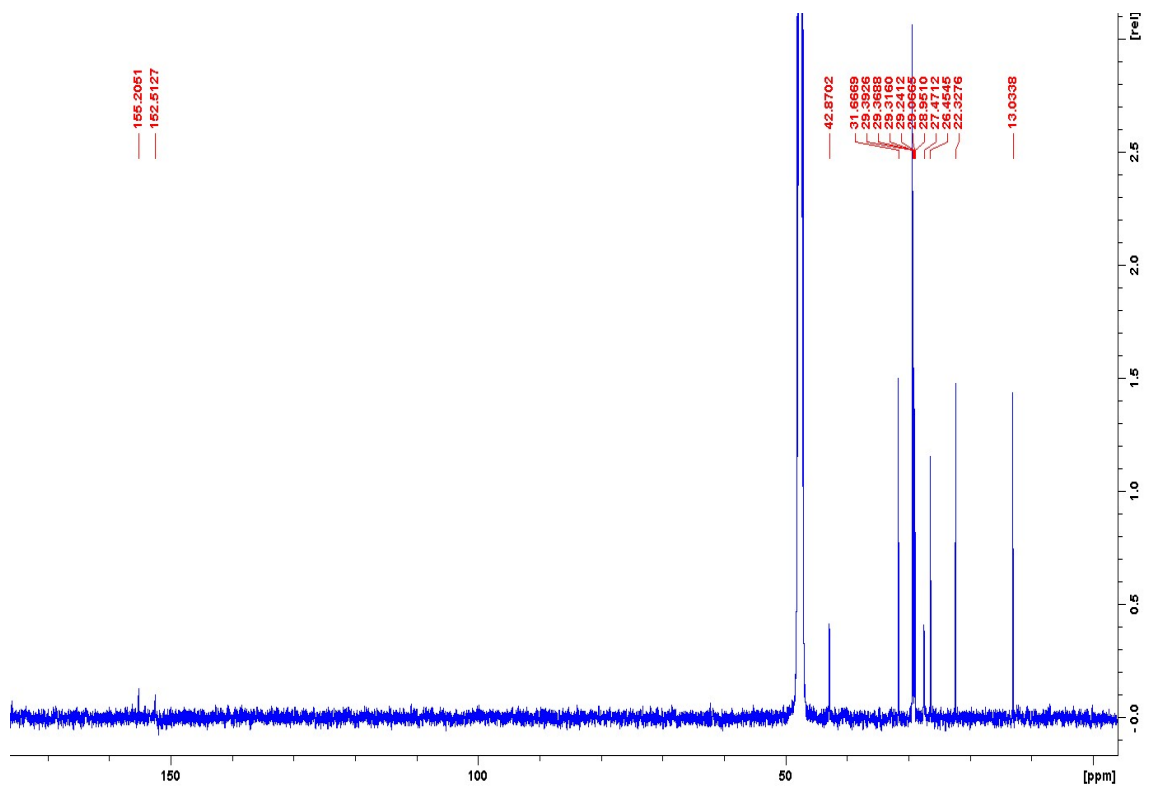


Figure A1.11  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) spectrum of 1-Tetradecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{14}\text{Cl}$ )

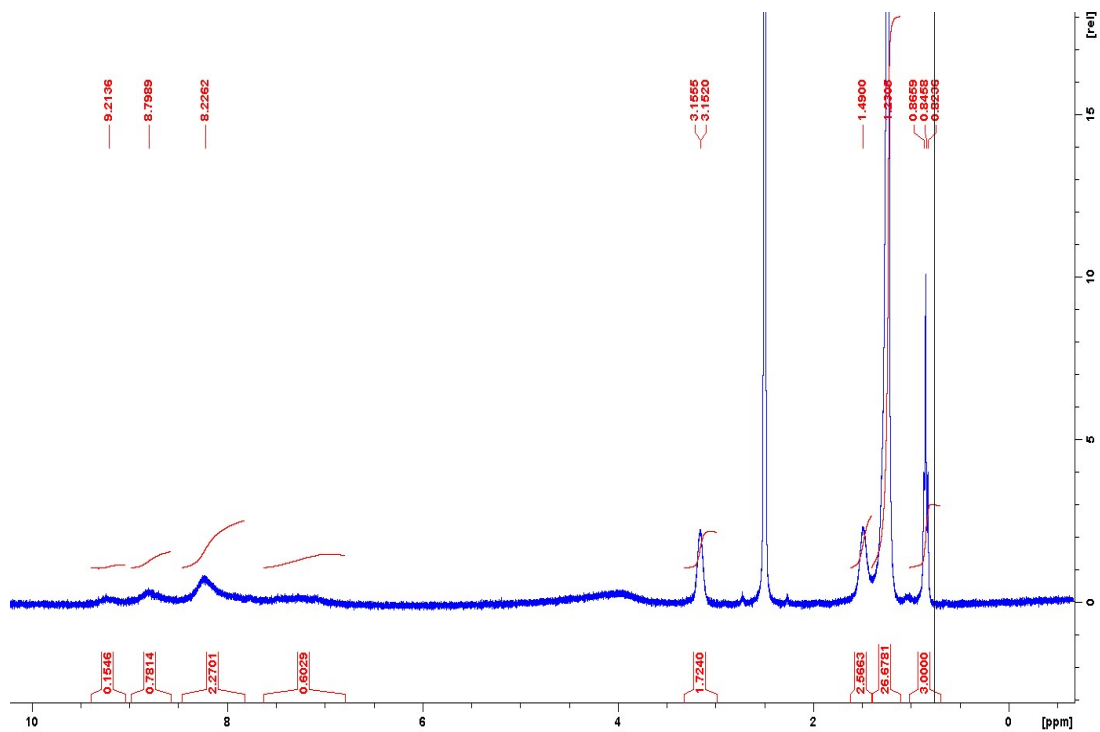


Figure A1.12  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) spectrum of 11-Hexadecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{16}\text{Cl}$ )

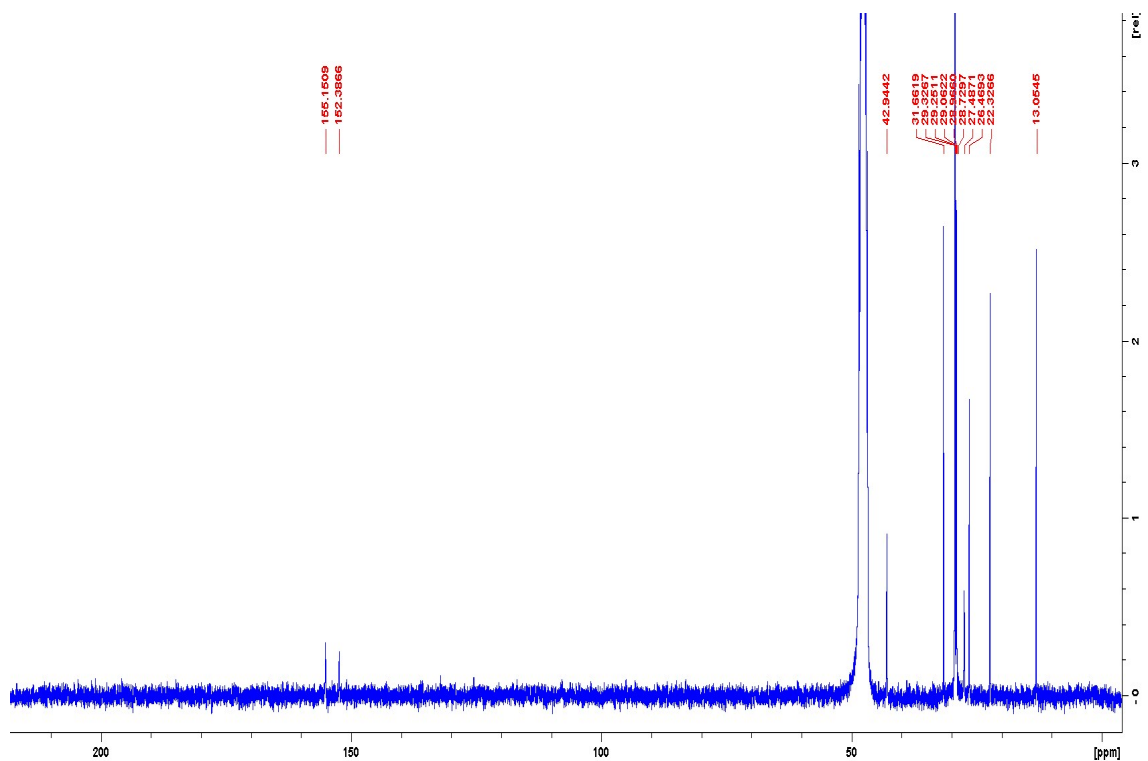


Figure A1.13  $^{13}\text{C}$  NMR (MeOD) spectrum of 1-Hexadecylbiguanidium chloride ( $\text{C}_{16}\text{Cl}$ )

## A1.2 Bacterial membrane depolarization

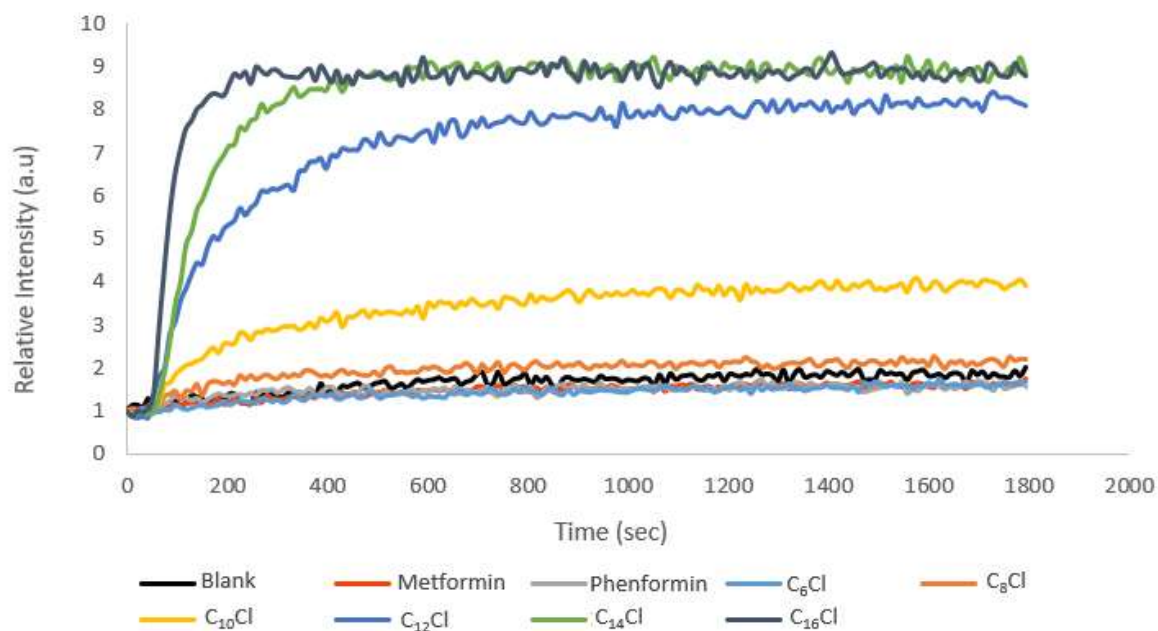


Figure A1.14 Depolarization assay on *E. coli* DH5 $\alpha$ . Alkylbiguanidinium salts were injected at 50 sec at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and each value is the average of three independent experiments.

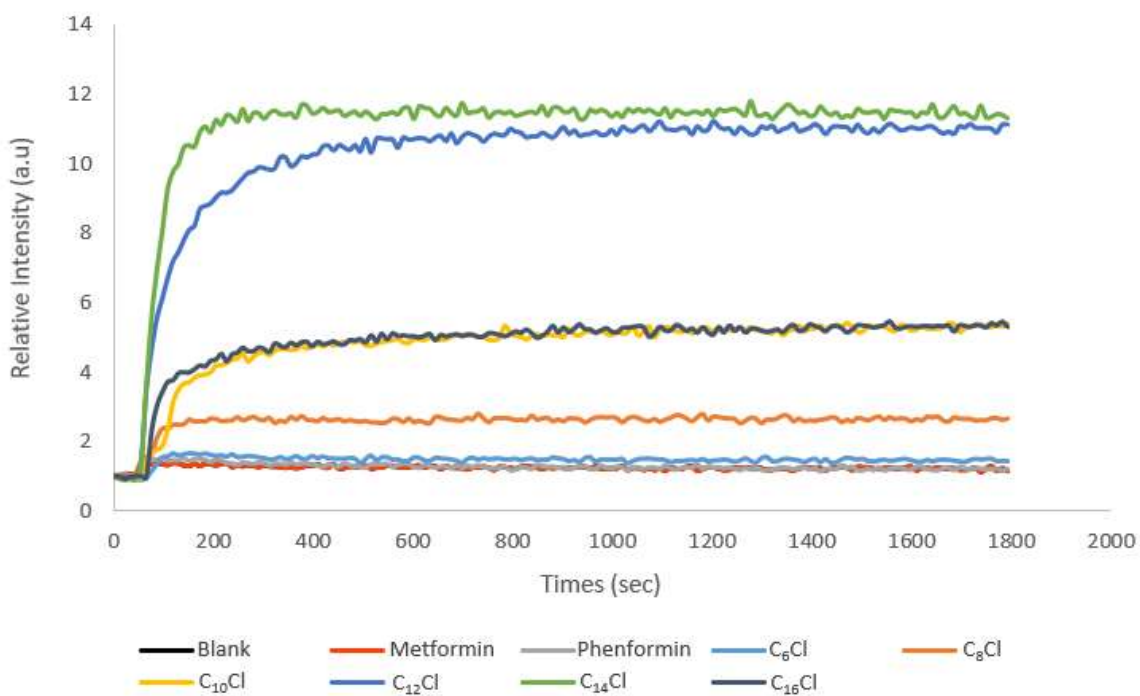


Figure A1.15 Depolarization assay on *B. thuringiensis* HD073. Alkylbiguanidiums were injected at 50 sec at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and each value is the average of three independent experiments.

### A.1.3 Bacterial membrane permeabilization

A bacterial preculture was prepared by the inoculation of 1 mL lysogeny broth (LB) with *E. coli* (MG1655, lacZ+) and 100  $\mu\text{M}$  of isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce lacZ expression. The preculture was incubated overnight at 37  $^{\circ}\text{C}$  with agitation and then added to 75 mL of LB with 100  $\mu\text{M}$  of IPTG and incubated until the  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$ . The bacterial culture was centrifuged for 10 min at 1000 x g at room temperature and rinsed twice with PBS buffer. The pellet was resuspended in PBS to  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.2$ . To each well of a 96-well plate, 125  $\mu\text{L}$  of a 1.25 mM solution of ONPG in PBS buffer and 10  $\mu\text{L}$  of alkylbiguanidiums at the desired concentration in DMSO was added. Immediately prior to the start of data collection, 15  $\mu\text{L}$  of the bacterial solution in PBS was added to each well. ONPG hydrolysis was followed by UV-vis spectroscopy at  $\lambda = 420 \text{ nm}$  with a readout every 60 sec for 20 000 sec. (5h30). The



blank was realised with DMSO. Each measurement was performed in triplicate in three different experiments. The bacterial cell lysis for the maximal reaction rate calculation was performed by sonication using a Sonics & Materials inc. Vibra-Cells VCX-500 Ultrasonic Processor (5 to 15 rounds of 30 seconds sonication until the  $OD_{600nm} = 0$ ).

Reaction rate ratios ( $RR_r$ ) were calculated using the following formula:

$$RR_r = \frac{RR_x - RR_0}{RR_{max} - RR_0}$$

where  $RR_x$  is the reaction rate of ONPG hydrolysis at  $[x]$ ,  $RR_0$  is the reaction rate of ONPG in the absence of a permeabilizing agent (blank) and  $RR_{max}$  is the reaction rate of ONPG in the lysate. Reaction rates were obtained by measuring the slope of the curve of the first 500 sec of ONPG hydrolysis after the addition of the bacterial culture to the wells.  $RR_r$  were then plotted relative to the concentration of  $x$  as shown in **figure A.1.16** for a replicate of **C<sub>10</sub>Cl**. The  $EC_{50}$  from those curves was calculated using the dose-response function analysis of *Origin Pro8*.

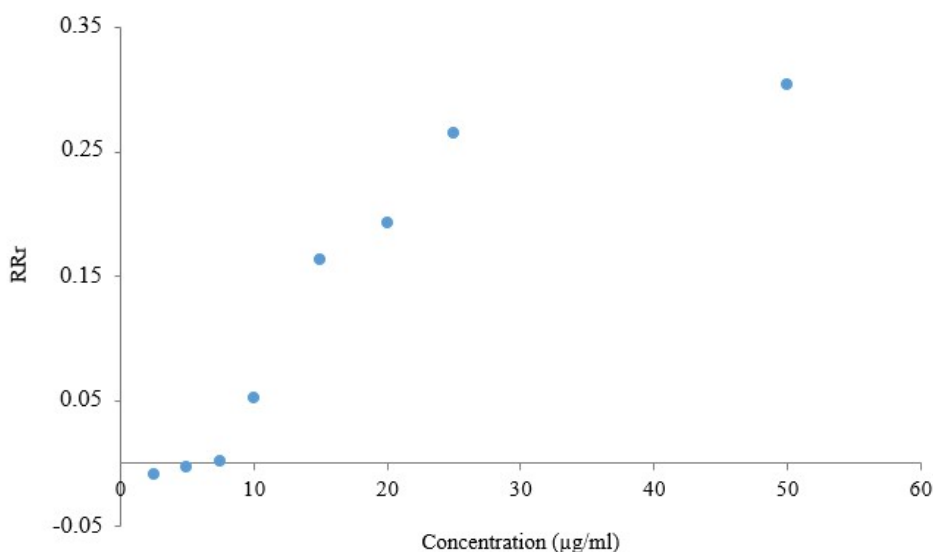


Figure A1.16  $RR_r$  of ONPG hydrolysis relative to the concentration of **C<sub>10</sub>Cl**

**Annexe 2: Informations supplémentaires du chapitre 3  
« Phenylethynylbenzyl - Modified Biguanides Inhibit Pancreatic  
Cancer Tumor Growth »**

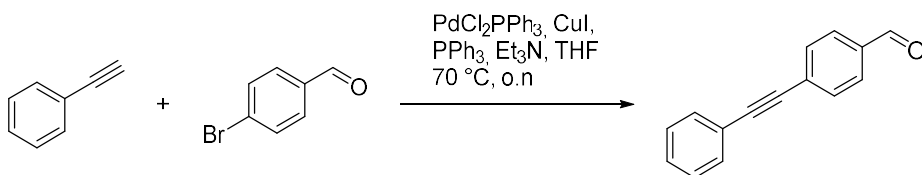
## A2.1 Synthesis and Characterization

### A2.1.1 General

All chemicals were purchased from Aldrich Chemicals in their highest purity and used without further purification. Deuterated dimethylsulfoxide (DMSO- $d^6$ ) and deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) was purchased from CDN Isotopes. NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 400. Coupling constants are given in hertz (Hz) and chemical shifts are given in parts per million (ppm,  $\delta$ ) measured relative to the residual solvent (the multiplicity of the signals are given as s: singlet, d: doublet, t: triplet, and m: multiplet). High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific) triple quadrupole with accurate mass option instrument. (Université de Montréal Mass Spectrometry Facility). MS experiences were performed using an UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF mass spectrometer equipped with a SmartBeam II Nd:Yag/355 nm laser operating at 1 kHz and providing a laser focus down to 20  $\mu$ m in diameter (Bruker Daltonics, Billerica, MA). The data acquisition for MS was performed in positive ion mode using the linear geometry with flexControl 3.4 (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Acceleration voltage was set to +25kV and all other instrumental parameters (delayed extraction parameters, source voltages, detector gain, laser energy, etc.) were optimized for maximum S/N for the drug compounds. L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine was purchased from Avanti Polar Lipids. Transport and depolarization studies as well as absorbance measurements were performed on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer. The hemolysis assay was performed on a Fluostar Optima plate reader.

## A2.1.2 Synthetic procedures

### 4-(phenylethynyl)benzaldehyde



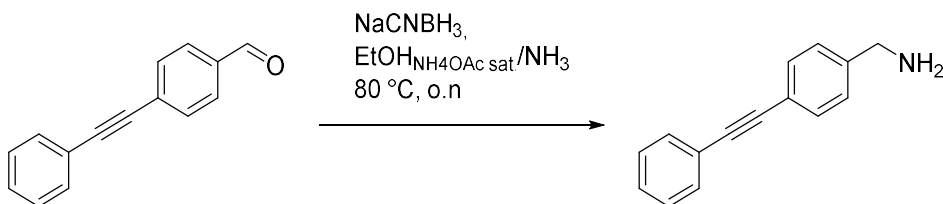
4-Bromobenzaldehyde (4.00 g, 21.6 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.091 g, 0.13 mmol), CuI (0.082 g, 0.43 mmol) and triphenylphosphine (0.113 g, 0.43 mmol) were dissolved in a mixture of THF (100 ml) and triethylamine (22.4 ml, 173 mmol). Phenylacetylene (2.85 ml, 25.9 mmol) was added slowly and the mixture was heated to 70 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature, filtered and washed with THF and concentrated in vacuo. The residue was then purified by flash chromatography (EtOAc/hexane gradient) to afford 4-(phenylethynyl)benzaldehyde (4.42 g, 21.6 mmol) as a crystalline solid (quantitative yield %)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 7.40 (m, 3 H), 7.58 (m, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 10.05 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 89.1, 93.4, 122.1, 128.6, 129.3, 129.9, 130.1, 132.1, 132.5, 135.9, 192.9

**HRMS (120.0 V, ES<sup>+</sup>):** *m/z* (%) = 207.08130 ([C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 208.0843 (M + H)<sup>+</sup>.

### 4-(phenylethynyl)benzylamine



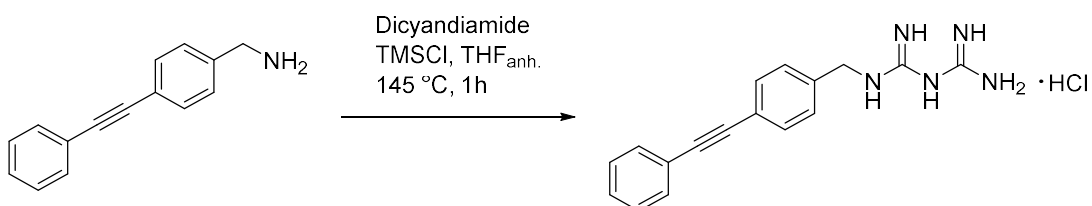
4-(phenylethynyl)benzaldehyde (4.42 g, 21.4 mmol) and sodium cyanoborohydride (4.04 g, 64.3 mmol) were dissolved in a solvent mixture of EtOH saturated with NH<sub>4</sub>OAc and NH<sub>4</sub>OH 5:2 (30 mM), and reaction was heated at 80 °C overnight. EtOH was evaporated under reduced pressure, resulting mix was extracted with DCM and washed with NaHCO<sub>3</sub>. The mixture was concentrated in vacuo and purified by flash chromatography (DCM/MeOH gradient) to afford 4-(phenylethynyl)benzylamine (1.02 g, 4.9 mmol) as a white solid. (20% yield)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 3.77 (s, 2H), 7.42 (m, 6H), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.55 (m, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 42.4, 89.8, 90.4, 122.5, 122.8, 129.3, 129.4, 129.7, 131.9, 132.0, 135.1

**HRMS (120.0 V, ES<sup>+</sup>):** *m/z* (%) = 208.11260 ([C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>1</sub>]+H)<sup>+</sup>, 209.1163 (M + H)<sup>+</sup>.

### **4-(phenylethynyl)benzylbiguanide chloride salt (3.1)**



4-(phenylethynyl)benzylamine (1.00 g, 4.82 mmol), dicyandiamide (0.811 g, 9.64 mmol) and trimethylsilylchloride (2.45 ml, 19.3 mmol) were dissolved in anhydrous THF (23.8 ml, 202 mM) in a sealed tube. The mixture was heated to 145 °C for 1 h. The mixture was filtered and washed with THF, and residue was purified by TLC prep (DCM:MeOH 9:1) to afford 4-(phenylethyl)benzylbiguanide as its chloride salt (0.460 g, 1.40 mmol, 30% yield)

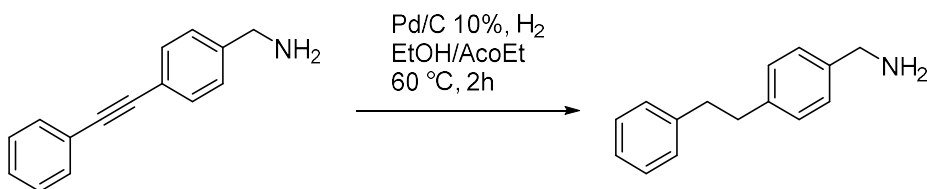
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 4.41 (d, 2H), 7.00 (s, 6H), 7.37 (d, *J* = 4.0 Hz 3H), 7.44 (m, 4H), 7.55 (m, 5H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 44.5, 89.6, 121.4, 122.7, 128.0, 129.2, 131.8, 158.9, 160.8

**HRMS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 292.1567([C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>, 293.1590 (M + H)<sup>+</sup>.

Purity was assessed by HPLC, > 99%

### 4-(phenylethyl)benzylamine



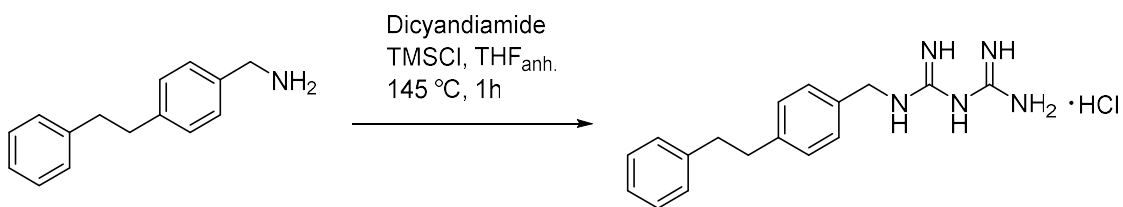
4-(phenylethynyl)benzylamine (0.5 g, 2.41 mmol) and palladium on carbon 10 wt.% (0.51 g, 0.48 mmol) were mixed in 200 ml of a EtOH:AcOEt 1:1 mixture under nitrogen. Reaction was put in a H<sub>2</sub> atmosphere and heated to 60 °C for 2 h. After purging with nitrogen, reaction was filtered on a celite pad and evaporated under reduced pressure to afford 4-(phenylethyl)benzylamine (500 mg, 2.41 mmol) as a white solid (quantitative yield)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 2.87 (s, 4H), 3.70 (s, 2H), 7.18 (m, 3H), 7.27 (m, 8H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 37.2, 37.6, 45.5, 126.3, 127.6, 128.6, 128.7, 128.9, 140.0, 141.2, 142.0

**LRMS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 212.14 ([C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>1</sub>]+H)<sup>+</sup>

### 4-(phenylethyl)benzylbiguanide chloride salt (3.2)



4-(phenylethyl)benzylamine (0.273 g, 1.29 mmol), dicyandiamide (0.217 g, 2.58 mmol) and trimethylsilylchloride (0.655 ml, 5.16 mmol) were dissolved in anhydrous THF (6.38 ml, 202 mM) in a sealed tube. The mixture was heated to 145 °C for 1 h. The mixture was filtered and washed with THF, and residue was purified by TLC prep (DCM:MeOH 9:1) to afford 4-(phenylethyl)benzylbiguanide as its chloride salt (72 mg, 0.24 mmol, 20% yield)

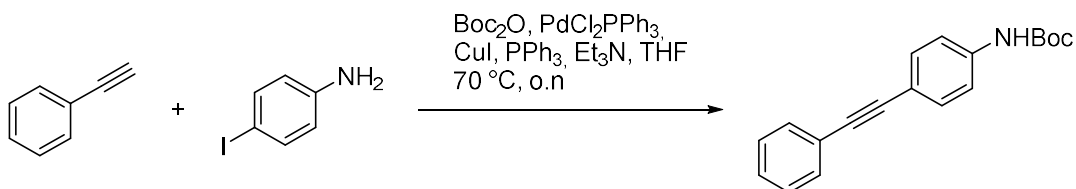
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 2.87 (s, 4H), 4.30 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 2H), 6.92 (s, 5H), 7.24 (m, 10H), 7.64 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):**  $\delta$  = 37.2, 37.5, 42.5, 44.5, 126.3, 127.7, 128.7, 128.8, 129.0, 129.4, 132.0, 140.7, 141.8, 141.9, 142.3, 159.0, 160.3

**HRMS (120.0 V, ES<sup>+</sup>):**  $m/z$  (%) = 296.1876 ([C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>

Purity was assessed by HPLC, 95%

### tert-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate



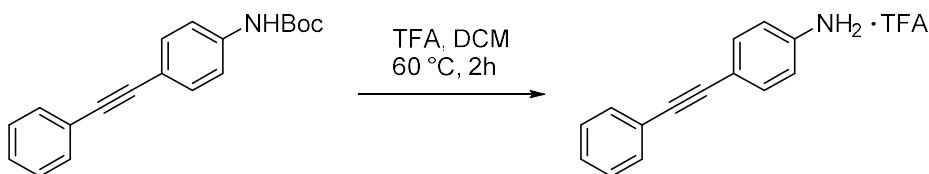
Iodoaniline (1.0 g, 4.6 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (2.0 g, 9.1 mmol) were mixed in THF at room temperature overnight. PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.064 g, 0.091 mmol), CuI (0.017 g, 0.091 mmol), triphenylphosphine (0.024 g, 0.091 mmol) and triethylamine (5.13 ml, 36.5 mmol) were added to the mix, and phenylacetylene (0.7 ml, 6.9 mmol) was added slowly. Reaction was heated to 60 °C overnight. The mixture was cooled to room temperature, filtered and concentrated in vacuo. The residue was then purified by flash chromatography (EtOAc/hexane gradient) to afford *tert*-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate (1.04 g, 3.5 mmol, 78% yield)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ = 1.55 (s, 9 H), 6.57 (s, 1H), 7.37 (m, 5H), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.54 (m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ = 27.4, 28.3, 89.3, 117.5, 118.03, 123.43, 128.0, 128.3, 131.5, 132.45, 138.4, 146.75

LRMS (120.0 V, ES<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 294.38 ([C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>]+H)<sup>+</sup>

#### 4-(phenylethynyl)aniline trifluoroacetic salt



*tert*-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate (1.39 g, 4.7 mmol) and trifluoroacetic acid (5 eq.) were stirred in DCM at 60 °C for 2h. Solvent was evaporated under reduced pressure and reaction was purified on a silica column (DCM:MeOH gradient) to afford 4-(phenylethynyl)aniline trifluoroacetic salt (1.44 g, 4.7 mmol, quantitative yield)

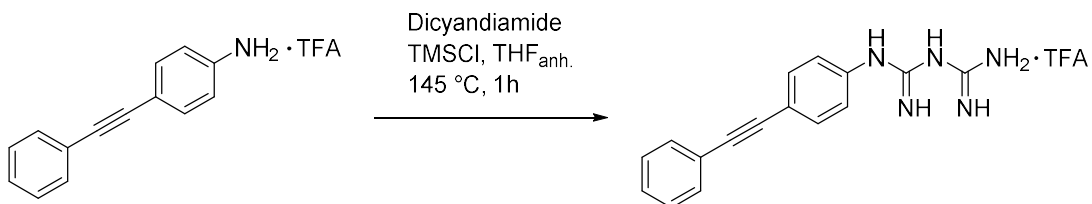


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 4.15 (s, 2 H), 6.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (m, 5H), 7.77 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 91.6, 114.1, 123.8, 128.0, 129.1, 131.2, 133.2, 150.0

**LRMS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 212.11 ([C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>1</sub>]+H)<sup>+</sup>

**(4-(phenylethynylphenyl)biguanide trifluoroacetic salt (3.3))**



4-(phenylethynyl)aniline trifluoroacetic salt (0.350 g, 1.19 mmol), dicyandiamide (0.20 g, 2.37 mmol) and trimethylsilylchloride (0.602 ml, 4.74 mmol) were dissolved in anhydrous THF (5.86 ml, 202 mM) in a sealed tube. The mixture was heated to 145 °C for 1 h. The mixture was filtered and washed with THF, and residue was triturated with EtOH to afford (4-(phenylethynylphenyl)biguanide as its trifluoroacetic acid salt (0.18 g, 0.31 mmol, 26% yield)

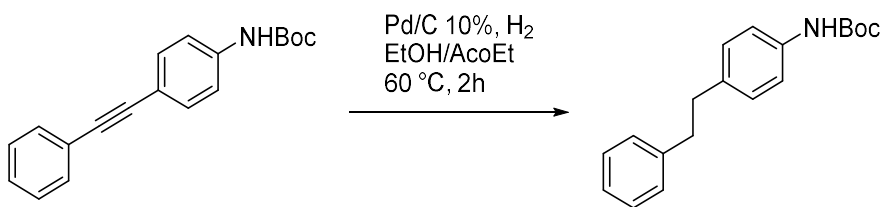
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 7.08 (s, 3 H), 7.27 (m, 6H), 7.45 (s, 3H), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 44.9, 119.5, 126.9, 128.7, 130.0, 131.0, 135.9, 156.0, 163.3

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 296.1508 ([C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>]+H+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>

**Purity** was assessed by HPLC, 95%

### tert-butyl (4-phenethylphenyl)carbamate



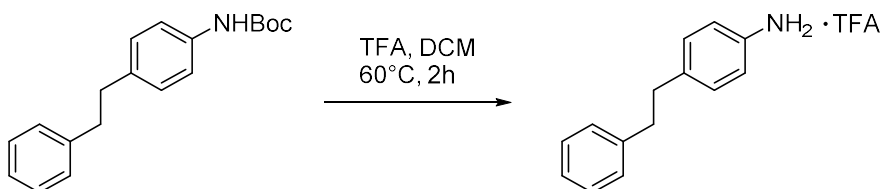
*tert*-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate (0.35 g, 1.19 mmol) and palladium on carbon 10 wt.% (0.25 g, 0.239 mmol) were mixed in 200 ml of a EtOH:AcOEt 1:1 mixture under nitrogen. Reaction was put in a H<sub>2</sub> atmosphere and heated to 60 °C for 2 h. After purging with nitrogen, reaction was filtered on a celite pad and evaporated under reduced pressure to afford *tert*-butyl (4-phenethylphenyl)carbamate (0.35 g, 1.9 mmol) as a white solid (quantitative yield)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ = 1.53 (s, 9H), 2.89 (s, 4H), 6.42 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 7.19 (m, 4H), 7.28 (m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ = 28.5, 37.3, 38.1, 58.5, 80.4, 118.7, 126.0, 128.3, 128.6, 129.0, 136.3, 136.6, 141.9

LRMS (120.0 V, ES<sup>+</sup>): *m/z* (%) = 298.52 ([C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>]+H)<sup>+</sup>

### 4-(phenylethylphenyl)aniline trifluoroacetic salt



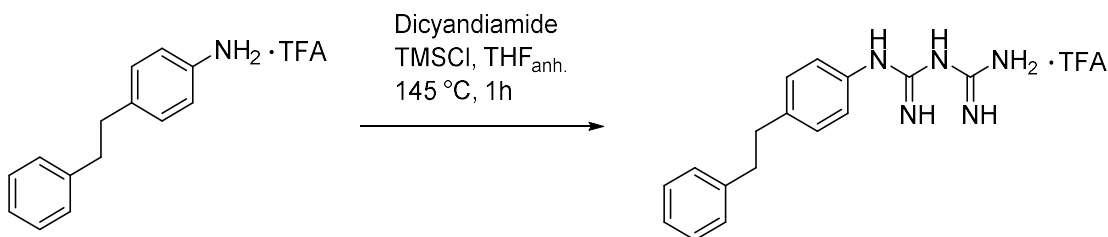
*tert*-butyl (4-(phenylethyl)phenyl)carbamate (0.35 g, 1.2 mmol) and trifluoroacetic acid (5 eq.) were stirred in DCM at 60 °C for 2 h. Solvent was evaporated under reduced pressure and reaction was purified on a silica column (DCM:MeOH gradient) to afford 4-(phenylethylphenyl)aniline trifluoroacetic salt (0.35 g, 1.2 mmol, 96% yield)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS): δ = 2.88 (s, 4 H), 7.07 (s, 1H), 7.18 (m, 6H), 7.27 (m, 5H),

<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, TMS): δ = 36.6, 37.4, 121.9, 126.3, 128.7, 128.9, 130.0, 133.0, 141.7

LRMS (120.0 V, ES+): *m/z* (%) = 198.50 ([C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>1</sub>]+H)<sup>+</sup>

#### **(4-(phenylethylphenyl)biguanide trifluoroacetic acid salt (3.4))**



4-(phenylethylphenyl)aniline trifluoroacetic salt (0.350 g, 1.17 mmol), dicyandiamide (0.20 g, 2.34 mmol) and trimethylsilylchloride (0.594 ml, 4.68 mmol) were dissolved in anhydrous THF (5.86 ml, 202 mM) in a sealed tube. The mixture was heated to 145 °C for 1 h. The mixture was filtered and washed with THF, and residue was triturated with EtOH to afford (4-(phenylethylphenyl)biguanide as its trifluoroacetic acid salt (0.150 g, 0.41 mmol, 35%)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 2.86 (s, 4 H), 7.23 (m, 10H), 7.45 (s, 6H), 8.70 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR (70 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 36.9, 37.5, 122.2, 126.3, 128.7, 128.9, 129.2, 136.9, 141.9, 155.9, 161.4

**MS (120.0 V, ES+):** *m/z* (%) = 282.1721 ([C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>]+H)<sup>+</sup>

**Purity** was assessed by HPLC, > 99%

### **Anion exchange, General procedure**

PEB-biguanidium **3.3** and **3.4** as their trifluoroacetic salt were dissolved in methanol and deprotonated with NaHCO<sub>3</sub> (4 equivalents) for 3 hours at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo and the residue was triturated with EtOAc. The precipitate was filtered and washed to afford deprotonated PEB-biguanide **3.3** and **3.4** in quantitative yield.

PEB-biguanidium **3.1** and **3.2** as their chloride salt and bis(trifluoromethane)sulfonamide lithium salt (LiNTf<sub>2</sub>, 2.5 equivalents) or lithium trifluoromethanesulfonate (LiOTf, 2.5 eq) were dissolved in methanol and stirred overnight at room temperature. PEB-biguanidium **3** and **4** were prepared following the same procedure with the addition of 2 equivalents of HCl to the reaction. The mixture was concentrated in vacuo and the residue was triturated in EtOAc. The precipitate was then filtered and washed with EtOAc to afford the PEB-biguanidium **3.1**, **3.2**, **3.3** or **3.4** as a bis(trifluoromethane)sulfonamide salt or a trifluoromethanesulfonate salt in quantitative yields.

#### **OTF:**

**MS (120.0 V, ES-):** *m/z* (%) = 148.9527 ([CF<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SH]-H)<sup>-</sup>

**<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 77.75 (s, 3F)

#### **NTf<sub>2</sub>:**

**MS (120.0 V, ES-):** *m/z* (%) = 279.9192 ([C<sub>2</sub>F<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>H]-H)<sup>-</sup>

**<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):** δ = 78.73 (s, 6F)

## A2.2 NMR Spectra

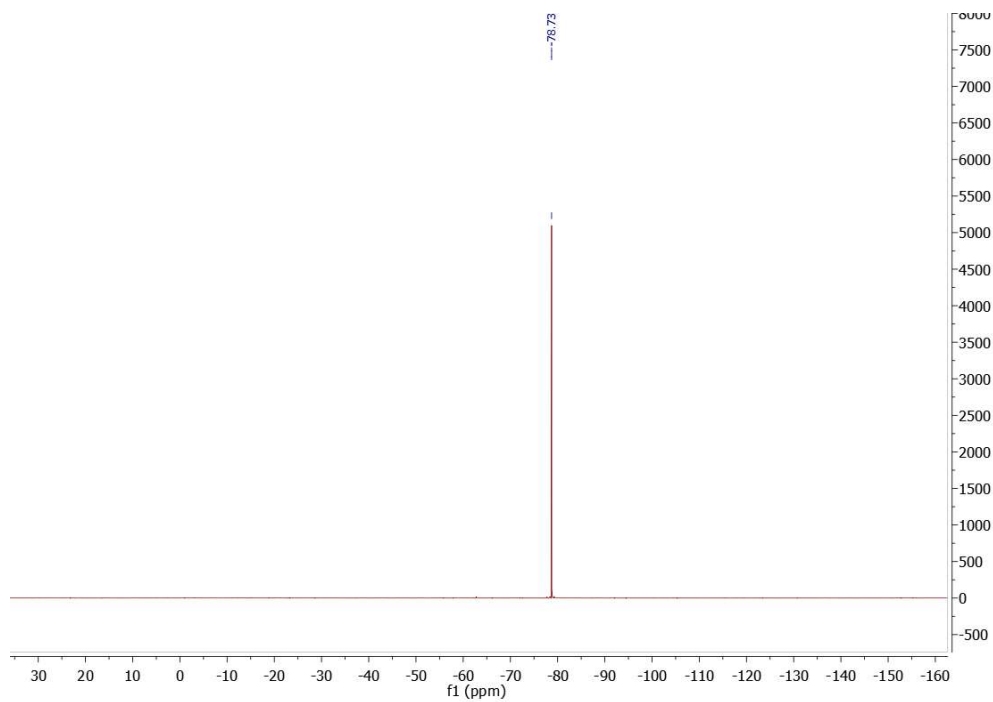


Figure A2.1  $^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz) spectrum of  $\text{NTf}_2^-$  (from **3.1a**) in DMSO-d<sub>6</sub>

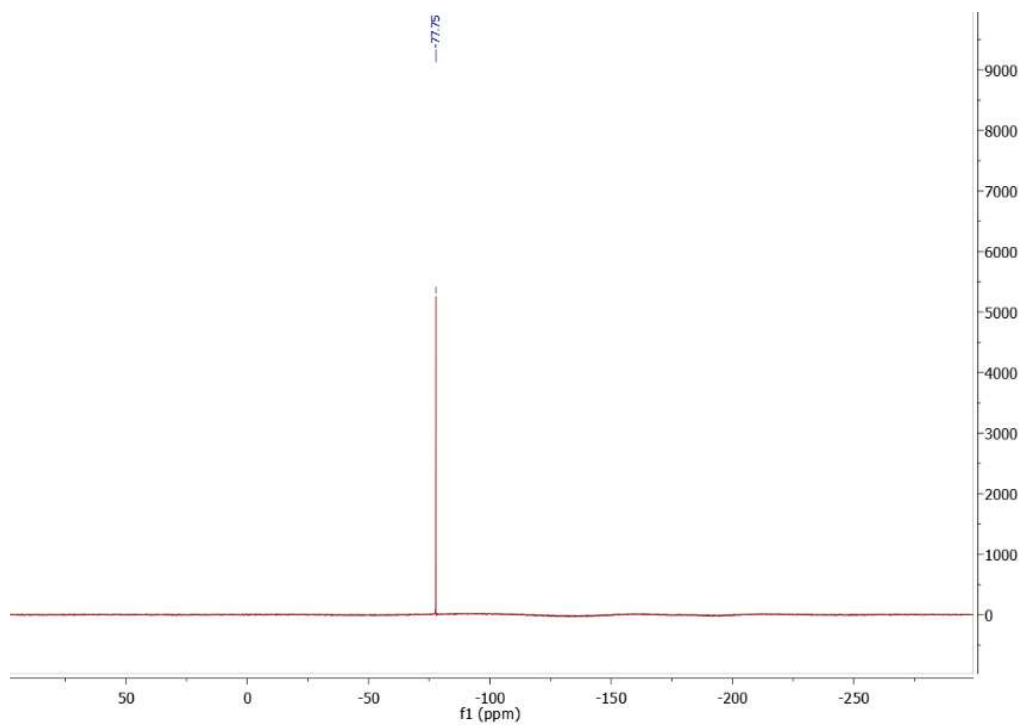


Figure A2.2  $^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz) spectrum of  $\text{OTf}^-$  (from **3.1b**) in DMSO-d<sub>6</sub>

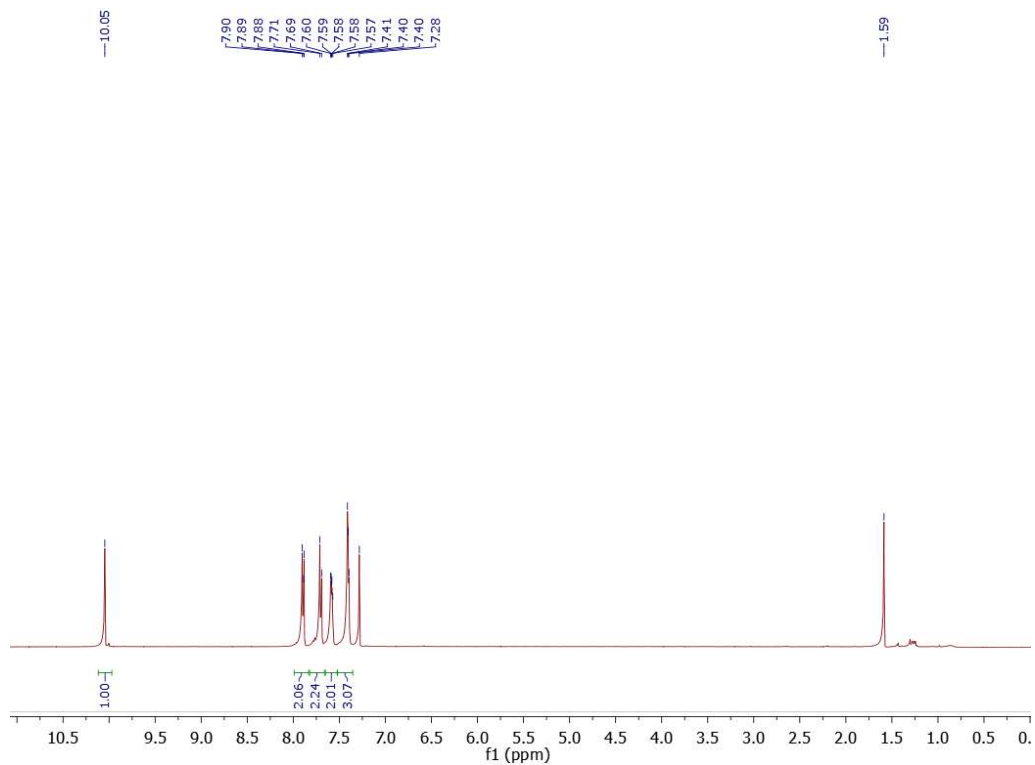


Figure A2.3  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzaldehyde in  $\text{CDCl}_3$

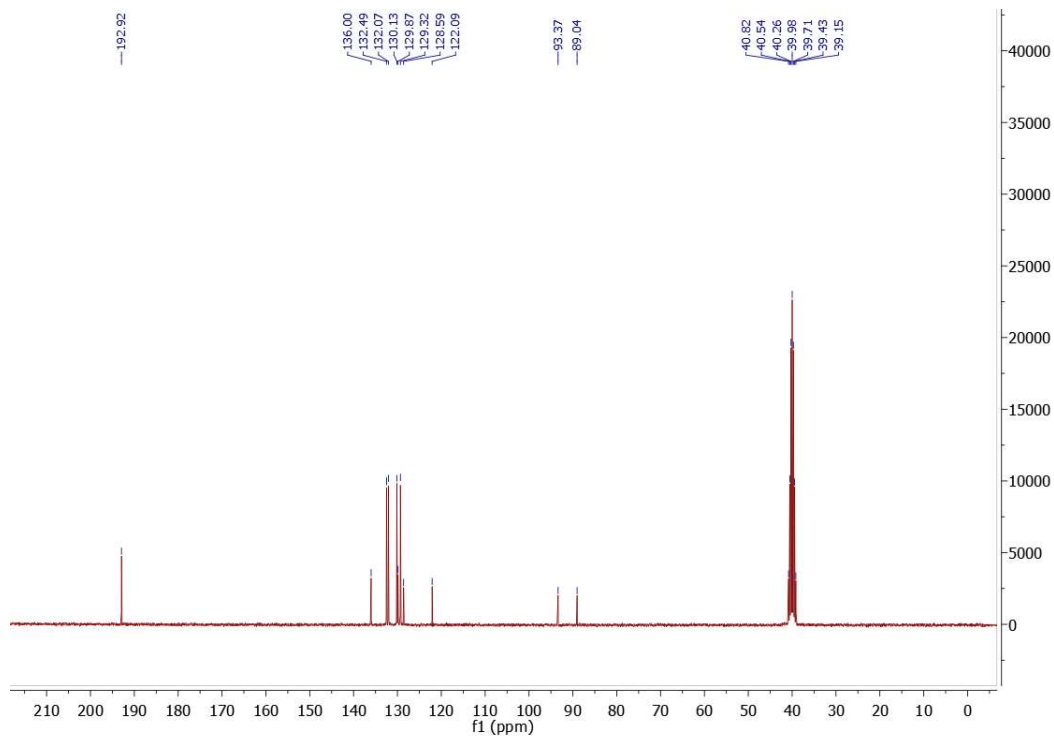


Figure A2.4  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzaldehyde in  $\text{CDCl}_3$

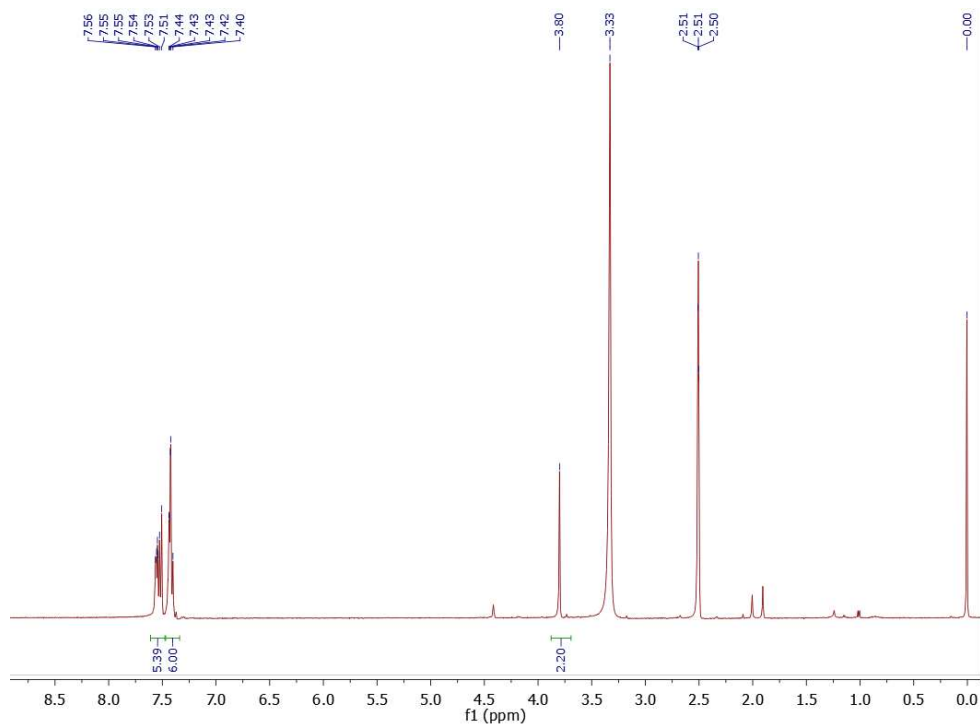


Figure A2.5  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylamine in DMSO-d<sub>6</sub>

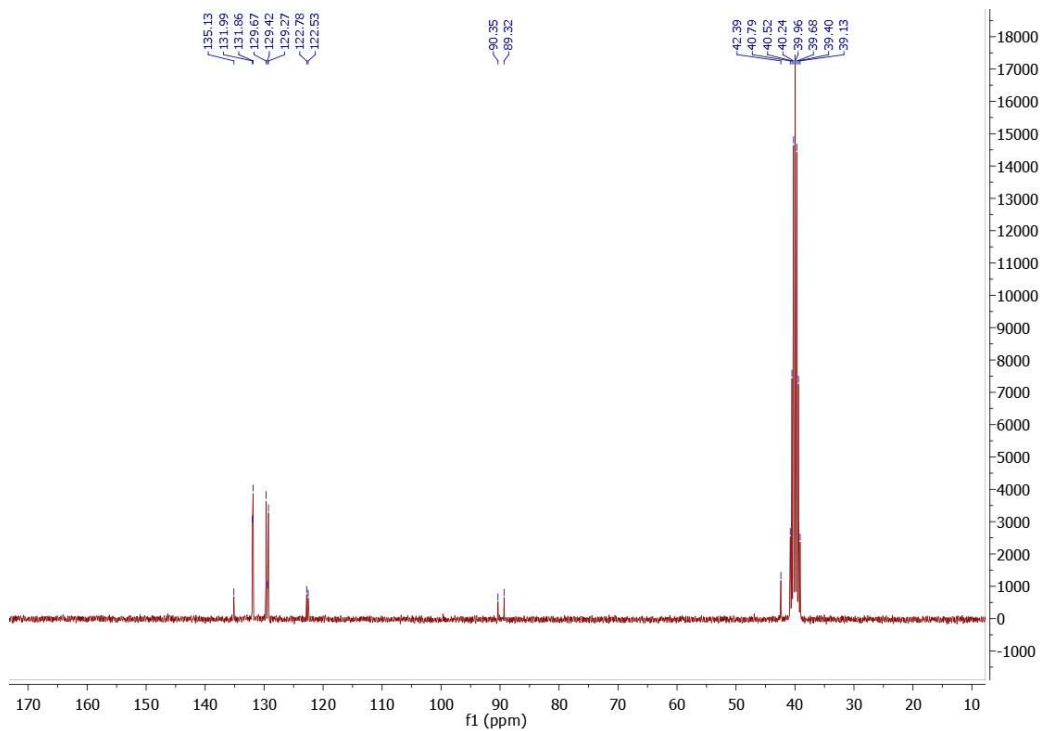


Figure A2.6  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylamine in DMSO-d<sub>6</sub>

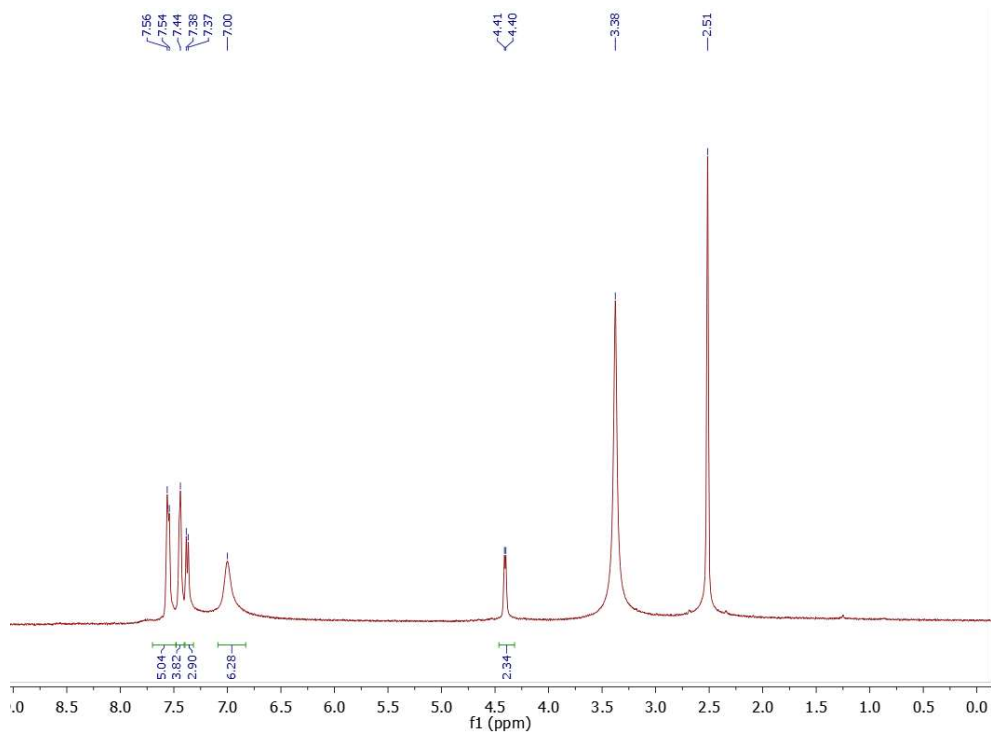


Figure A2.7  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylbiguanide chloride salt (**3.1**) in DMSO- $d_6$

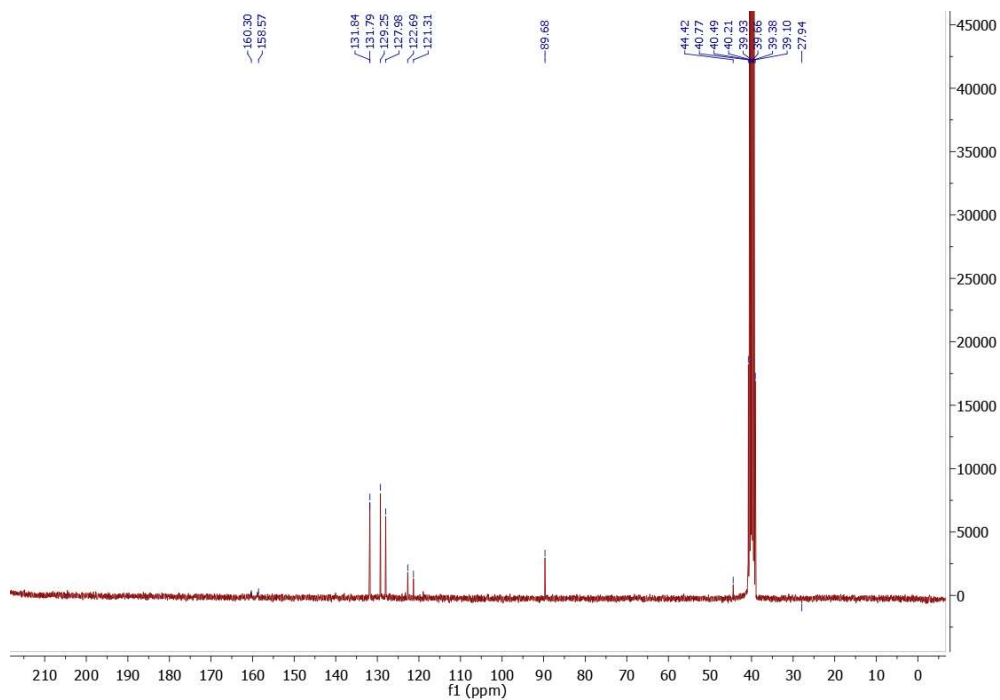


Figure A2.8  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)benzylbiguanide chloride salt (**3.1**) in DMSO- $d_6$



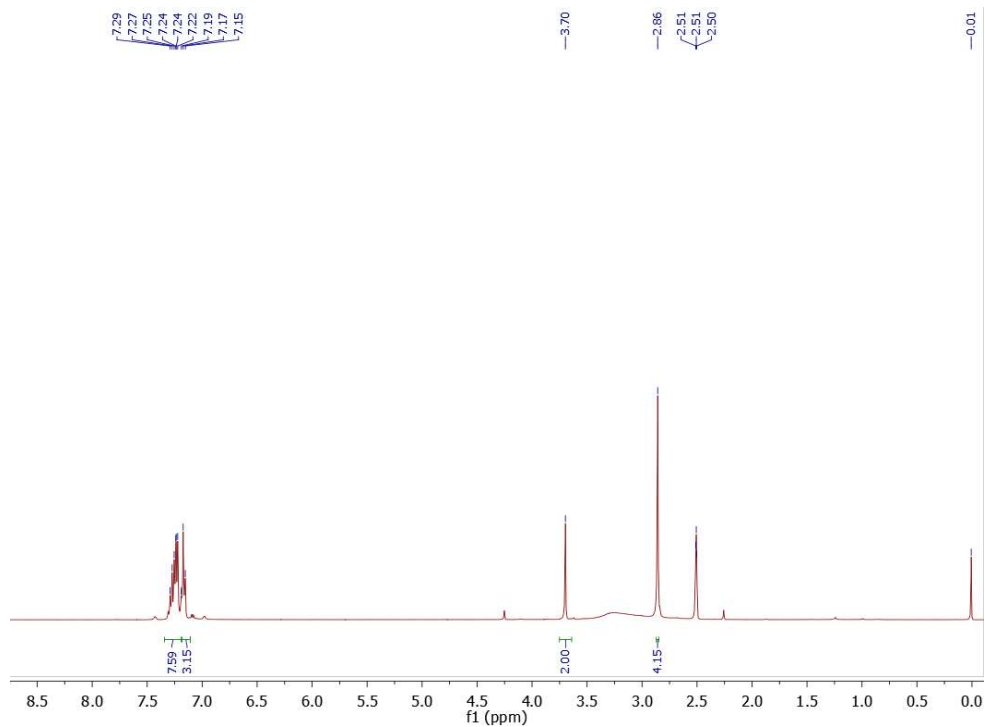


Figure A2.9  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylamine in DMSO-d<sub>6</sub>

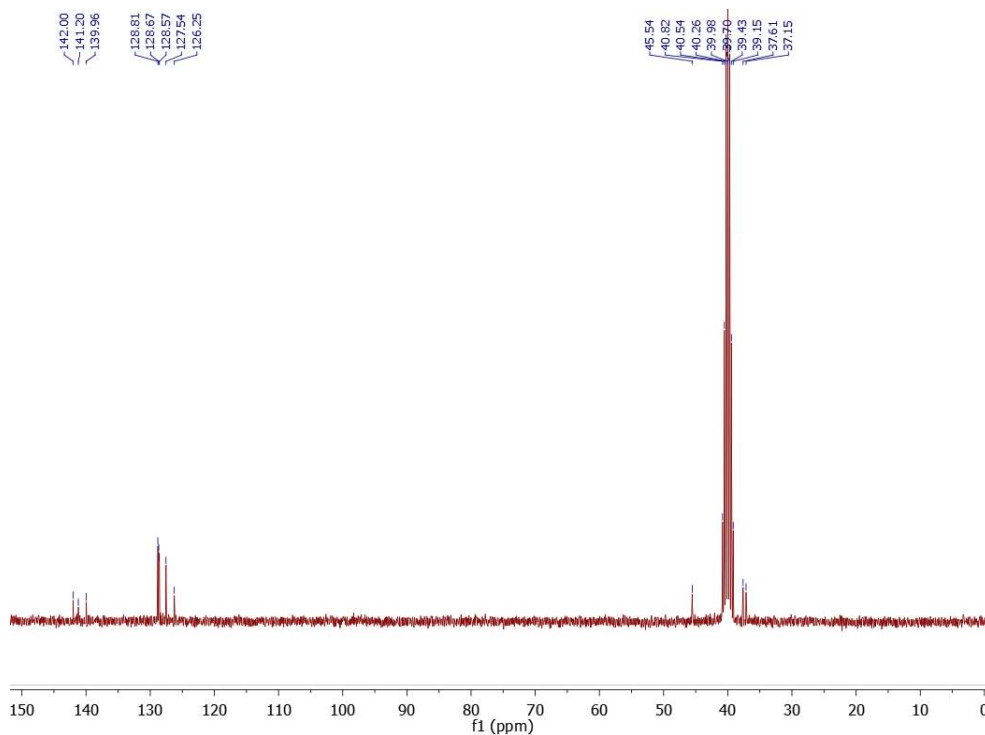


Figure A2.10  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylamine in DMSO-d<sub>6</sub>

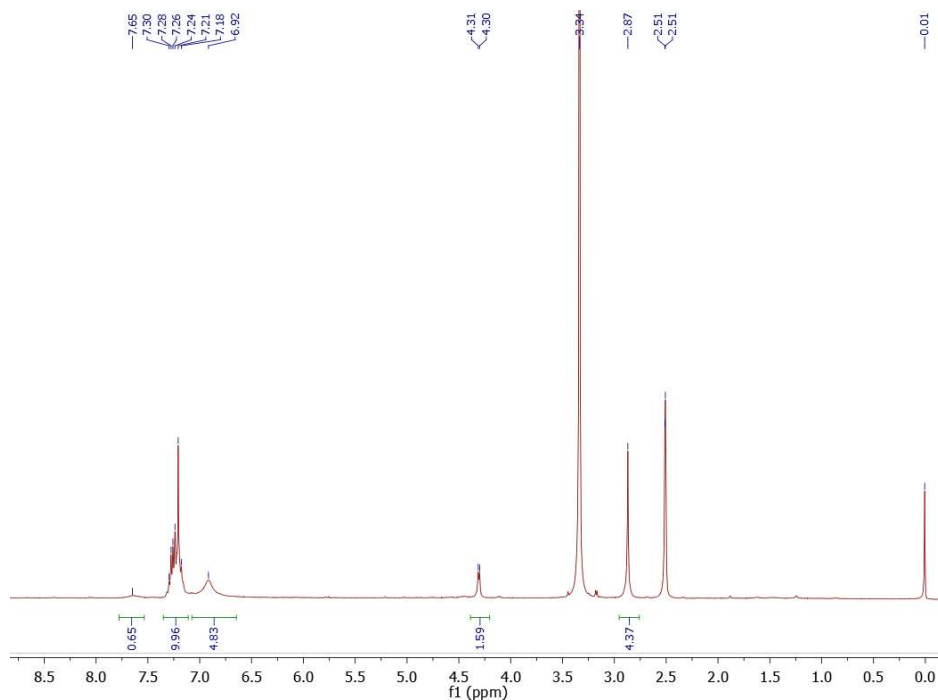


Figure A2.11  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylbiguanide chloride salt (**3.2**) in DMSO- $d_6$

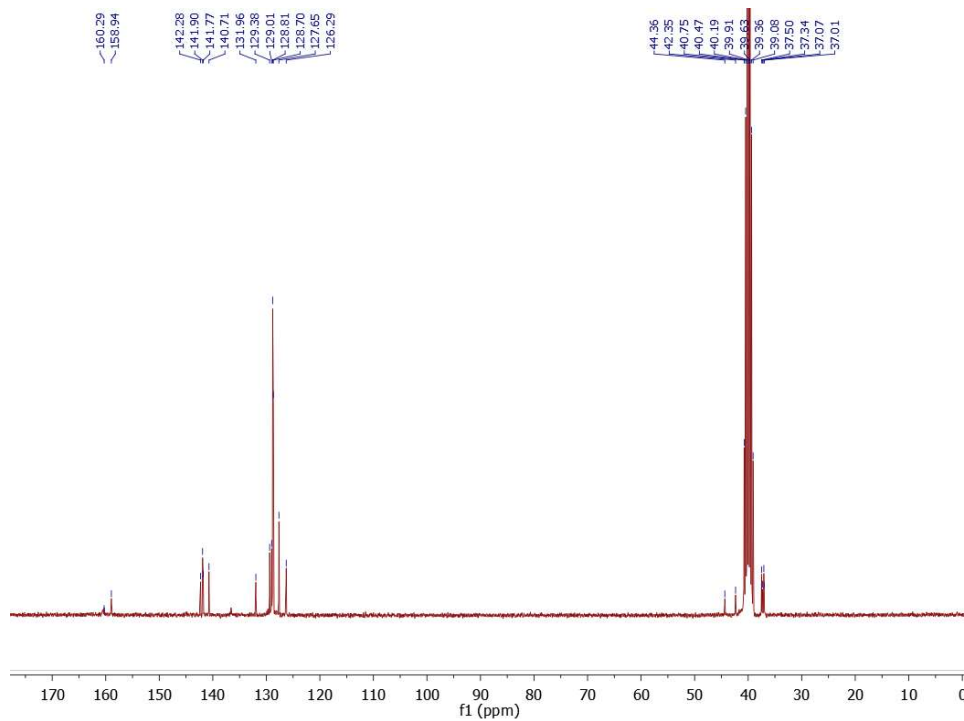


Figure A2.12  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethyl)benzylbiguanide chloride salt (**3.2**) in DMSO- $d_6$

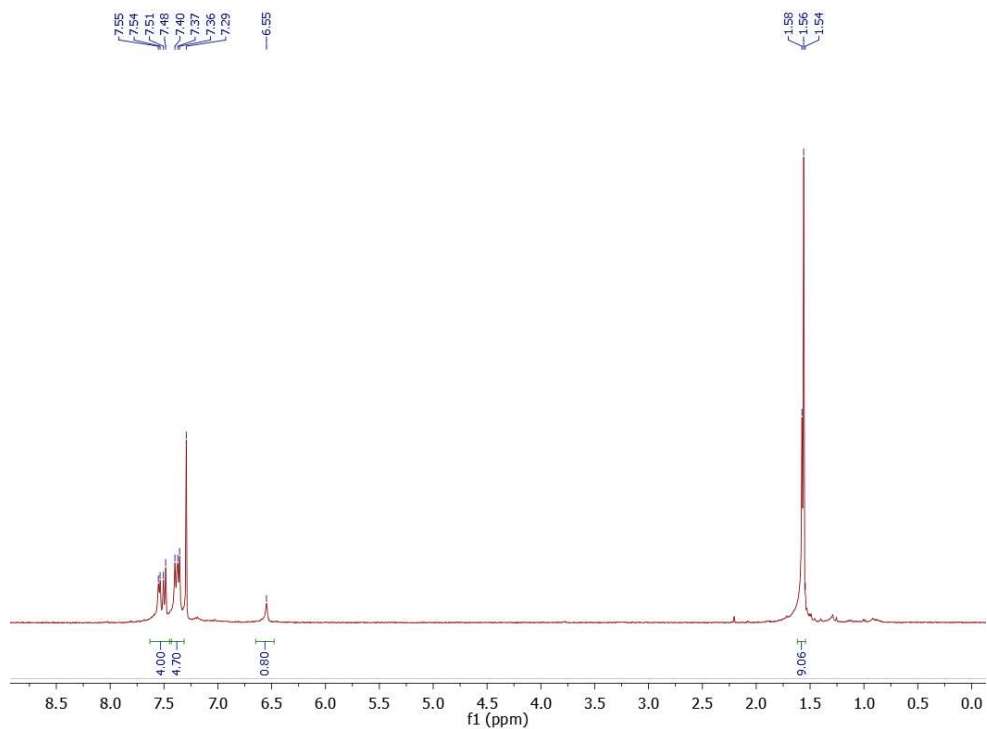


Figure A2.13  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of tert-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate in  $\text{CDCl}_3$

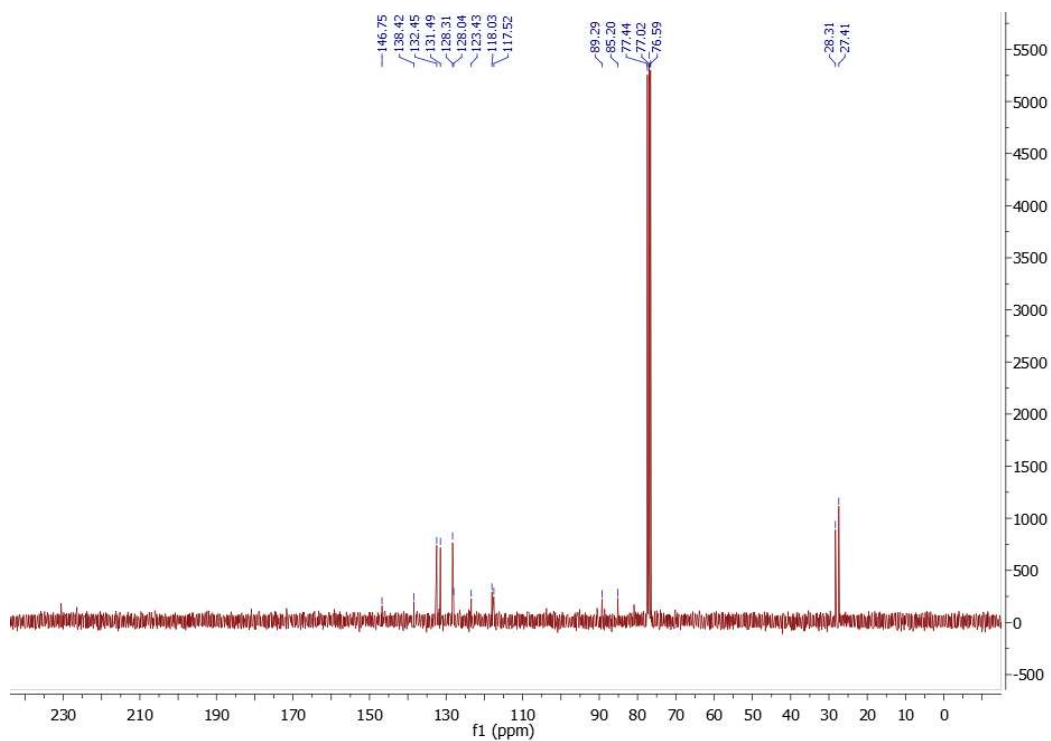


Figure A2.14  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of tert-butyl (4-(phenylethynyl)phenyl)carbamate in  $\text{CDCl}_3$

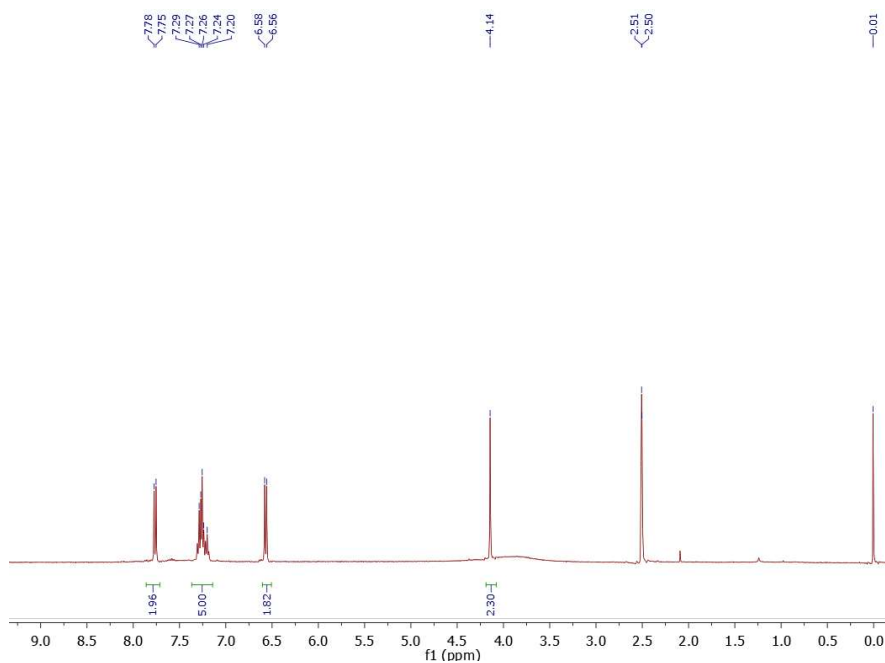


Figure A2.15  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO- $d_6$

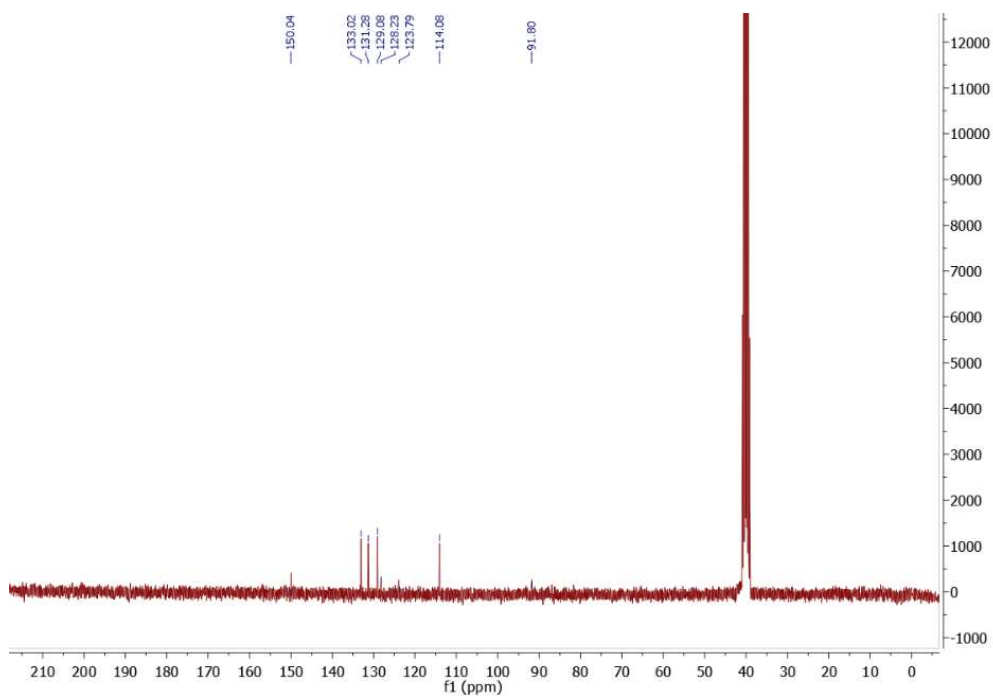


Figure A2.16  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethynyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO- $d_6$

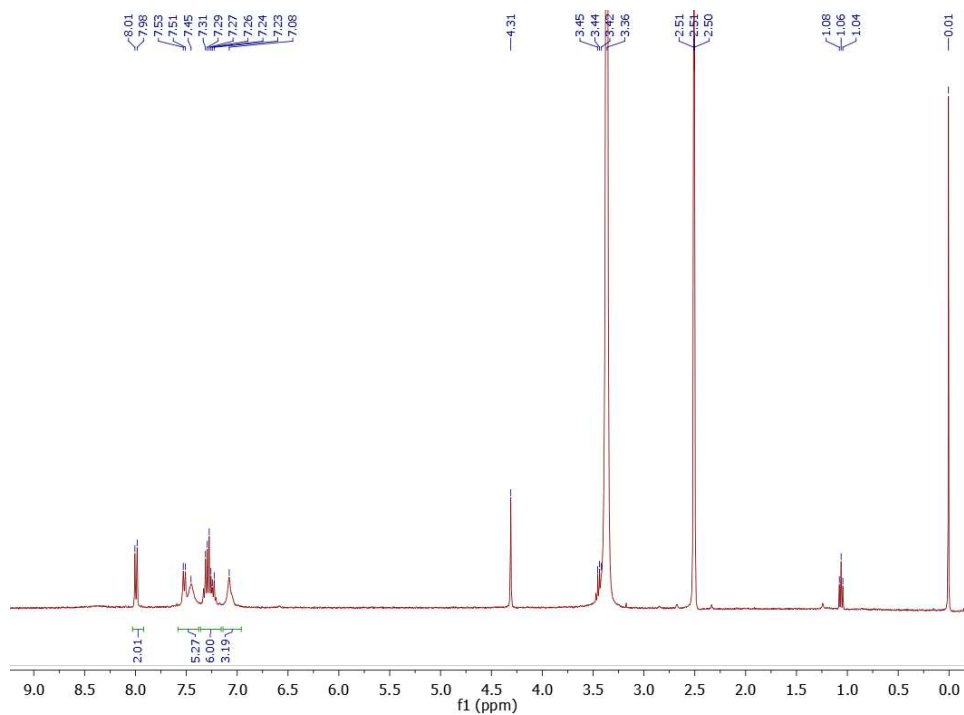


Figure A2.17  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of (4-(phenylethynylphenyl)biguanide trifluoroacetic salt (**3.3**) in DMSO- $d_6$

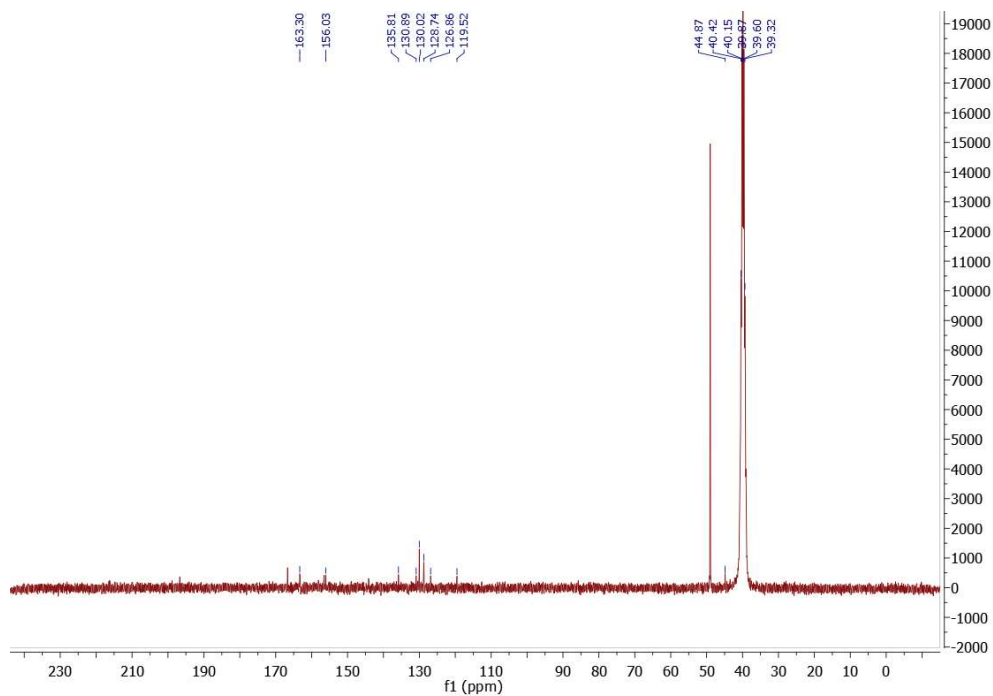


Figure A2.18  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of (4-(phenylethynylphenyl)biguanide trifluoroacetic salt (**3.3**) in DMSO- $d_6$

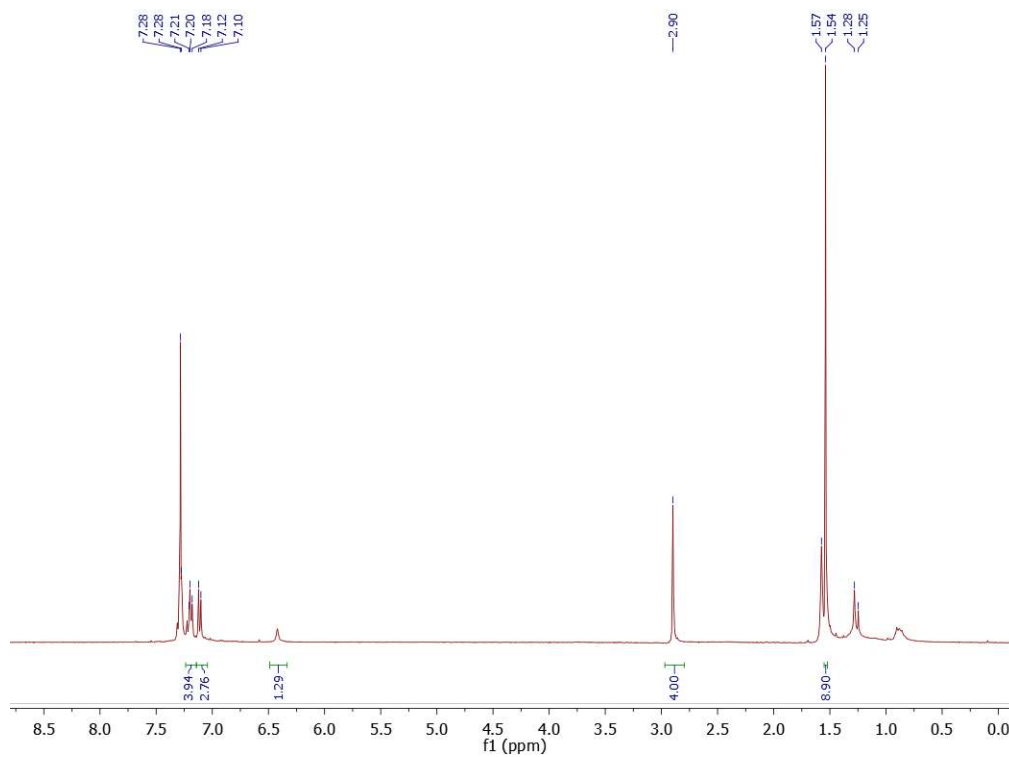


Figure A2.19  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of tert-butyl (4-phenethylphenyl)carbamate in  $\text{CDCl}_3$

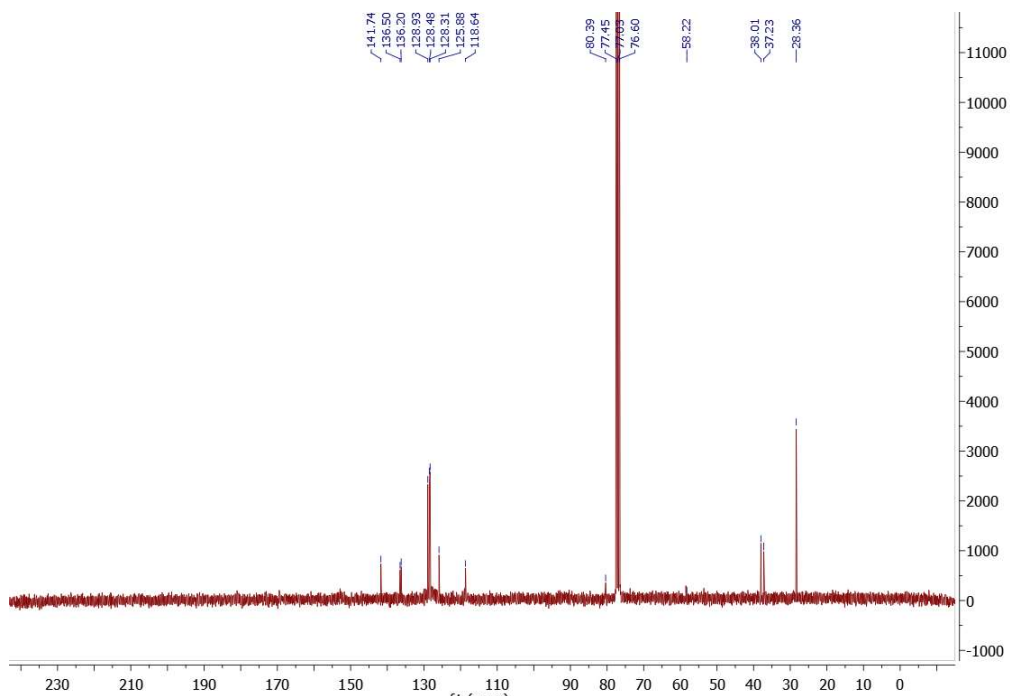


Figure A2.20  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of tert-butyl (4-phenethylphenyl)carbamate in  $\text{CDCl}_3$

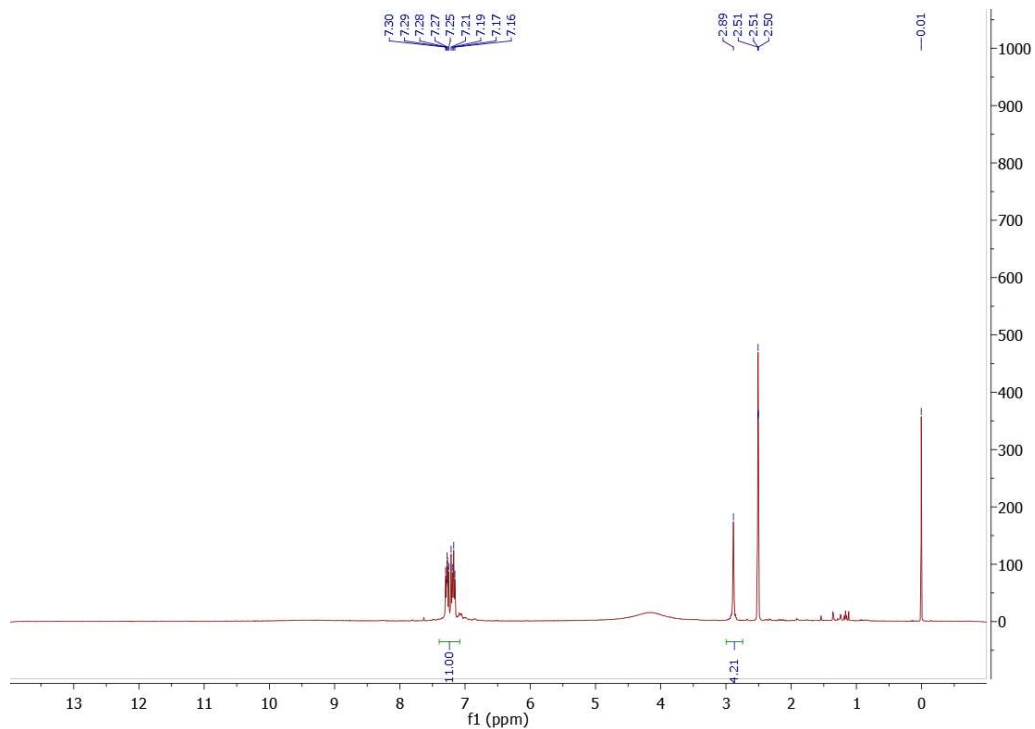


Figure A2.21  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of 4-(phenylethylphenyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO- $d_6$

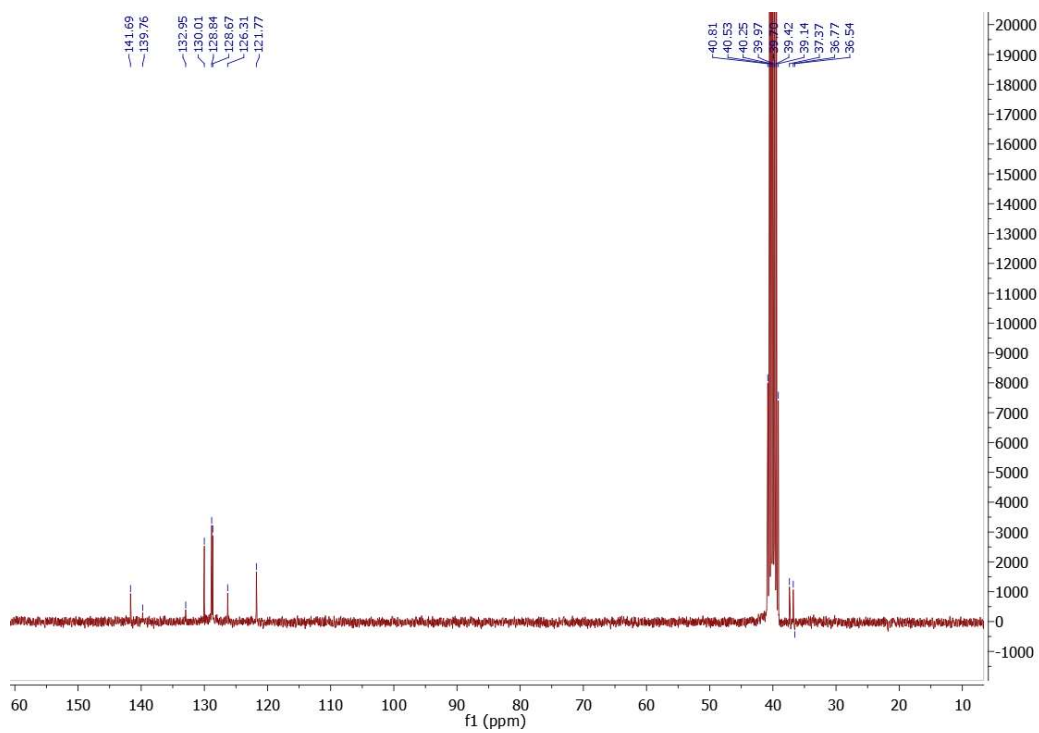


Figure A2.22  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of 4-(phenylethylphenyl)aniline trifluoroacetic salt in DMSO- $d_6$

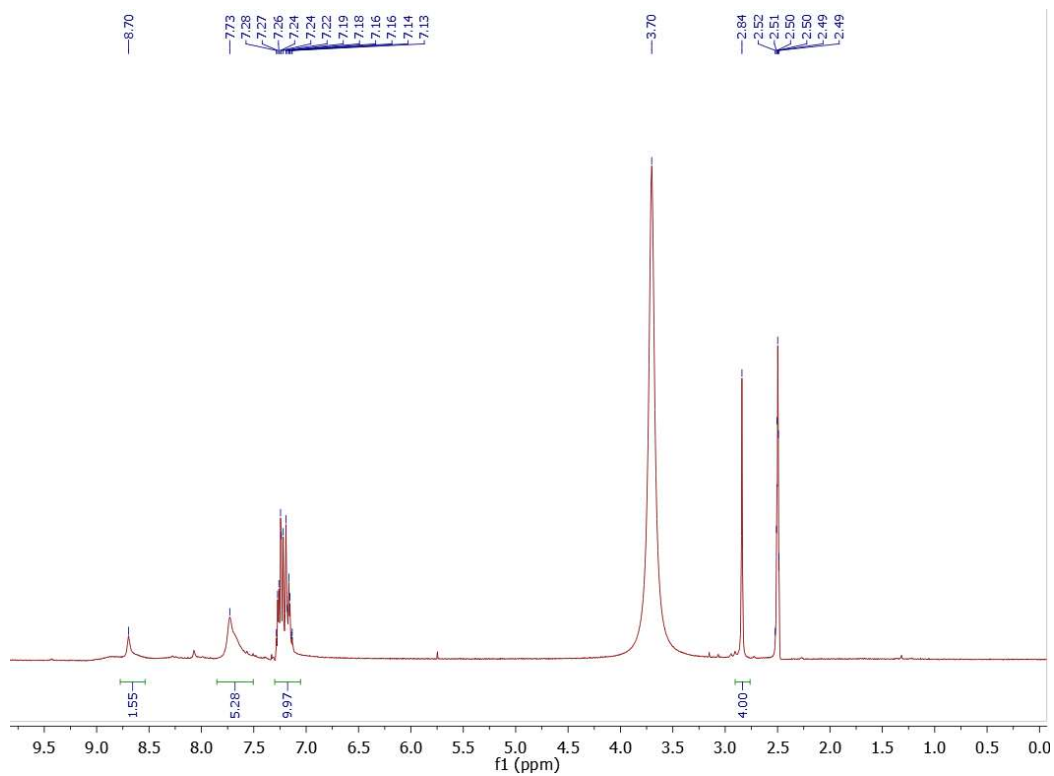


Figure A2.23  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spectrum of (4-(phenylethylphenyl)biguanide trifluoroacetic acid salt (**3.4**) in DMSO- $d_6$

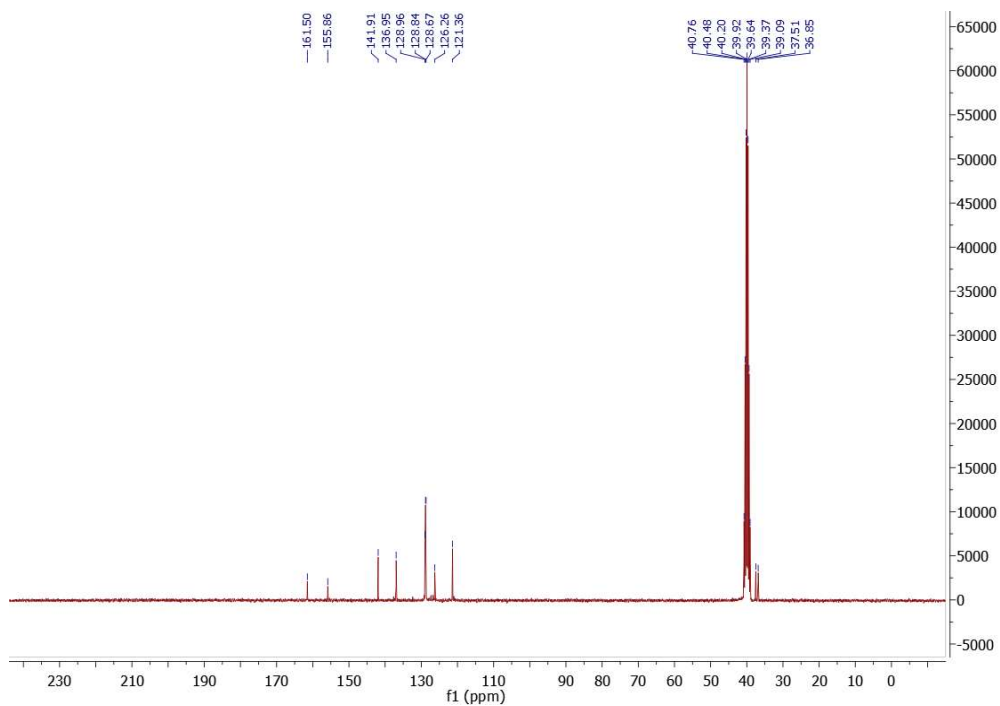


Figure A2.24  $^{13}\text{C}$  NMR (70 MHz) spectrum of (4-(phenylethylphenyl)biguanide trifluoroacetic acid salt (**3.4**) in DMSO- $d_6$



## A2.3 Single crystal X-ray diffraction

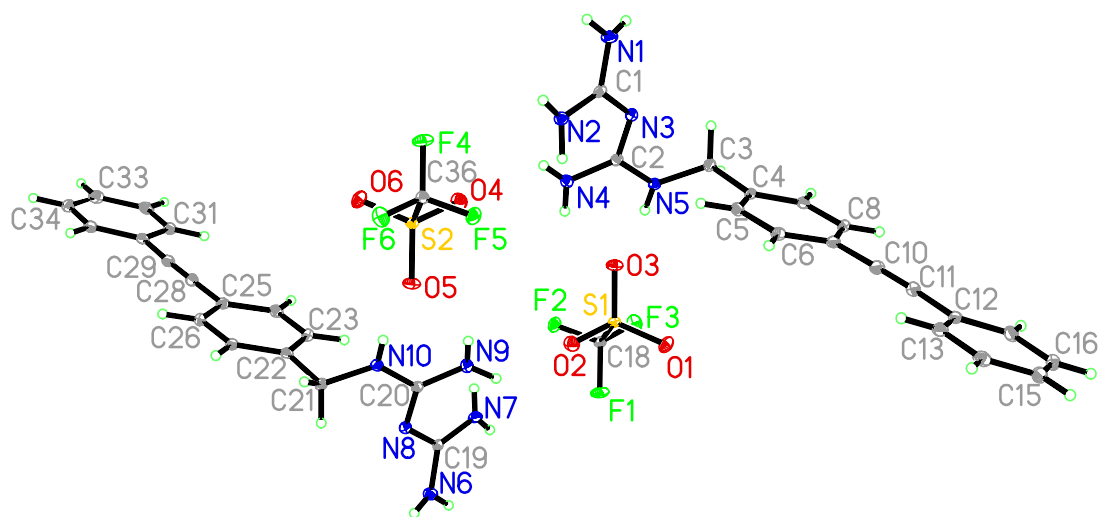


Table A2.1 Crystal data and structure refinement for compound **3.1b**

Identification code	3.1b
Empirical formula	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S
Formula weight	441.43
Temperature/K	100
Crystal system	orthorhombic
Space group	Pca2 <sub>1</sub>
a/Å	15.3543(10)
b/Å	5.8490(4)
c/Å	43.017(3)
$\alpha$ /°	90

$\beta/^\circ$	90
$\gamma/^\circ$	90
Volume/ $\text{\AA}^3$	3863.2(4)
Z	8
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.518
$\mu/\text{mm}^{-1}$	1.321
F(000)	1824.0
Crystal size/ $\text{mm}^3$	$0.34 \times 0.14 \times 0.11$
Radiation	GaK $\alpha$ ( $\lambda = 1.34139$ )
$2\Theta$ range for data collection/ $^\circ$	7.152 to 126.968
Index ranges	$-17 \leq h \leq 20, -7 \leq k \leq 7, -57 \leq l \leq 57$
Reflections collected	81637
Independent reflections	9587 [ $R_{\text{int}} = 0.0481, R_{\text{sigma}} = 0.0246$ ]
Data/restraints/parameters	9587/1/599
Goodness-of-fit on $F^2$	1.059
Final R indexes [ $I \geq 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0361, wR_2 = 0.0943$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.0372, wR_2 = 0.0952$
Largest diff. peak/hole / $e \text{\AA}^{-3}$	0.34/-0.61
Flack parameter	0.22(2)

Table A2.2 Fractional Atomic Coordinates ( $\times 10^4$ ) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for compound **3.1b**. Ueq is defined as 1/3 of of the trace of the orthogonalised UIJ tensor.

Atom	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U(eq)
S1	4827.7(4)	3450.5(10)	4584.9(2)	14.40(13)
F1	5669.4(11)	30(3)	4836.1(5)	28.3(4)
F2	4285.2(11)	-12(3)	4915.9(4)	24.6(4)
F3	4793.7(13)	-931(3)	4465.6(4)	26.7(4)
O1	5538.7(14)	3679(4)	4364.1(5)	24.8(4)
O2	4920.9(14)	4715(4)	4869.3(6)	25.4(5)
O3	3969.4(14)	3569(3)	4443.9(5)	21.5(4)
C18	4904.1(17)	464(5)	4706.7(6)	16.3(5)
S2	2468.6(4)	11553.4(10)	5398.3(2)	14.62(13)
F4	1629.0(11)	14971(3)	5146.9(5)	29.1(4)
F5	3011.6(11)	15008(3)	5066.3(4)	25.6(4)
F6	2504.1(12)	15936(3)	5517.7(4)	26.9(4)
O4	2375.5(14)	10287(4)	5114.7(5)	25.7(5)
O5	3329.1(13)	11434(3)	5540.4(5)	21.6(4)
O6	1762.5(14)	11322(4)	5617.7(5)	24.3(4)
C36	2393.3(17)	14538(5)	5278.3(6)	16.7(5)
N1	1171.2(17)	12626(5)	3977.1(6)	22.8(5)
N2	2043.4(16)	12865(4)	4407.7(5)	18.6(4)
N3	2239.3(14)	9955(4)	4026.8(5)	16.3(4)
N4	2664.3(17)	8290(4)	4510.6(5)	17.8(5)
N5	3216.6(15)	7013(4)	4051.8(5)	16.0(4)
C1	1824.2(17)	11771(5)	4144.3(6)	15.5(5)
C2	2699.6(18)	8511(4)	4200.4(6)	14.6(5)
C3	3301.7(17)	6869(5)	3715.1(6)	15.6(5)
C4	4075.3(16)	8180(4)	3587.5(6)	14.0(5)
C5	4328.5(17)	10272(5)	3714.3(6)	16.7(5)
C6	5006.0(19)	11517(5)	3583.0(7)	18.0(5)
C7	5437.2(17)	10689(5)	3316.7(6)	16.9(5)

C8	5186.7(17)	8563(5)	3192.9(6)	17.8(5)
C9	4516.8(17)	7330(5)	3327.6(6)	15.8(5)
C10	6129.6(18)	11993(5)	3179.3(7)	19.2(5)
C11	6698.0(19)	13128(5)	3072.8(7)	19.8(5)
C12	7387.1(17)	14580(5)	2961.1(6)	17.1(5)
C13	7513.9(18)	16731(5)	3099.3(7)	19.4(5)
C14	8178(2)	18147(5)	2995.8(7)	22.6(6)
C15	8717.3(19)	17456(6)	2752.5(7)	24.2(6)
C16	8599(2)	15318(6)	2615.8(7)	23.9(6)
C17	7938.3(19)	13894(5)	2717.7(6)	21.0(5)
N6	6127.4(17)	2377(5)	6005.8(6)	22.5(5)
N7	5259.0(16)	2150(4)	5576.5(6)	18.0(4)
N8	5060.3(14)	5060(4)	5957.6(6)	17.2(4)
N9	4634.4(17)	6723(4)	5473.2(5)	19.0(5)
N10	4087.6(15)	8006(4)	5933.1(5)	15.9(4)
C19	5470.0(17)	3242(5)	5838.9(6)	14.9(5)
C20	4603.1(17)	6512(4)	5785.2(6)	14.3(5)
C21	4000.9(17)	8144(4)	6267.3(6)	15.6(5)
C22	3226.8(17)	6830(4)	6393.7(6)	14.4(5)
C23	2971.7(17)	4735(5)	6265.8(6)	17.0(5)
C24	2301.0(19)	3480(5)	6396.6(6)	18.0(5)
C25	1859.2(17)	4292(5)	6660.0(6)	16.9(5)
C26	2099.5(18)	6414(5)	6786.2(6)	16.7(5)
C27	2774.9(17)	7666(5)	6652.7(6)	15.5(5)
C28	1174.0(18)	2953(5)	6795.6(6)	18.5(5)
C29	608.4(19)	1764(5)	6902.1(6)	18.1(5)
C30	-56.4(17)	281(5)	7017.5(7)	17.1(5)
C31	-203.5(18)	-1842(5)	6874.0(7)	18.4(5)
C32	-846(2)	-3285(5)	6984.6(7)	22.1(6)
C33	-1354.7(19)	-2639(6)	7237.8(7)	25.8(6)
C34	-1219.7(19)	-556(6)	7380.5(7)	23.9(6)
C35	-579.4(19)	912(5)	7273.4(7)	20.3(5)

Table A2.3 Anisotropic Displacement Parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for compound **3.1b**. The Anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2[h2a*2U_{11}+2hka*b*U_{12}+\dots]$ .

Atom	$U_{11}$	$U_{22}$	$U_{33}$	$U_{23}$	$U_{13}$	$U_{12}$
S1	11.0(3)	15.5(3)	16.7(3)	0.5(2)	-0.9(2)	0.2(2)
F1	16.9(8)	28.8(9)	39.1(10)	7.7(8)	-7.3(7)	7.9(8)
F2	22.2(8)	28.5(9)	23.1(8)	10.1(7)	7.2(6)	2.3(8)
F3	36.8(10)	17.5(8)	25.9(9)	-3.2(7)	1.1(7)	-0.5(7)
O1	20.2(10)	23.5(10)	30.6(11)	4.6(8)	8.2(8)	-2.9(8)
O2	27.7(11)	24.1(10)	24.5(12)	-6.5(9)	-3.5(8)	1.5(9)
O3	16.6(9)	20.7(10)	27.1(10)	6.8(8)	-6.8(8)	-0.1(8)
C18	12.3(11)	18.8(12)	17.9(12)	2.5(10)	0.4(9)	0.8(9)
S2	11.3(3)	16.1(3)	16.5(3)	0.6(2)	-1.0(2)	-0.1(2)
F4	16.8(7)	30.2(9)	40.2(11)	6.9(8)	-6.8(7)	6.2(8)
F5	22.2(8)	29.6(9)	24.9(8)	10.3(7)	7.7(7)	0.8(8)
F6	37.5(11)	18.5(8)	24.6(9)	-2.7(7)	0.2(7)	-0.2(7)
O4	29.1(11)	23.9(11)	24.1(11)	-7.4(9)	-3.6(8)	1.8(9)
O5	16.1(9)	23.1(10)	25.5(10)	6.5(8)	-7.7(8)	-0.5(7)
O6	20.6(10)	24.1(10)	28.1(10)	3.6(8)	8.6(8)	-2.8(8)
C36	14.5(11)	20.4(13)	15.3(12)	2.4(10)	0.3(9)	0.7(9)
N1	18.2(11)	25.8(12)	24.4(12)	-7.6(10)	-5.4(9)	8.5(10)
N2	16.0(11)	19.3(11)	20.4(11)	-4.6(9)	-1.4(8)	2.5(9)
N3	15.7(10)	18.2(11)	15.1(10)	-0.7(8)	0.3(8)	1.8(10)
N4	18.8(11)	19.6(11)	15.0(11)	2.3(9)	-0.4(9)	2.6(10)
N5	14.3(10)	17.7(10)	16.2(10)	2.8(8)	0.4(8)	3.1(8)
C1	11.1(11)	16.2(11)	19.2(12)	1.6(9)	2.0(9)	-1.5(9)
C2	11.2(11)	15.5(12)	17.1(11)	0.5(9)	0.2(9)	-3.4(9)
C3	14.4(11)	16.6(11)	15.7(11)	-1.9(9)	1.4(9)	-0.9(9)
C4	11.9(11)	15.6(11)	14.4(11)	1.4(9)	-1.3(8)	0.8(9)
C5	17.8(12)	17.7(12)	14.8(11)	-0.1(9)	-0.6(9)	-2.2(10)
C6	17.8(12)	16.2(12)	20.1(12)	0.6(9)	-2.7(10)	-1.2(10)
C7	13.2(11)	19.3(12)	18.1(12)	3.1(10)	-1.6(9)	-0.9(9)

C8	13.6(12)	22.1(13)	17.5(11)	-1(1)	0.7(9)	3(1)
C9	15.1(11)	16.9(12)	15.4(11)	-1.6(9)	-2.1(9)	2.3(9)
C10	16.7(13)	20.1(12)	20.8(12)	1(1)	-1.6(10)	-0.3(10)
C11	18.7(13)	22.7(13)	18.1(11)	2.3(10)	0.1(10)	-0.4(10)
C12	14.4(11)	20.6(12)	16.4(12)	4.2(10)	-3.3(9)	-3.4(10)
C13	16.5(13)	21.0(14)	20.7(12)	2.1(11)	-2.3(10)	1(1)
C14	23.8(14)	20.0(12)	24.0(13)	2.2(10)	-6.3(10)	-4.3(11)
C15	21.3(13)	30.1(15)	21.3(13)	5.4(11)	-1.8(11)	-9.7(12)
C16	21.3(13)	33.5(15)	16.9(12)	3.3(11)	0.6(10)	-4.1(12)
C17	23.4(13)	23.0(13)	16.7(11)	2.1(10)	-1.3(10)	-3.5(11)
N6	19.5(11)	25.2(12)	22.9(12)	-6.8(10)	-4.4(9)	8.4(10)
N7	13.4(11)	19.0(11)	21.7(11)	-2.7(9)	-2.6(9)	1.7(9)
N8	15.1(10)	21.0(12)	15.5(11)	0.3(8)	0.1(7)	2.8(10)
N9	18.8(11)	22.2(12)	16.1(11)	2.1(9)	0.7(8)	1.2(10)
N10	14.7(10)	17.9(10)	15(1)	3.7(8)	-1.5(8)	1.7(9)
C19	12.0(11)	18.6(12)	13.9(11)	1.2(9)	3.0(9)	-2.1(9)
C20	11.0(11)	16.6(12)	15.2(11)	0.1(9)	1.3(9)	-3.8(9)
C21	13.0(11)	16.9(11)	17.0(11)	-1.1(9)	1.4(9)	-1.6(9)
C22	12.5(11)	15.5(11)	15.1(11)	1.8(9)	-2.1(9)	1.1(9)
C23	16.0(12)	19.0(12)	16.0(11)	-1.2(9)	0.5(9)	1.1(10)
C24	18.6(12)	17.1(13)	18.3(12)	-1.2(9)	-1.7(10)	-2.3(9)
C25	13.9(11)	20.6(12)	16.4(11)	4.5(9)	-1.6(9)	-2.7(9)
C26	14.9(12)	20.6(13)	14.6(11)	0.0(9)	2.0(9)	0.1(10)
C27	13.9(11)	16.6(11)	16.0(11)	-0.7(9)	-2.0(9)	-0.7(9)
C28	17.1(12)	21.2(13)	17.1(12)	1.9(10)	-0.4(10)	-2.6(10)
C29	16.1(12)	20.4(13)	17.8(11)	0.3(9)	-2.8(10)	-1.6(10)
C30	14.2(11)	18.9(12)	18.2(12)	2.1(10)	-3.0(9)	0(1)
C31	17.7(12)	19.8(13)	17.7(12)	-0.4(10)	-1.5(9)	-1.1(10)
C32	22.7(14)	21.1(13)	22.5(13)	1.7(10)	-6.1(11)	-5.2(11)
C33	18.4(13)	33.8(15)	25.3(14)	10.4(12)	-1.4(11)	-8.6(12)
C34	17.9(12)	34.2(15)	19.5(12)	4.5(12)	1.8(10)	2.3(11)
C35	18.8(12)	22.3(13)	19.8(12)	-0.7(10)	-4.3(10)	0.7(11)

Table A2.4 Bond Lengths for compound **3.1b**.

Atom	Atom	Length/Å		Atom	Atom	Length/Å
S1	O1	1.453(2)		C11	C12	1.439(4)
S1	O2	1.436(2)		C12	C13	1.405(4)
S1	O3	1.452(2)		C12	C17	1.405(4)
S1	C18	1.828(3)		C13	C14	1.387(4)
F1	C18	1.325(3)		C14	C15	1.394(4)
F2	C18	1.338(3)		C15	C16	1.394(5)
F3	C18	1.331(3)		C16	C17	1.384(4)
S2	O4	1.434(2)		N6	C19	1.338(4)
S2	O5	1.457(2)		N7	C19	1.337(4)
S2	O6	1.444(2)		N8	C19	1.337(4)
S2	C36	1.824(3)		N8	C20	1.328(3)
F4	C36	1.327(3)		N9	C20	1.349(3)
F5	C36	1.345(3)		N10	C20	1.340(3)
F6	C36	1.326(3)		N10	C21	1.446(3)
N1	C1	1.331(4)		C21	C22	1.517(4)
N2	C1	1.344(4)		C22	C23	1.399(4)
N3	C1	1.338(3)		C22	C27	1.401(4)
N3	C2	1.331(4)		C23	C24	1.384(4)
N4	C2	1.342(4)		C24	C25	1.404(4)
N5	C2	1.344(3)		C25	C26	1.404(4)
N5	C3	1.457(3)		C25	C28	1.435(4)
C3	C4	1.517(4)		C26	C27	1.393(4)
C4	C5	1.395(4)		C28	C29	1.203(4)
C4	C9	1.399(4)		C29	C30	1.429(4)
C5	C6	1.390(4)		C30	C31	1.405(4)
C6	C7	1.409(4)		C30	C35	1.412(4)
C7	C8	1.406(4)		C31	C32	1.382(4)
C7	C10	1.436(4)		C32	C33	1.393(5)
C8	C9	1.384(4)		C33	C34	1.380(5)
C10	C11	1.188(4)		C34	C35	1.384(4)

Table A2.5 Bond Angles for compound **3.1b**.

Atom	Atom	Atom	Angle/°	Atom	Atom	Atom	Angle/°
O1	S1	C18	103.12(12)	C9	C8	C7	120.4(2)
O2	S1	O1	115.75(14)	C8	C9	C4	120.6(2)
O2	S1	O3	114.93(13)	C11	C10	C7	177.8(3)
O2	S1	C18	103.98(14)	C10	C11	C12	176.5(3)
O3	S1	O1	113.83(13)	C13	C12	C11	119.3(3)
O3	S1	C18	102.92(12)	C17	C12	C11	121.6(3)
F1	C18	S1	111.14(19)	C17	C12	C13	119.2(3)
F1	C18	F2	107.9(2)	C14	C13	C12	120.0(3)
F1	C18	F3	108.8(2)	C13	C14	C15	120.3(3)
F2	C18	S1	110.24(19)	C16	C15	C14	120.0(3)
F3	C18	S1	110.76(19)	C17	C16	C15	120.1(3)
F3	C18	F2	107.8(2)	C16	C17	C12	120.4(3)
O4	S2	O5	114.98(13)	C20	N8	C19	123.0(3)
O4	S2	O6	115.65(13)	C20	N10	C21	124.2(2)
O4	S2	C36	104.31(14)	N7	C19	N6	117.1(3)
O5	S2	C36	102.83(12)	N8	C19	N6	116.8(3)
O6	S2	O5	113.70(13)	N8	C19	N7	126.0(3)
O6	S2	C36	103.12(12)	N8	C20	N9	126.5(3)
F4	C36	S2	111.1(2)	N8	C20	N10	117.7(2)
F4	C36	F5	107.2(2)	N10	C20	N9	115.7(2)
F5	C36	S2	110.04(19)	N10	C21	C22	113.6(2)
F6	C36	S2	111.24(19)	C23	C22	C21	121.5(2)
F6	C36	F4	109.1(2)	C23	C22	C27	118.7(2)
F6	C36	F5	108.1(2)	C27	C22	C21	119.7(2)
C2	N3	C1	123.0(2)	C24	C23	C22	120.8(2)
C2	N5	C3	124.3(2)	C23	C24	C25	120.6(3)
N1	C1	N2	117.7(3)	C24	C25	C26	119.0(2)
N1	C1	N3	116.9(3)	C24	C25	C28	119.9(3)
N3	C1	N2	125.3(3)	C26	C25	C28	121.2(3)
N3	C2	N4	126.7(3)	C27	C26	C25	120.1(2)



N3	C2	N5	117.4(2)		C26	C27	C22	120.8(2)
N4	C2	N5	115.7(3)		C29	C28	C25	177.5(3)
N5	C3	C4	113.6(2)		C28	C29	C30	177.4(3)
C5	C4	C3	121.4(2)		C31	C30	C29	119.9(3)
C5	C4	C9	119.3(2)		C31	C30	C35	118.8(3)
C9	C4	C3	119.3(2)		C35	C30	C29	121.2(3)
C6	C5	C4	120.6(2)		C32	C31	C30	120.2(3)
C5	C6	C7	120.1(3)		C31	C32	C33	120.3(3)
C6	C7	C10	120.0(3)		C34	C33	C32	120.2(3)
C8	C7	C6	118.9(2)		C33	C34	C35	120.4(3)
C8	C7	C10	121.1(3)		C34	C35	C30	120.1(3)

Table A2.6 Hydrogen Bonds for compound **3.1b**.

D	H	A	d(D-H)/Å	d(H-A)/Å	d(D-A)/Å	D-H-A/°
N4	H4A	O4	0.78(4)	2.35(4)	2.883(3)	127(3)
N4	H4A	N2	0.78(4)	2.40(4)	2.875(4)	121(3)
N9	H9A	O2	0.93(4)	2.17(4)	2.885(3)	133(3)
N9	H9A	N7	0.93(4)	2.34(4)	2.876(4)	116(3)
N4	H4B	F5 <sup>1</sup>	0.81(4)	2.52(4)	3.112(3)	131(3)
N9	H9B	F2 <sup>2</sup>	0.80(5)	2.48(5)	3.111(3)	136(4)
N2	H2A	O3 <sup>2</sup>	0.95(4)	2.17(4)	2.990(3)	143(3)
N7	H7A	O5 <sup>1</sup>	0.74(4)	2.36(4)	2.997(3)	146(4)
N1	H1A	O1 <sup>3</sup>	0.87(4)	2.07(4)	2.896(3)	159(3)
N6	H6A	O6 <sup>4</sup>	0.82(4)	2.14(4)	2.902(3)	156(3)
N2	H2B	O1 <sup>3</sup>	0.85(4)	2.34(4)	3.075(3)	145(4)
N7	H7B	O6 <sup>4</sup>	0.82(4)	2.37(4)	3.080(3)	146(3)
N5	H5	O3	0.81(4)	2.07(4)	2.870(3)	170(4)
N10	H10	O5	0.76(5)	2.13(5)	2.868(3)	165(5)

<sup>1</sup>+X,-1+Y,+Z; <sup>2</sup>+X,1+Y,+Z; <sup>3</sup>-1/2+X,2-Y,+Z; <sup>4</sup>1/2+X,1-Y,+Z

Table A2.7 Torsion Angles for compound **3.1b**.

A	B	C	D	Angle/°	A	B	C	D	Angle/°
O1	S1	C18	F1	59.9(2)	C10	C7	C8	C9	-179.8(2)
O1	S1	C18	F2	179.48(19)	C11	C12	C13	C14	179.6(3)
O1	S1	C18	F3	-61.3(2)	C11	C12	C17	C16	-179.6(3)
O2	S1	C18	F1	-61.3(2)	C12	C13	C14	C15	0.6(4)
O2	S1	C18	F2	58.3(2)	C13	C12	C17	C16	0.2(4)
O2	S1	C18	F3	177.57(18)	C13	C14	C15	C16	-1.1(4)
O3	S1	C18	F1	178.5(2)	C14	C15	C16	C17	1.1(5)
O3	S1	C18	F2	-61.9(2)	C15	C16	C17	C12	-0.6(4)
O3	S1	C18	F3	57.4(2)	C17	C12	C13	C14	-0.2(4)
O4	S2	C36	F4	60.8(2)	N10	C21	C22	C23	37.1(3)
O4	S2	C36	F5	-57.8(2)	N10	C21	C22	C27	-145.7(2)
O4	S2	C36	F6	-177.50(18)	C19	N8	C20	N9	-16.0(4)
O5	S2	C36	F4	-178.83(19)	C19	N8	C20	N10	167.5(2)
O5	S2	C36	F5	62.6(2)	C20	N8	C19	N6	158.1(3)
O5	S2	C36	F6	-57.2(2)	C20	N8	C19	N7	-25.1(4)
O6	S2	C36	F4	-60.4(2)	C20	N10	C21	C22	-95.9(3)
O6	S2	C36	F5	-178.96(19)	C21	N10	C20	N8	0.3(4)
O6	S2	C36	F6	61.3(2)	C21	N10	C20	N9	-176.5(2)
N5	C3	C4	C5	-37.2(3)	C21	C22	C23	C24	175.6(2)
N5	C3	C4	C9	146.0(2)	C21	C22	C27	C26	-175.6(2)
C1	N3	C2	N4	16.6(4)	C22	C23	C24	C25	0.3(4)
C1	N3	C2	N5	-167.9(2)	C23	C22	C27	C26	1.7(4)
C2	N3	C1	N1	-158.3(3)	C23	C24	C25	C26	1.0(4)
C2	N3	C1	N2	25.4(4)	C23	C24	C25	C28	-179.0(3)
C2	N5	C3	C4	96.0(3)	C24	C25	C26	C27	-0.9(4)
C3	N5	C2	N3	-0.2(4)	C25	C26	C27	C22	-0.5(4)
C3	N5	C2	N4	175.9(2)	C27	C22	C23	C24	-1.6(4)
C3	C4	C5	C6	-176.1(3)	C28	C25	C26	C27	179.1(3)
C3	C4	C9	C8	175.6(2)	C29	C30	C31	C32	180.0(3)
C4	C5	C6	C7	0.9(4)	C29	C30	C35	C34	179.9(3)

C5	C4	C9	C8	-1.3(4)		C30	C31	C32	C33	0.4(4)
C5	C6	C7	C8	-1.8(4)		C31	C30	C35	C34	0.5(4)
C5	C6	C7	C10	179.2(3)		C31	C32	C33	C34	-0.1(4)
C6	C7	C8	C9	1.2(4)		C32	C33	C34	C35	0.1(4)
C7	C8	C9	C4	0.3(4)		C33	C34	C35	C30	-0.3(4)
C9	C4	C5	C6	0.6(4)		C35	C30	C31	C32	-0.5(4)

Table A2.8 Hydrogen Atom Coordinates ( $\text{\AA}\times 10^4$ ) and Isotropic Displacement Parameters ( $\text{\AA}^2\times 10^3$ ) for compound **3.1b**.

Atom	x	y	z	U(eq)
H3A	2763	7468	3618	19
H3B	3359	5241	3655	19
H5A	4035	10851	3892	20
H6	5179	12929	3673	22
H8	5479	7971	3016	21
H9	4355	5892	3243	19
H13	7144	17217	3264	23
H14	8266	19594	3091	27
H15	9165	18442	2680	29
H16	8973	14837	2452	29
H17	7857	12444	2622	25
H21A	3943	9770	6328	19
H21B	4539	7545	6364	19
H23	3263	4166	6087	20
H24	2138	2058	6307	22
H26	1801	6997	6963	20
H27	2931	9106	6738	19
H31	139	-2288	6700	22
H32	-941	-4722	6887	27
H33	-1796	-3636	7313	31
H34	-1568	-127	7553	29

H35	-492	2347	7372	24
H4A	2330(20)	9070(60)	4594(9)	11(8)
H9A	4970(30)	5730(70)	5353(10)	29(10)
H4B	3040(20)	7510(60)	4590(8)	11(7)
H9B	4330(30)	7700(80)	5402(11)	37(11)
H2A	2600(30)	12650(70)	4495(9)	23(9)
H7A	4820(30)	2370(70)	5512(9)	21(10)
H1A	870(20)	13750(60)	4058(8)	15(8)
H6A	6390(20)	1250(60)	5945(8)	14(8)
H2B	1760(30)	14040(70)	4463(9)	26(10)
H7B	5510(30)	950(70)	5535(9)	20(9)
H5	3490(20)	6130(60)	4160(8)	16(8)
H10	3800(30)	8800(80)	5836(11)	39(12)
H1B	970(30)	11830(80)	3849(12)	40(13)
H6B	6340(30)	3290(80)	6131(12)	39(12)

## Experimental

Single crystals of  $C_{18}H_{18}F_3N_5O_3S$  were picked. A suitable crystal was selected and placed on a Bruker Venture Metaljet diffractometer. The crystal was kept at 100 K during data collection. Using Olex2 [1], the structure was solved with the XT [2] structure solution program using Intrinsic Phasing and refined with the XL [3] refinement package using Least Squares minimisation.

1. Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J., Howard, J.A.K. & Puschmann, H. (2009), *J. Appl. Cryst.* 42, 339-341.
2. Sheldrick, G.M. (2015). *Acta Cryst.* A71, 3-8.
3. Sheldrick, G.M. (2008). *Acta Cryst.* A64, 112-122.

## Crystal structure determination of 3.1b

**Crystal Data** for  $C_{18}H_{18}F_3N_5O_3S$  ( $M=441.43$  g/mol): orthorhombic, space group  $Pca2_1$  (no. 29),  $a = 15.3543(10)$  Å,  $b = 5.8490(4)$  Å,  $c = 43.017(3)$  Å,  $V = 3863.2(4)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 8$ ,  $T = 100$  K,  $\mu(\text{GaK}\alpha) = 1.321$  mm<sup>-1</sup>,  $D_{\text{calc}} = 1.518$  g/cm<sup>3</sup>, 81637 reflections measured ( $7.152^\circ \leq 2\Theta \leq 126.968^\circ$ ), 9587 unique ( $R_{\text{int}} = 0.0481$ ,  $R_{\text{sigma}} = 0.0246$ ) which were used in all calculations. The final  $R_1$  was 0.0361 ( $I > 2\sigma(I)$ ) and  $wR_2$  was 0.0952 (all data).

## Refinement model description

Number of restraints - 1, number of constraints - unknown. Details:

### 1. Twinned data refinement

Scales: 0.78(2) 0.22(2)

### 2. Fixed Uiso

At 1.2 times of:

All C(H) groups, All C(H,H) groups

### 3.a Secondary CH2 refined with riding coordinates:

C3(H3A,H3B), C21(H21A,H21B)

### 3.b Aromatic/amide H refined with riding coordinates:

C5(H5A), C6(H6), C8(H8), C9(H9), C13(H13), C14(H14), C15(H15), C16(H16),  
C17(H17), C23(H23), C24(H24), C26(H26), C27(H27), C31(H31), C32(H32), C33(H33),  
C34(H34), C35(H35)

## A2.4 Hemolytic activity

Red blood cells in Alsever's solution were centrifuged for 10 min at 300 g, washed 3 times with PBS buffer, and resuspended in PBS at 2% v/v. To each well of a 96-well plate, 195  $\mu\text{L}$  of red blood cell solution and 5  $\mu\text{L}$  of biguanidium salt in DMSO were added, and the plate was incubated with light agitation for 1 h at 37 °C. The plate was then centrifuged for 10 min at 300 g, and 50  $\mu\text{L}$  of the supernatant solution of each well was transferred to another plate. Absorbance was measured at  $\lambda = 405$  nm. Each measurement was performed in triplicate in three different experiments.

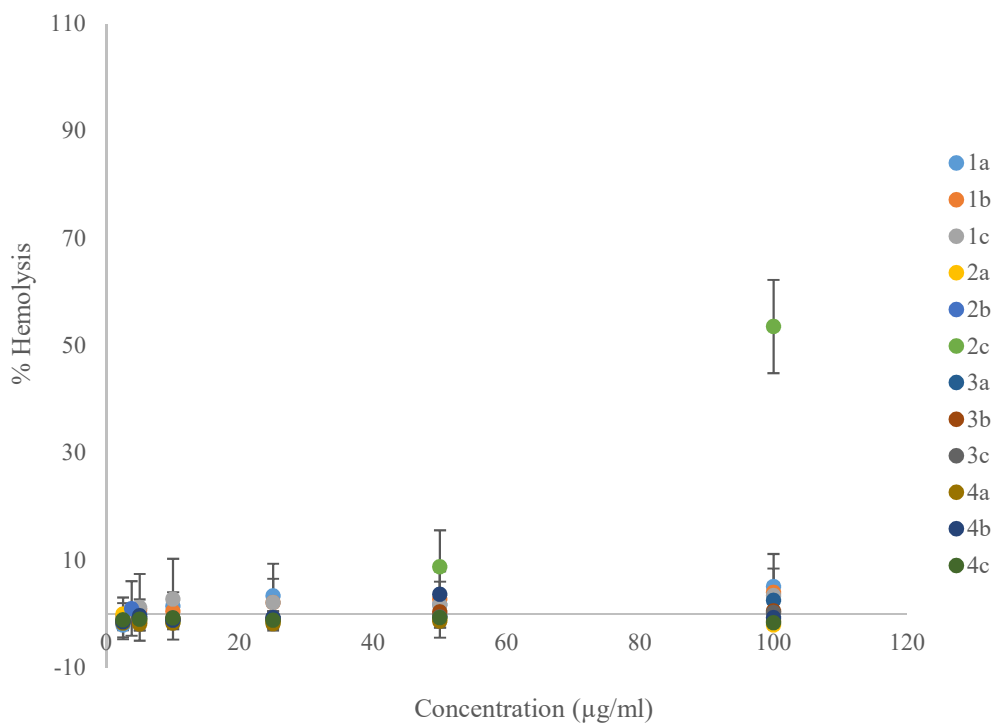


Figure A2.25 Hemolytic activity

Table A2.9 Minimal concentration for under 10% hemolysis

	HC 10% (µg/ml)	HC 10% (µM)
<b>3.1a</b>	> 100	> 175
<b>3.1b</b>	> 100	> 227
<b>3.1c</b>	> 100	> 305
<b>3.2a</b>	> 100	> 173
<b>3.2b</b>	> 100	> 225
<b>3.2c</b>	50	151
<b>3.3a</b>	> 100	> 179
<b>3.3b</b>	> 100	> 234
<b>3.3c</b>	> 100	> 319
<b>3.4a</b>	> 100	> 178
<b>3.4b</b>	> 100	> 232
<b>3.4c</b>	> 100	> 315

## A2.5 Measurement of the LogP

A 10 µM or 20 µM solution of **1b** was prepared in 5 ml of octanol and mixed with 5 ml distilled water at 25 °C. The solution was stirred and was left to settle for 24 hours before the absorbance of the octanol fraction was measured. The values obtained were fitted on a calibration curve prepared by measuring the absorbance of **1b** in octanol at various concentrations (2.5, 10, 15, 20 and 30 µM). The logP was calculated using the following formula:

$$\log P = \log\left(\frac{[1b]_{\text{oct}}}{[1b]_{\text{water}}}\right)$$

Where  $[1b]_{\text{oct}}$  is the concentration of **1b** in octanol and  $[1b]_{\text{water}}$  is the concentration of **1b** in water.

Table A2.10 Calibration curve and Log P values of compound **3.1b**

Concentration of <b>3.1b</b> ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance (u.a)
2.5	0.0908
10	0.3416
15	0.5334
20	0.6685
30	0.9611

<b>Slope</b>	0.0317
<b>Intercept</b>	0.0282

	Absorbance (u.a)	[ <b>3.1b</b> ] in octanol ( $\mu\text{M}$ )	[ <b>3.1b</b> ] in water ( $\mu\text{M}$ )	logP	
Partition 1 (10 $\mu\text{M}$ )	0.2473	6.91	3.09	0.35	0.42 $\pm$ 0.10
Partition 2 (20 $\mu\text{M}$ )	0.5086	15.15	4.85	0.50	

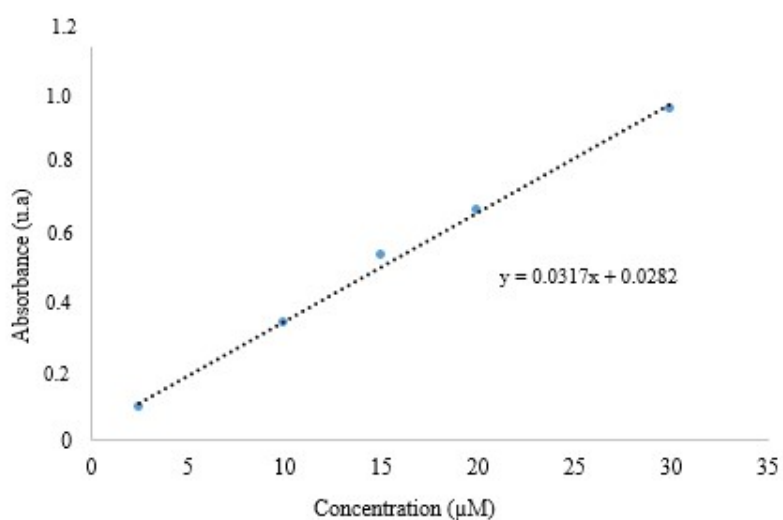


Figure A2.26 Calibration curve of **3.1b** in octanol



## A2.6 U-Tube experiments

U-tube experiment was prepared by adding 800  $\mu\text{L}$  of dichloromethane in a U-shaped tube as a representation of the hydrophobic lipid membrane. On the receiving end (*trans* side) of the tube was added 300  $\mu\text{L}$  of distilled water while the other side (*cis* side) was filled with 300  $\mu\text{L}$  of a 250  $\mu\text{M}$  solution of the compound of interest at 25  $^{\circ}\text{C}$ . At 48 h and 72 h, 100  $\mu\text{L}$  aliquot of the *trans* side was diluted in 900  $\mu\text{L}$  methanol and monitored by LCMS (292  $m/z$ ). Area under curve (AUC) was measured and fitted on a calibration curve.

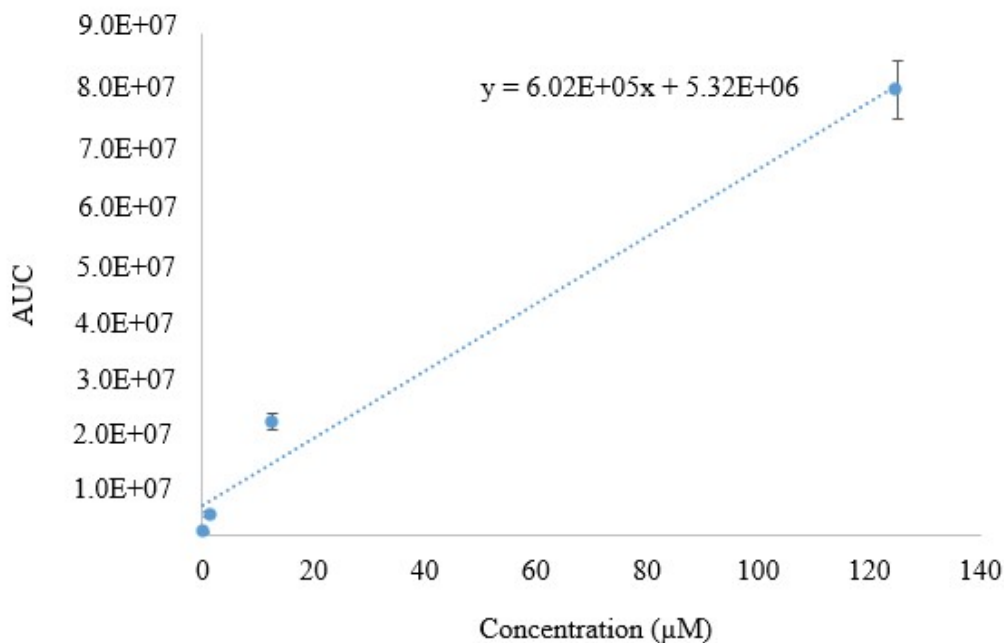


Figure A2.27 Calibration curve of **3.1b** by HPLC

Table A2.11 Calibration curve and U-tube experiment of compound **3.1b**

Concentration of 3.1b ( $\mu\text{M}$ )	Average AUC		
<b>0.125</b>	6.11E+05	±	7.7E+04
<b>1.25</b>	3.95E+06	±	4.7E+05
<b>12.5</b>	2.05E+07	±	1.4E+06
<b>125</b>	7.98E+07	±	5.2E+06

Slope	6.02E+05
Intercept	5.32E+06

		AUC	Diluted concentration ( $\mu\text{M}$ )	Trans-side concentration ( $\mu\text{M}$ )			
<b>48h</b>	<b>1</b>	1.07E+07	9.01	90.1	65	±	23
	<b>2</b>	8.76E+06	5.71	57.1			
	<b>3</b>	8.14E+06	4.68	46.8			
<b>72h</b>	<b>1</b>	1.01E+07	7.86	78.6	92	±	12
	<b>2</b>	1.13E+07	9.93	99.3			
	<b>3</b>	1.13E+07	9.91	99.1			

## A2.7 Lucigenin assay

A 2 mL volume of a 25 mg/mL solution of EYPC in chloroform was slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of the flask. Then, 1 mL of a lucigenin solution (2 mM lucigenin,

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaCl) was added, and the resulting suspension was subjected to 10 freeze/thaw cycles (1 cycle = 1 min at -20 °C and 1 min at 37 °C). The mixture was extruded onto a 100-nm polycarbonate membrane 21 times and passed through a Sephadex G-25 column to remove the extravesicular lucigenin. The eluent used for the column was a phosphate buffer with sodium chloride (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaCl), and the resulting liposome solution was diluted to obtain a final concentration of 10 mM (the progression of the vesicles on the column was followed by their residual absorbance and the product was assumed to have been completely recuperated after separation. For further precision, small volumes of eluting buffer were included in the recuperation before and after the eluted vesicles). To a quartz cuvette, 2.5 mL phosphate buffer with sodium nitrate (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 100 mM NaNO<sub>3</sub>) and 40 μL of liposome solution were added with light stirring ( $\lambda_{\text{ex.}} = 372 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 503 \text{ nm}$ ). At  $t = 50 \text{ s}$ , a solution of the biguanidium in methanol was added to the cuvette to obtain a 5 mM final solution (50 mol% relative to the concentration of EYPC). At  $t = 300 \text{ s}$ , Triton-X 10% v/v was added to lyse the liposomes. The fluorescence was monitored for 350 s.

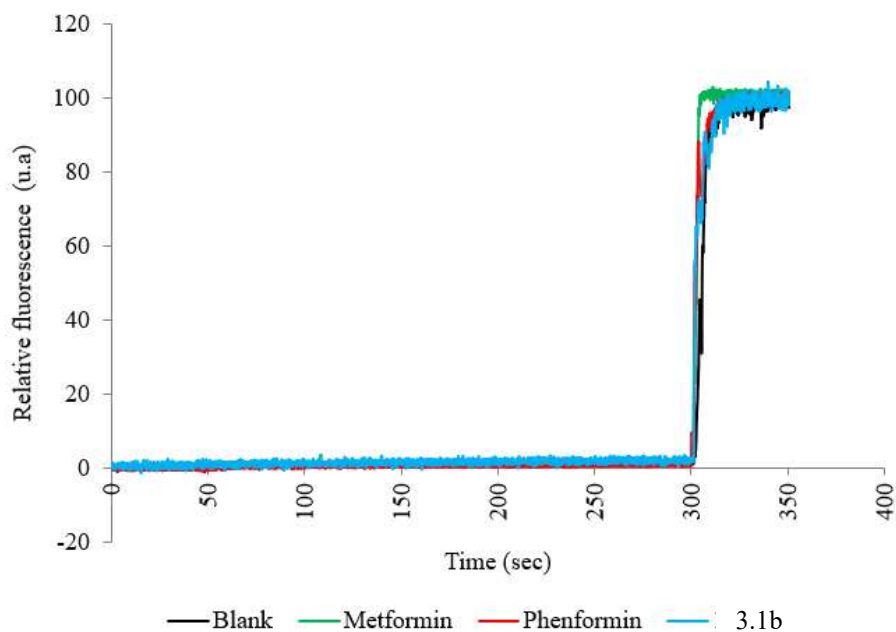


Figure A2.28 Chloride transport assay with lucigenin

## A2.8 HPTS assay

2 mL of a 25 mg/mL solution of EYPC in chloroform was slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of the flask. Then, 1 mL of a solution of the trisodium salt of 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) (1 mM HPTS, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) salt, and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4) was added, and the resulting suspension was subjected to 10 freeze/thaw cycles (1 cycle = 1 min at -20 °C and 1 min at 37 °C). The mixture was extruded onto a 100-nm polycarbonate membrane 21 times and passed through a Sephadex G-25 column to remove the extravesicular HPTS. HEPES buffer (10 mM HEPES and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4) was used as the eluent for the column and the resulting liposome solution was diluted to obtain a final concentration of 10 mM (the progression of the vesicles on the column was followed by their residual absorbance and the product was assumed to have been completely recuperated after separation. For further precision, small volumes of eluting buffer were included in the recuperation before and after the eluted vesicles). To a quartz cuvette, 1.9 mL of HEPES buffer and 25  $\mu$ L of liposome solution were added with light stirring ( $\lambda_{\text{ex.}} = 405/450$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 510$  nm). At  $t = 50$  s, a solution biguanidium salt in methanol was added to obtain a 5 mM final concentration. At  $t = 300$  s, NaOH was added to obtain a 5 mM final concentration, and, at  $t = 350$  s, Triton-X 10% v/v was added to lyse the liposomes. The fluorescence was monitored for 600 s. As a control, we monitored the variation of HPTS fluorescence after the addition of a 100  $\mu$ g/mL solution of biguanidium salts. No variation was observed.

## A2.9 Safranin-O assay

2 mL of a 25 mg/mL solution of EYPC in chloroform was slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of the flask. Then, 1 mL of HEPES buffer (10 mM HEPES salt, 100 mM KCl, adjusted to pH = 7.4) was added, and the resulting suspension was subjected to 10 freeze/thaw cycles (1 cycle = 1 min at -20 °C and 1 min at 37 °C). The mixture was extruded on a 100 nm polycarbonate membrane 21 times, and the resulting liposome solution was diluted to

obtain a 10 mM final concentration. To a quartz cuvette, 1.9 mL of HEPES buffer with sodium chloride (10 mM HEPES salt and 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.4) and 100  $\mu$ L of liposome solution were added with light stirring. Safranin-O dye was added to a 60 nM final concentration ( $\lambda_{\text{ex.}} = 522$  nm,  $\lambda_{\text{em.}} = 581$  nm). At  $t = 50$  s, a solution of biguanidium salt in DMSO was added to obtain a 100  $\mu$ g/mL final solution in the cuvette, and the fluorescence was monitored for 300 s. As a control, we monitored the variation in safranin-O fluorescence in the solution by adding 100  $\mu$ g/mL biguanidium salts. No change was observed.

## **A2.10 Mitochondrial permeation and accumulation**

pMXs-3XHA-EGFP-OMP25 retroviral particles were produced in Phoenix cells and then incubated for 8 hours in KP4 cells. Then, positive cells were selected with blasticidine (Santa Cruz Biotechnology, sc-495389). At day 7 post-infection,  $\sim$ 20 million cells were treated for 3 hours with 15  $\mu$ M metformin, or 15  $\mu$ M compound **1b**, or DMSO as vehicle. After treatment, cells were washed twice with PBS and then scraped into 1 mL chilled KPBS (136 mM KCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.25) for mitochondrial isolation as described in the literature<sup>163</sup>, except for the incubation with anti-HA magnetic beads (Thermo Fisher Scientific, 88837), in which the supernatants were incubated with 30  $\mu$ L of prewashed beads on a vertical-rotating mixer for 1 hour. pMXs-3XHA-EGFP-OMP25 was a gift from David Sabatini (Addgene plasmid # 83356; <http://n2t.net/addgene:83356>; RRID: Addgene\_83356). A standard MTP target plate was used for MALDI-MS analysis (Bruker Daltonics, Billerica, MA). An organic matrix solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA) was best suited for the biguanide drugs and was prepared at a 7 mg/mL concentration in an equal ratio of acetonitrile (ACN) and  $\text{H}_2\text{O}$ . A 0.5  $\mu$ L drop of the matrix solution was placed on the target plate for each biological solution analyzed and let to air dry. Then, for each sample, a 0.5  $\mu$ L drop was pipetted on one of the dried matrix spots and let to air dry. For the MS experiment, an accumulation of 250 shots was obtained for each sample at  $m/z$  0-1000 and repeated three times. External calibration was carried out in cubic enhanced mode using known matrix peaks and CsI to obtain five points of calibration over the considered mass range.

## A2.11 Mice survival

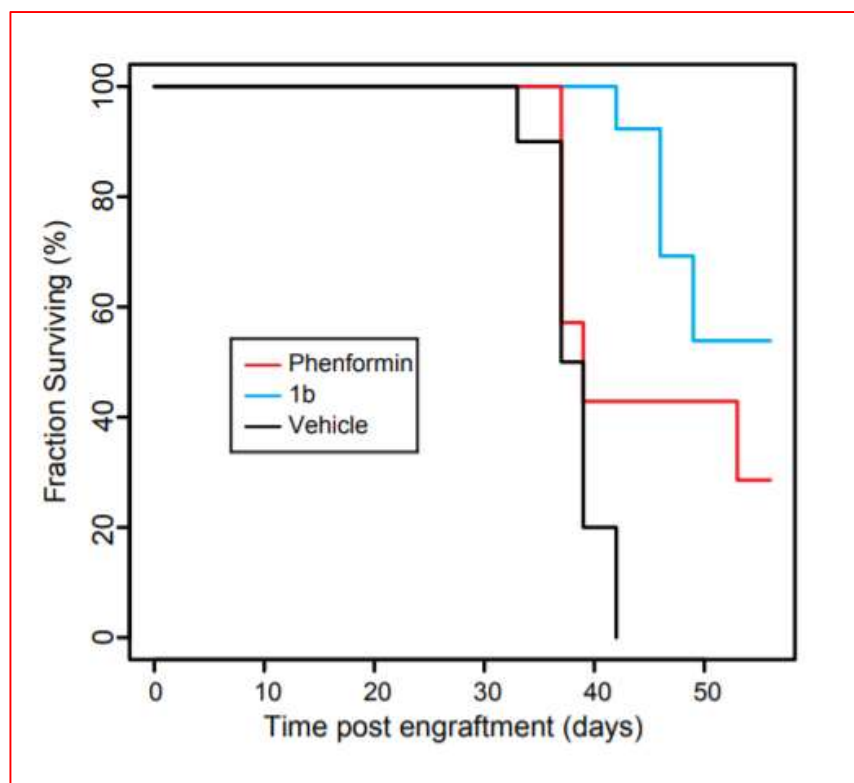


Figure A2.29 Progression of the fraction surviving (%) of nude mice with KP4 cells subcutaneous xenografts performed over 37 days. Treatments with phenformin or compound **3.1b** (both at 50 mg/kg/d, 5 days a week) or vehicle were started 11 days post engraftment.

**Annexe 3 : Informations supplémentaires du chapitre 4**  
**« Amélioration des propriétés antibactériennes et**  
**anticancéreuses de nouveaux sels de biguanidium »**

### **A3.1 Croissance des cellules et détermination de l'IC<sub>50</sub>**

Une solution de cellules cancéreuses pancréatiques KP4 fut préparée dans le milieu de culture DMEM 1X. Les cellules furent comptées avec un hémacytomètre et diluée afin d'obtenir une concentration de 10 000 cellules/mL. Pour les cellules saines HPNE, la solution fut diluée afin d'obtenir une concentration de 80 000 cellules/mL. Dans une plaque 96 puits, 100 µL de la solution de cellules fut ajouté dans chaque puit et placé pour incubation à 37 °C pour 24 h. Par la suite, 100 µL d'une solution de sel de biguanidium dans le milieu DMEM 1X furent ajoutés dans chaque puit et la plaque fut mise à incuber pour 72 h à 37 °C. La plaque fut lavée deux fois au tampon PBS et 100 µL de glutaraldéhyde 1% furent ajoutés dans chaque puit pour 15 min. La plaque fut ensuite lavée deux fois au PBS et 200 µL d'une solution de crystal violet 2% furent ajoutés dans chaque puit. Après 30 min. le crystal violet fut enlevée et la plaque fut lavée à l'eau et mise à sécher pour la nuit. 100 µL d'acide acétique 10% furent ajoutés dans chaque puit, et l'absorbance fut mesurée à  $\lambda = 590$  nm.

### **A3.2 Croissance des bactéries et détermination de la MIC**

Une préculture bactérienne fut préparée par l'inoculation de 1 ml de milieux de culture LB avec la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  ou *B. thuringiensis* HD73. La préculture fut incubée pour une nuit à 37 °C avec agitation et puis ajoutée à 75 ml de milieux de culture LB. Celle-ci fut alors incubée pour 2 h à 37 °C avec agitation, puis diluée dans le LB pour obtenir une densité optique OD<sub>600 nm</sub> = 0.15. À chaque puit d'une plaque 96 puits, 5 µL de sel de biguanidium dans le DMSO et 195 µL de la culture bactérienne furent ajoutés. La plaque fut incubée à 37 °C avec agitation pour 24 h et analysée à l'œil. La MIC fut considérée comme étant la concentration minimale de sel de biguanidium ou aucune croissance bactérienne n'était observée.



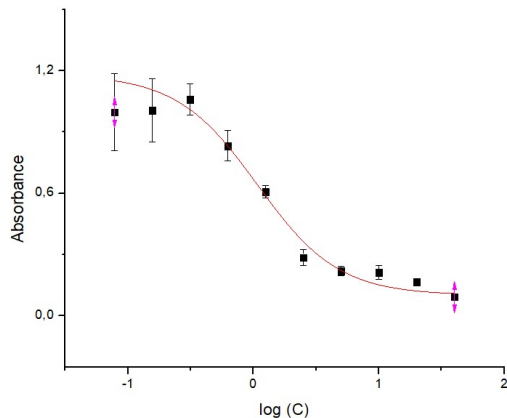
### A3.3 Activité hémolytique

Les globules rouges dans la solution d'Alsever furent centrifugés à 300 g pour 10 min., lavé trois fois au tampon PBS et re-suspendus dans le PBS à 2% v/v. Dans chaque puit d'une plaque 96 puits, 195 µL de la solution de globules rouge et 5 µL de sel de biguanidium dans le DMSO furent ajoutés, et la plaque fut incubée avec une petite agitation pour 1 h à 37 °C. La plaque fut ensuite centrifugée pour 10 min. à 300 g et 50 µL de la solution supernatante de chaque puit fut transféré dans une autre plaque. L'absorbance fut mesurée à  $\lambda = 405$  nm.

### A3.4 Courbes des IC<sub>50</sub>

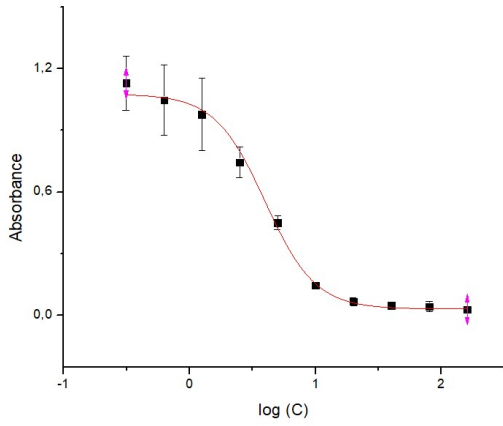
#### A3.4.1 Cellules cancéreuses KP4

##### 2.1a



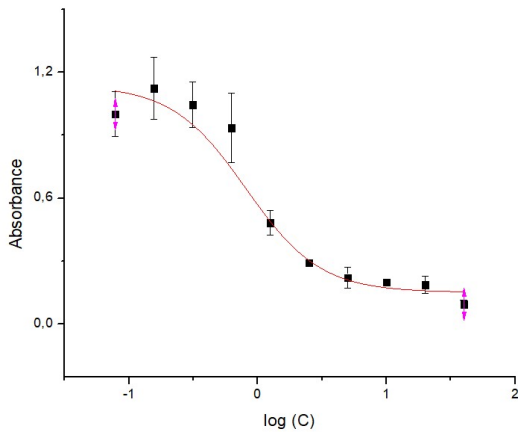
Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{*(LOGx0-x)^p})$	
Adj. R-Square	0,95006	Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,1012	0,02166
Absorbance	A2	1,18053	0,20799
Absorbance	LOGx0	0,03249	0,151
Absorbance	p	-1,34957	0,3565
Absorbance	EC50	1,07769	

### 2.1b



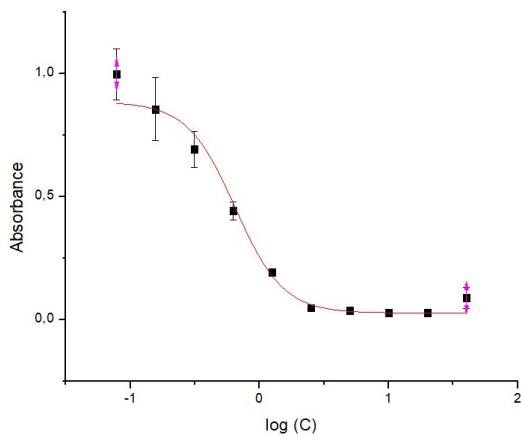
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(LOGx0-x)^p})$		
Adj. R-Square	0,98752		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,03157	0,00385
Absorbance	A2	1,07594	0,07318
Absorbance	LOGx0	0,59917	0,03774
Absorbance	p	-2,18683	0,18356
Absorbance	EC50	3,9735	

### 2.1c



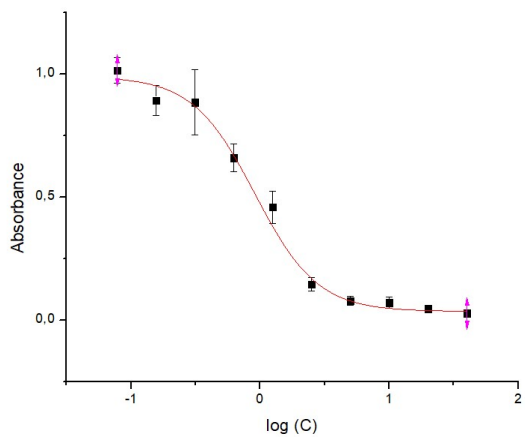
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(LOGx0-x)^p})$		
Adj. R-Square	0,89187		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,1516	0,02665
Absorbance	A2	1,13779	0,19642
Absorbance	LOGx0	-0,0907	0,20132
Absorbance	p	-1,5137	0,57472
Absorbance	EC50	0,81145	

### 2.2a



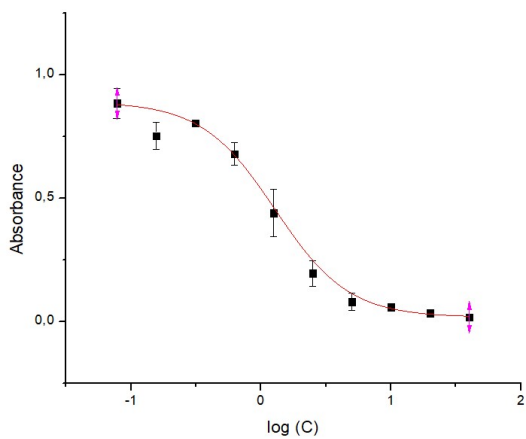
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(LOGx0-x)^p})$		
Adj. R-Square	0,97127		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,02568	0,00426
Absorbance	A2	0,88349	0,09644
Absorbance	LOGx0	-0,1887	0,05666
Absorbance	p	-2,3374	0,30142
Absorbance	EC50	0,64746	

### 2.2b



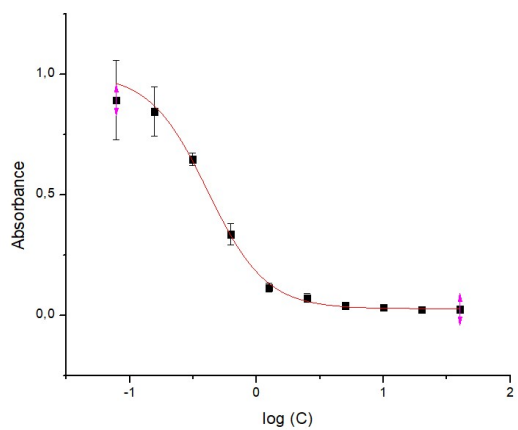
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{-(LOGx0-x)^p})$		
Adj. R-Square	0,98803		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,03425	0,00737
Absorbance	A2	0,98942	0,04572
Absorbance	LOGx0	-0,04009	0,05313
Absorbance	p	-1,79759	0,22917
Absorbance	EC50	0,91182	

### 2.2c



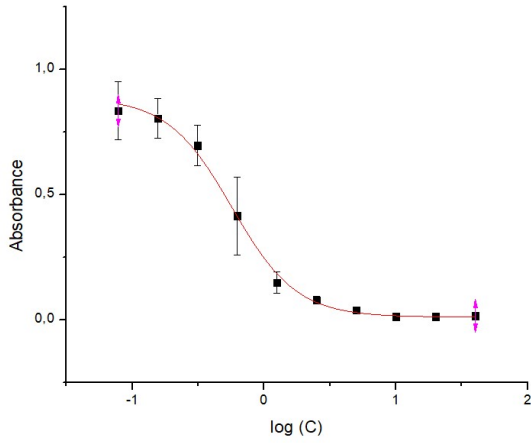
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{-(LOGx0-x)^p})$		
Adj. R-Square	0,99837		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,01628	0,00641
Absorbance	A2	0,88989	0,04605
Absorbance	LOGx0	0,10856	0,07884
Absorbance	p	-1,53735	0,19468
Absorbance	EC50	1,28398	

### 2.3a



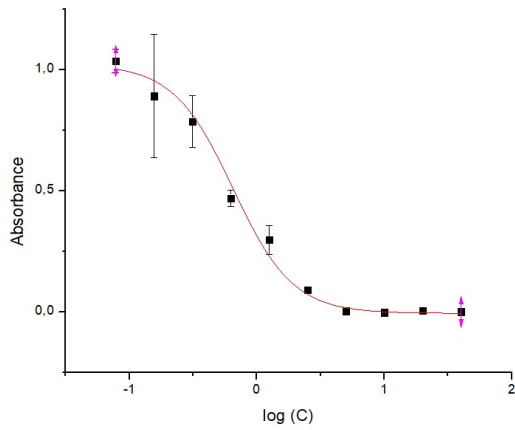
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{-(LOGx0-x)^p})$		
Adj. R-Square	0,99012		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,02655	0,0015
Absorbance	A2	1,0005	0,12509
Absorbance	LOGx0	-0,38491	0,07206
Absorbance	p	-1,90466	0,20157
Absorbance	EC50	0,41218	

### 2.3b



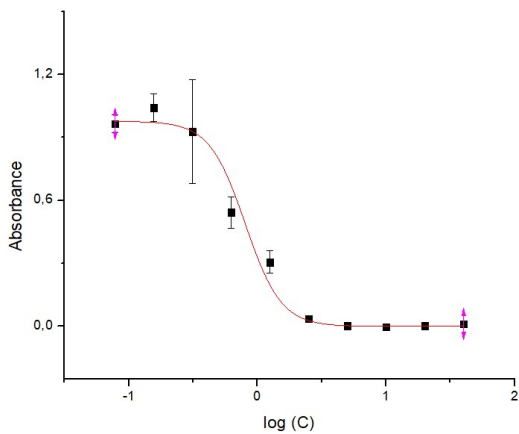
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Squar	0,98384		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,01007	0,00282
Absorbance	A2	0,88558	0,06874
Absorbance	LOGx0	-0,2443	0,07609
Absorbance	p	-1,7813	0,21253
Absorbance	EC50	0,56974	

### 2.3c



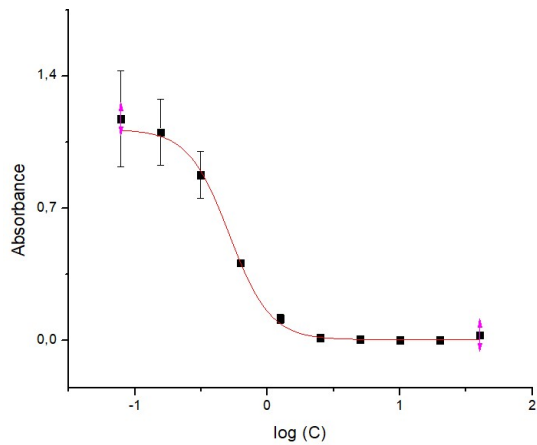
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,94266		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	-0,00702	0,00544
Absorbance	A2	1,02125	0,12632
Absorbance	LOGx0	-0,18596	0,092
Absorbance	p	-1,85647	0,26669
Absorbance	EC50	0,65169	

### 2.4a



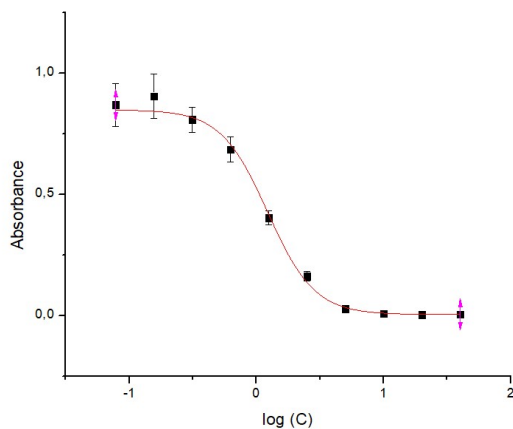
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Squar	0,94258		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	-4,84387E-	0,00219
Absorbance	A2	0,97663	0,08521
Absorbance	LOGx0	-0,09489	0,0914
Absorbance	p	-3,12267	0,73663
Absorbance	EC50	0,80373	

### 2.4b



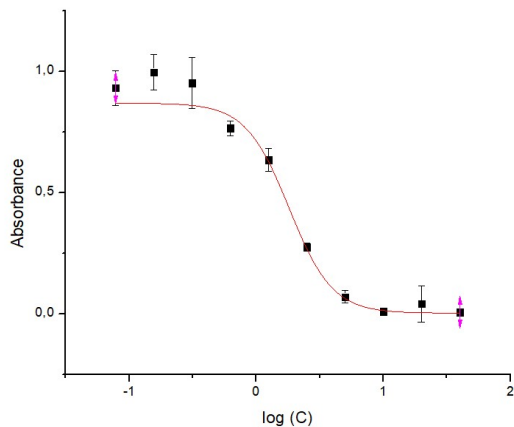
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,88899		
	Value	Standard Error	
Absorbance	A1	0,00331	0,00282
Absorbance	A2	1,11741	0,39571
Absorbance	LOGx0	-0,28831	0,1059
Absorbance	p	-2,8119	0,70745
Absorbance	EC50	0,51486	

### 2.4c



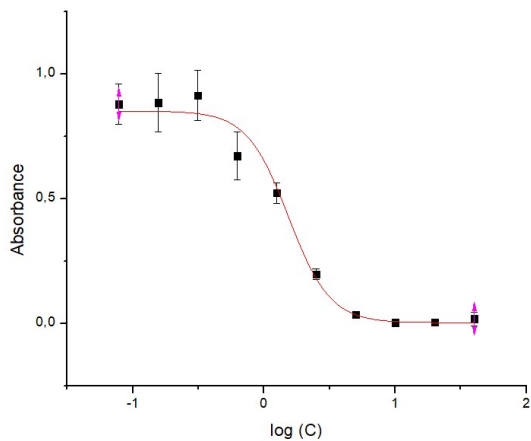
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Squar	0,99278		
	Value	Standard Error	
Absorbance	A1	0,00339	0,00124
Absorbance	A2	0,84824	0,03557
Absorbance	LOGx0	0,08803	0,02677
Absorbance	p	-2,3617	0,16156
Absorbance	EC50	1,22469	

### 2.5a



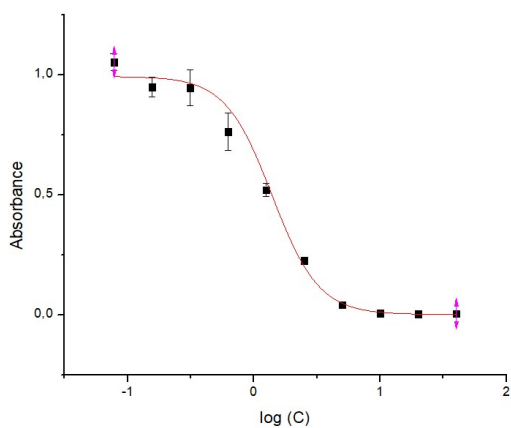
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,99013		
	Value	Standard Error	
Absorbance	A1	0,0018	0,00475
Absorbance	A2	0,86838	0,04175
Absorbance	LOGx0	0,25831	0,03296
Absorbance	p	-2,54825	0,3386
Absorbance	EC50	1,81262	

### 2.5b



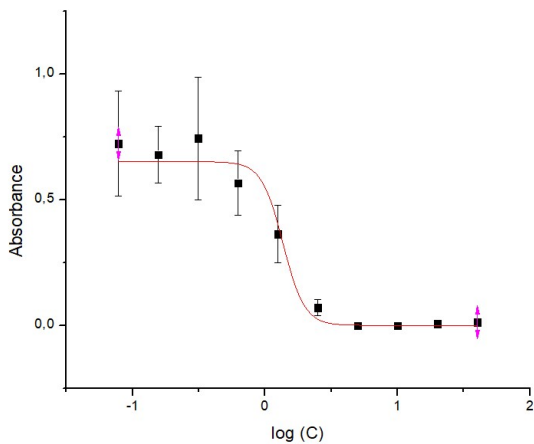
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,98318		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,00209	0,00218
Absorbance	A2	0,8508	0,05263
Absorbance	LOGx0	0,18626	0,03315
Absorbance	p	-2,74471	0,29085
Absorbance	EC50	1,53555	

### 2.5c



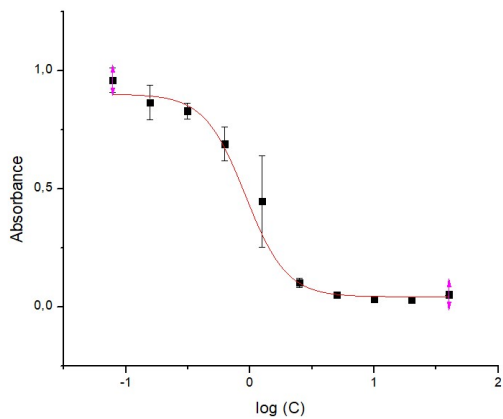
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,98886		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	7,04287E-	0,00248
Absorbance	A2	0,99268	0,04341
Absorbance	LOGx0	-0,1439	0,03185
Absorbance	p	-2,35172	0,22076
Absorbance	EC50	1,39283	

### 2.6a



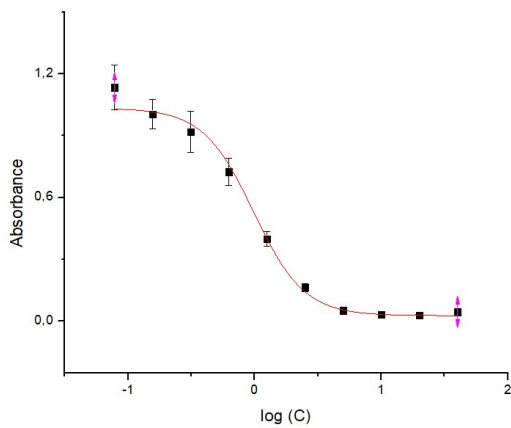
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,67357		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	-4,04515E-4	0,00203
Absorbance	A2	0,65075	0,15469
Absorbance	LOGx0	0,13533	0,12085
Absorbance	p	-5,37985	3,56216
Absorbance	EC50	1,36561	

### 2.6b



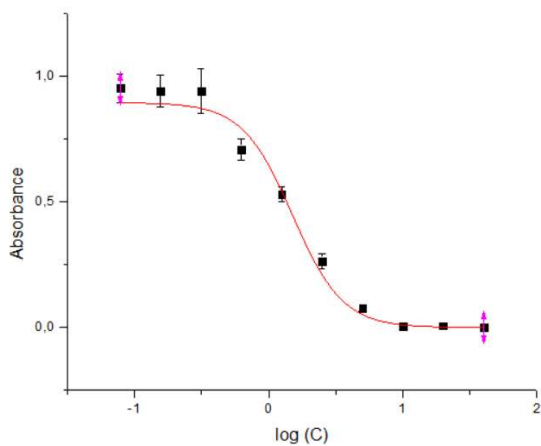
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((L-OGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,98062		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,04179	0,00499
Absorbance	A2	0,90003	0,05644
Absorbance	LOGx0	-0,0375	0,08834
Absorbance	p	-2,6297	0,56999
Absorbance	EC50	0,91726	

### 2.6c



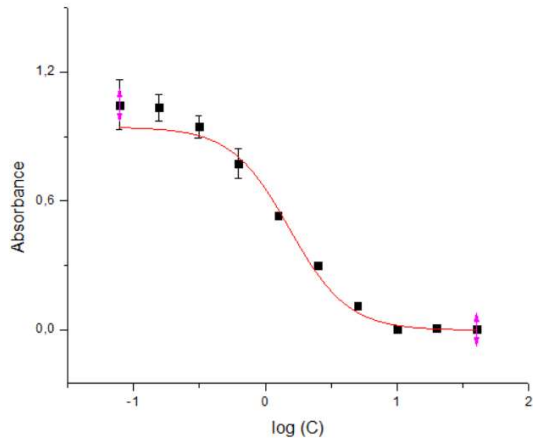
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((L-OGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,98939		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,02674	0,00308
Absorbance	A2	1,03293	0,04912
Absorbance	LOGx0	-0,00826	0,03399
Absorbance	p	-2,17973	0,15227
Absorbance	EC50	0,98117	

### 3.1a



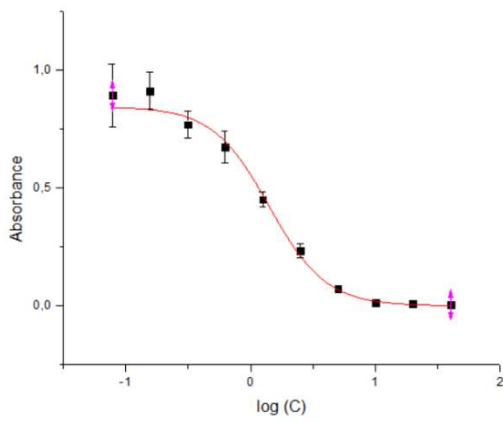
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((L-OGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,97541		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	2,10996E-4	0,00271
Absorbance	A2	0,89564	0,06641
Absorbance	LOGx0	0,17757	0,05352
Absorbance	p	-2,32751	0,28014
Absorbance	EC50	1,50511	

### 3.1b



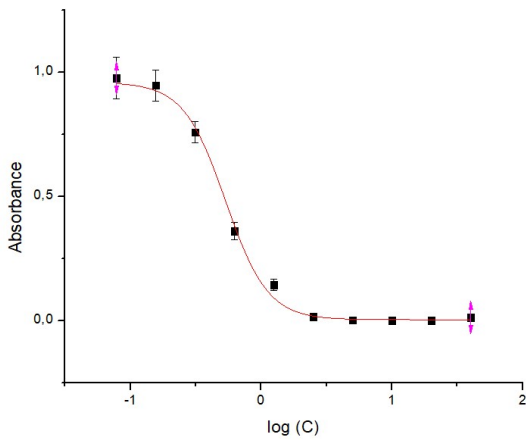
Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{*(\text{LOG}x0-x)^p})$	
Adj. R-Square	0,96344		
Absorbance	A1	-0,00225	0,00509
Absorbance	A2	0,9442	0,14005
Absorbance	LOGx0	0,18318	0,08144
Absorbance	p	-1,96802	0,27001
Absorbance	EC50	1,5247	

### 3.1c



Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{*(\text{LOG}x0-x)^p})$	
Adj. R-Square	0,9883		
Absorbance	A1	6,66909E-4	0,00337
Absorbance	A2	0,84551	0,0497
Absorbance	LOGx0	0,14862	0,04317
Absorbance	p	-1,91456	0,14087
Absorbance	EC50	1,40807	

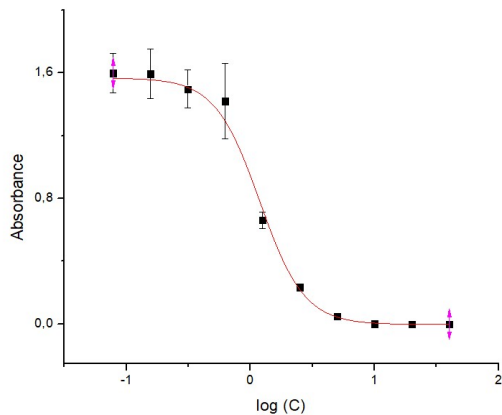
### 4.1



Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{*(\text{LOG}x0-x)^p})$	
Adj. R-Square	0,94238		
Absorbance	A1	0,00279	0,00299
Absorbance	A2	0,95849	0,12294
Absorbance	LOGx0	-0,27222	0,07499
Absorbance	p	-2,69274	0,59336
Absorbance	EC50	0,53429	

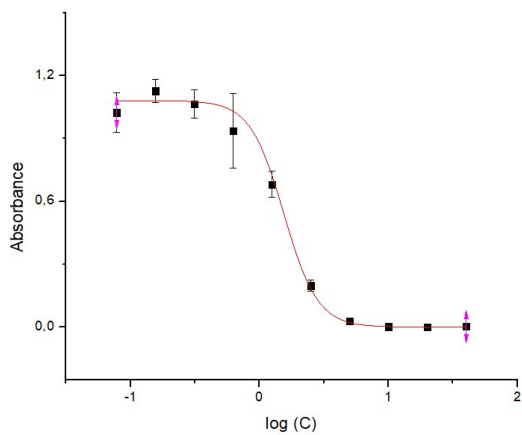


### 4.2



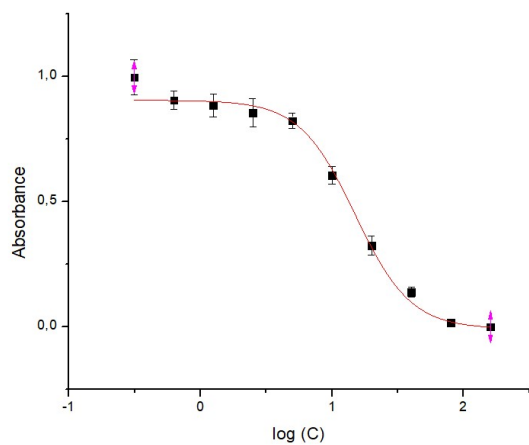
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Adj. R-Square	0,98336		
		Value	Standard Error
Absorbance A1		-0,00284	0,00154
Absorbance A2		1,56691	0,10125
Absorbance LOGx0		0,07418	0,03392
Absorbance p		-2,42098	0,15649
Absorbance EC50		1,18626	

### 4.3



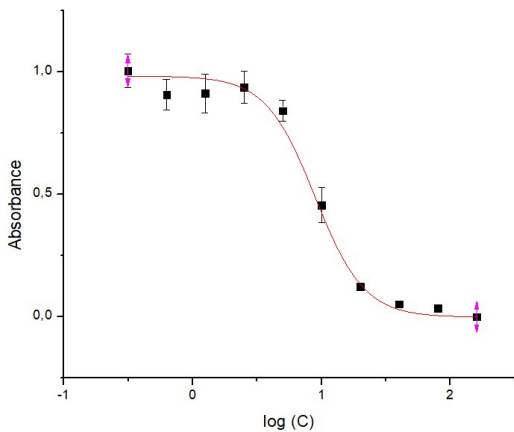
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Adj. R-Squar	0,99231		
		Value	Standard Erro
Absorbance A1		6,46781E-	3,18717E-4
Absorbance A2		1,0805	0,03524
Absorbance LOGx0		0,18906	0,02319
Absorbance p		-3,31903	0,1938
Absorbance EC50		1,54546	

### 4.4



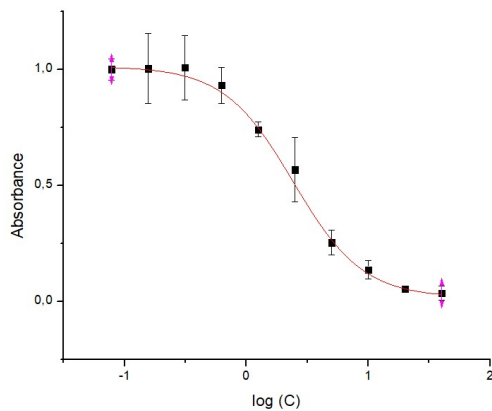
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Adj. R-Square	0,99547		
		Value	Standard Error
Absorbance A1		-0,00967	0,00319
Absorbance A2		0,90396	0,02621
Absorbance LOGx0		1,1753	0,03238
Absorbance p		-2,0593	0,14159
Absorbance EC50		14,9726	

**4.5**



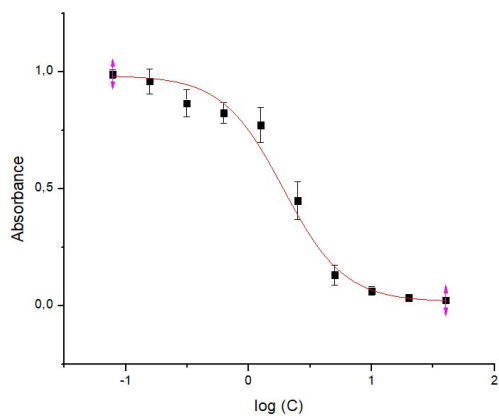
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,97546		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	-0,00335	0,00138
Absorbance	A2	0,98204	0,07679
Absorbance	LOGx0	0,94857	0,06839
Absorbance	p	-2,27591	0,37135
Absorbance	EC50	8,88323	

**4.6**



Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,99889		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,0153	0,00845
Absorbance	A2	1,0124	0,01628
Absorbance	LOGx0	0,38481	0,02081
Absorbance	p	-1,5239	0,08698
Absorbance	EC50	2,42555	

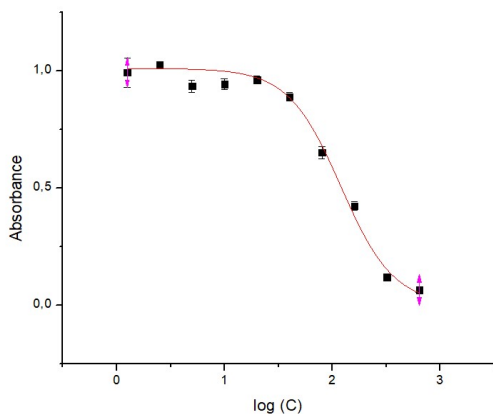
**4.7**



Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,99704		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,01572	0,0115
Absorbance	A2	0,9833	0,01732
Absorbance	LOGx0	0,28046	0,04848
Absorbance	p	-1,75302	0,21597
Absorbance	EC50	1,90749	

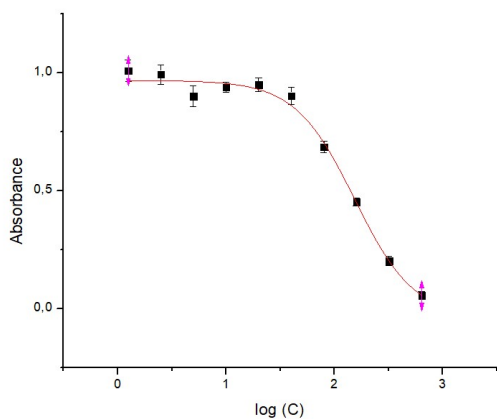
### A3.4.2 Cellules saines HPNE

#### 2.1a



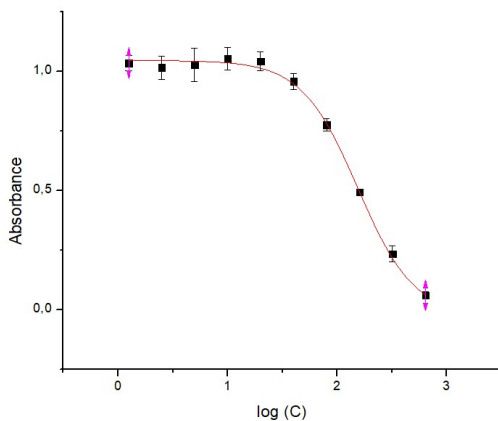
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0}-x)^p)})$		
Adj. R-Squar	0,9935		
	Value	Standard Err	
Absorbance A1	0,0025	0,04528	
Absorbance A2	1,00934	0,01718	
Absorbance LOGx0	2,07913	0,04519	
Absorbance p	-1,77946	0,26559	
Absorbance EC50	119,9852		

#### 2.1b



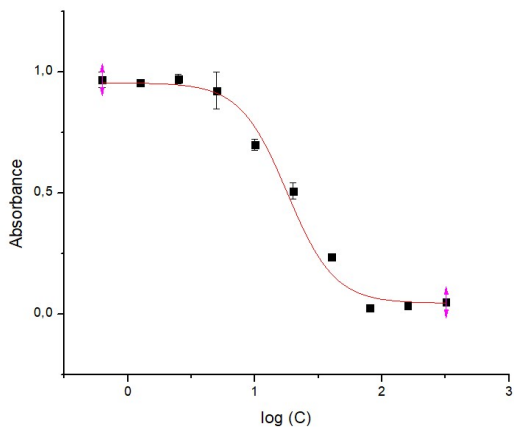
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0}-x)^p)})$		
Adj. R-Squar	0,99539		
	Value	Standard Error	
Absorbance A1	-0,04067	0,04649	
Absorbance A2	0,96692	0,01808	
Absorbance LOGx0	2,18745	0,03273	
Absorbance p	-1,58067	0,19062	
Absorbance EC50	153,9763		

#### 2.1c



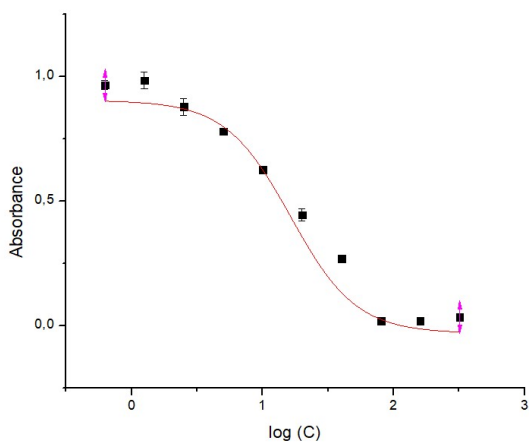
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0}-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,99871		
	Value	Standard Error	
Absorbance A1	-0,02767	0,0208	
Absorbance A2	1,04494	0,01101	
Absorbance LOGx0	2,18935	0,01171	
Absorbance p	-1,69415	0,10748	
Absorbance EC50	154,65157		

### 2.2a



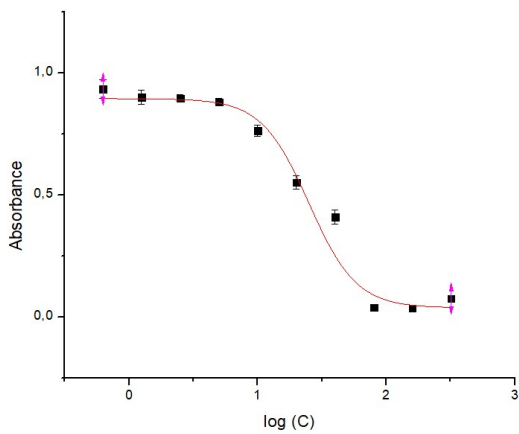
Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx} - \text{LOGx0})/p)})$	
Adj. R-Square	0.98079		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0.04428	0.00762
Absorbance	A2	0.95421	0.04694
Absorbance	LOGx0	1.25447	0.07194
Absorbance	p	-2.34693	0.51797
Absorbance	EC50	17.96661	

### 2.2b



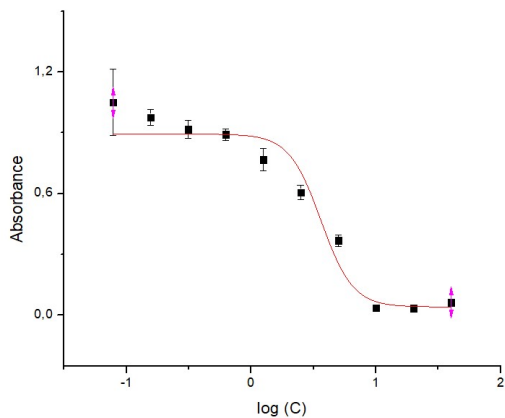
Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0} - \text{x})/p)})$	
Adj. R-Square	0.99255		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	-0.03151	0.04074
Absorbance	A2	0.9032	0.06629
Absorbance	LOGx0	1.2144	0.06124
Absorbance	p	-1.74013	0.37691
Absorbance	EC50	16.38329	

### 2.2c



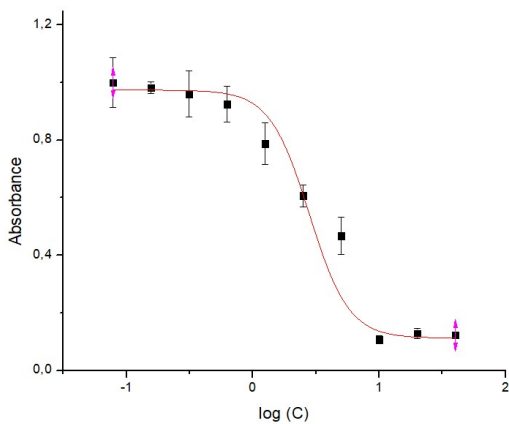
Equation		$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0} - \text{x})/p)})$	
Adj. R-Square	0.98414		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0.03669	0.02037
Absorbance	A2	0.89371	0.03987
Absorbance	LOGx0	1.39884	0.07198
Absorbance	p	-2.36065	0.69944
Absorbance	EC50	25.0516	

### 2.3a



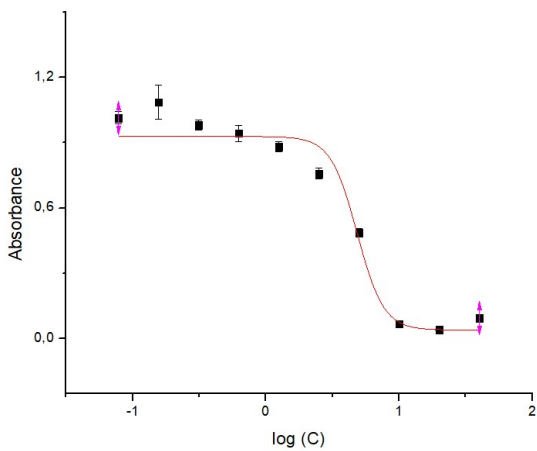
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0-x})^p))})$		
Adj. R-Square	0,94927		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,04081	0,01041
Absorbance	A2	0,89331	0,07238
Absorbance	LOGx0	0,55926	0,07484
Absorbance	p	-3,4057	1,19225
Absorbance	EC50	3,62459	

### 2.3b



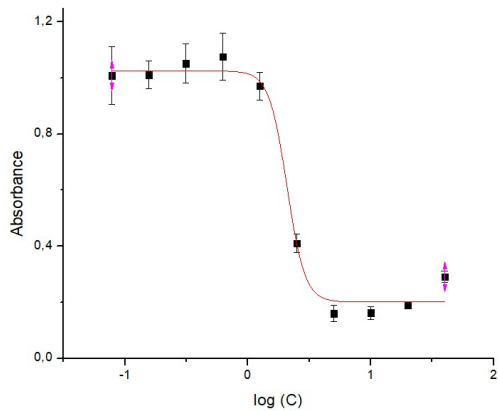
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0-x})^p))})$		
Adj. R-Square	0,98599		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,11211	0,01703
Absorbance	A2	0,97384	0,0326
Absorbance	LOGx0	0,44864	0,05032
Absorbance	p	-2,78413	0,80793
Absorbance	EC50	2,79663	

### 2.3c



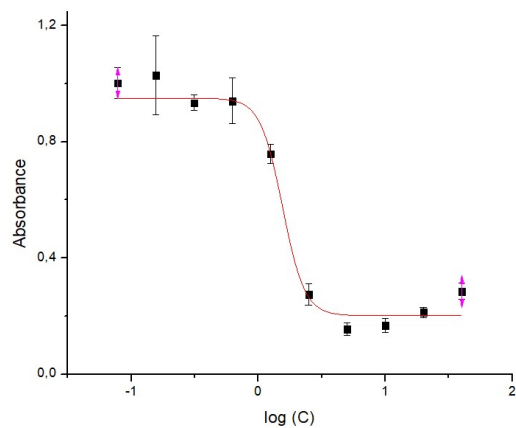
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOGx0-x})^p))})$		
Adj. R-Square	0,98457		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,04004	0,00833
Absorbance	A2	0,92842	0,03907
Absorbance	LOGx0	0,68488	0,03106
Absorbance	p	-4,37982	0,91182
Absorbance	EC50	4,84041	

### 2.4a



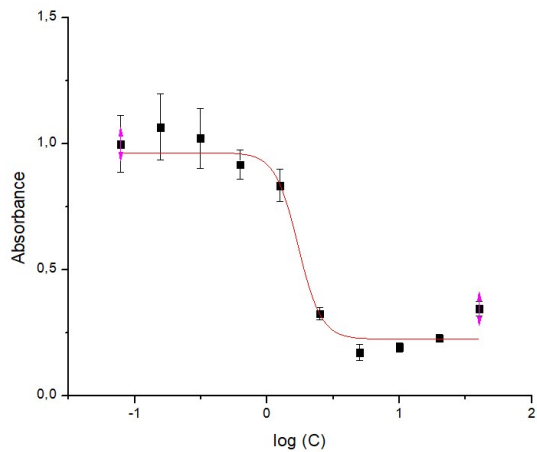
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,94899		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,20064	0,01726
Absorbance	A2	1,02521	0,07394
Absorbance	LOGx0	0,31796	0,07498
Absorbance	p	-5,9726	4,93612
Absorbance	EC50	2,07952	

### 2.4b



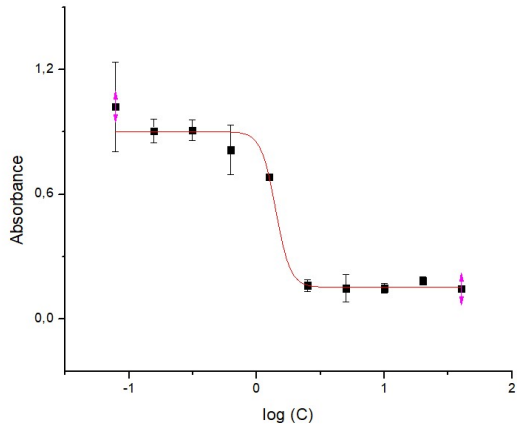
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,97398		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,20137	0,01948
Absorbance	A2	0,95029	0,04003
Absorbance	LOGx0	0,19031	0,0422
Absorbance	p	-4,99148	1,76223
Absorbance	EC50	1,54993	

### 2.4c



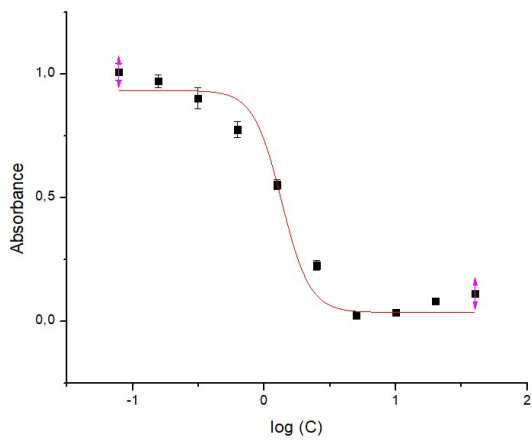
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,90121		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,22398	0,02073
Absorbance	A2	0,96346	0,09364
Absorbance	LOGx0	0,23399	0,07625
Absorbance	p	-4,99544	2,18165
Absorbance	EC50	1,71391	

### 2.5a



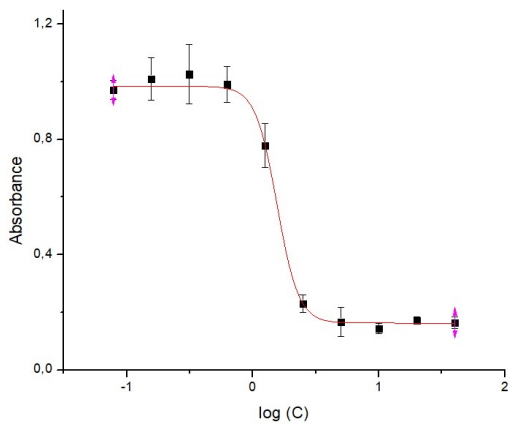
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((L - OGx0-x)^p)})$	
Adj. R-Square	0.99512	
	Value	Standard Error
Absorbance A1	0.15355	0.00686
Absorbance A2	0.90097	0.02775
Absorbance LOGx0	0.14764	0.02572
Absorbance p	-7.59973	3.66823
Absorbance EC50	1.40489	

### 2.5b



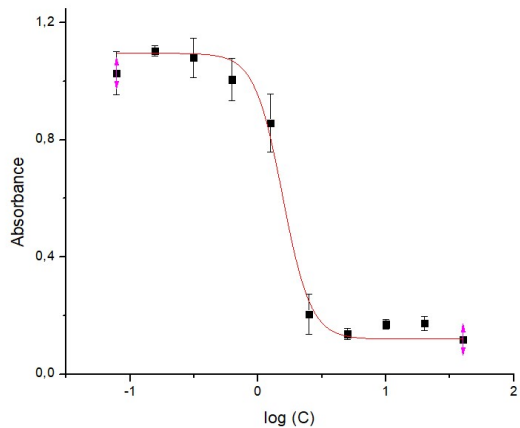
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((L - OGx0-x)^p)})$	
Adj. R-Square	0.90781	
	Value	Standard Error
Absorbance A1	0.03526	0.01295
Absorbance A2	0.93283	0.10792
Absorbance LOGx0	0.13176	0.06582
Absorbance p	-4.06647	2.42476
Absorbance EC50	1.35443	

### 2.5c



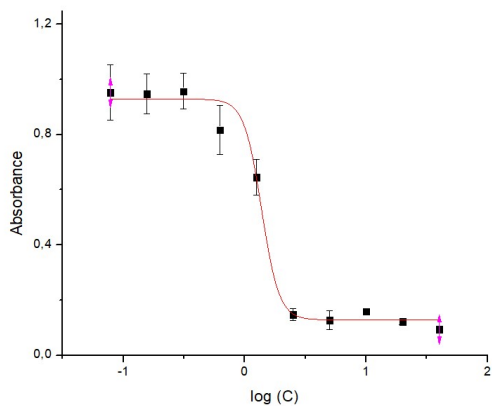
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$	
Adj. R-Square	0.99636	
	Value	Standard Error
Absorbance A1	0.16263	0.00545
Absorbance A2	0.98482	0.01634
Absorbance LOGx0	0.19137	0.02049
Absorbance p	-5.09696	0.63351
Absorbance EC50	1.55371	

### 2.6a



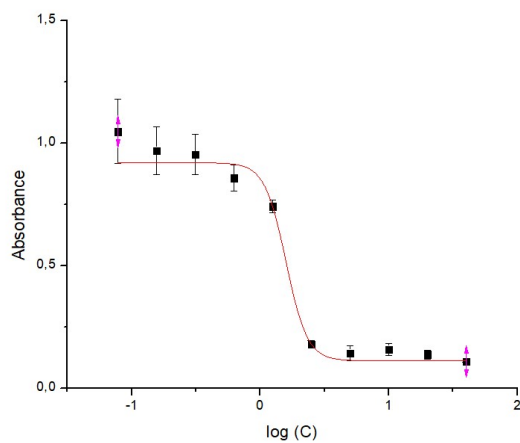
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Adj. R-Square	0,99252		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,11954	0,00417
Absorbance	A2	1,09586	0,02844
Absorbance	LOGx0	0,19182	0,0709
Absorbance	p	-3,96286	1,5634
Absorbance	EC50	1,55533	

### 2.6b



Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Adj. R-Square	0,94527		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,12836	0,01107
Absorbance	A2	0,92893	0,06763
Absorbance	LOGx0	0,13853	0,04423
Absorbance	p	-6,04725	2,7647
Absorbance	EC50	1,37573	

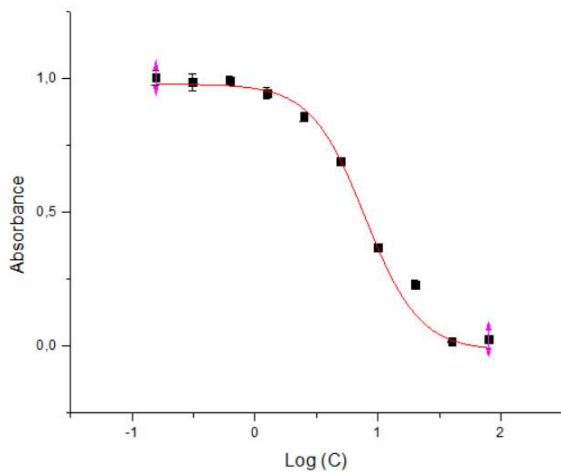
### 2.6c



Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$		
Adj. R-Square	0,98499		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,11096	0,00426
Absorbance	A2	0,91911	0,05167
Absorbance	LOGx0	0,20036	0,02412
Absorbance	p	-5,2549	0,68125
Absorbance	EC50	1,58621	

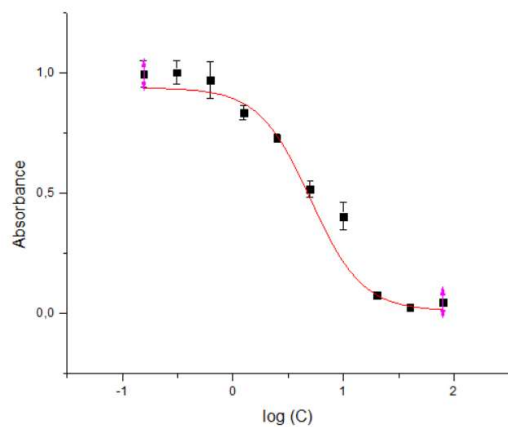


### 3.1a



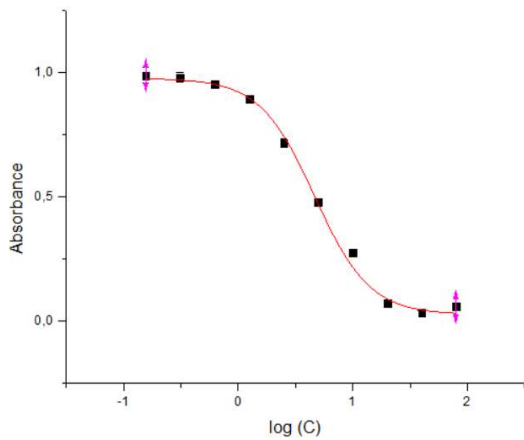
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,99214		
Absorbance	A1	-0,01608	0,02016
Absorbance	A2	0,97998	0,04283
Absorbance	LOGx0	0,89744	0,02615
Absorbance	p	-1,9786	0,32331
Absorbance	EC50	7,89651	

### 3.1b



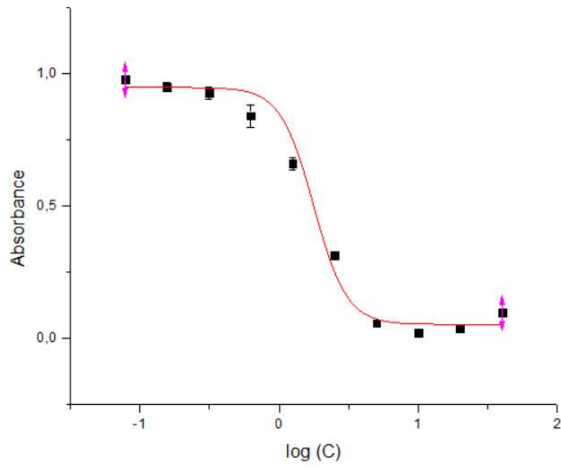
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,96628		
Absorbance	A1	0,01094	0,01107
Absorbance	A2	0,93909	0,0688
Absorbance	LOGx0	0,70394	0,06636
Absorbance	p	-1,85427	0,22721
Absorbance	EC50	5,05751	

### 3.1c



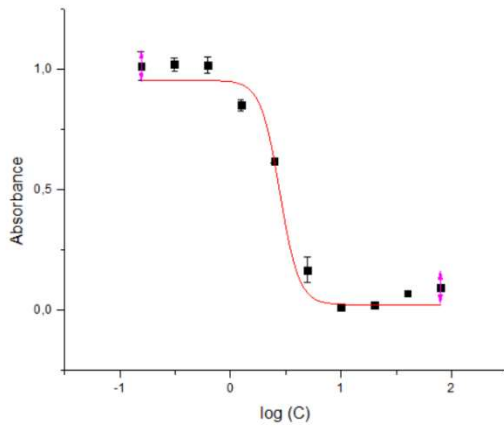
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,99493		
Absorbance	A1	0,02704	0,01793
Absorbance	A2	0,97774	0,02848
Absorbance	LOGx0	0,66893	0,03419
Absorbance	p	-1,81368	0,21971
Absorbance	EC50	4,66585	

### 4.1



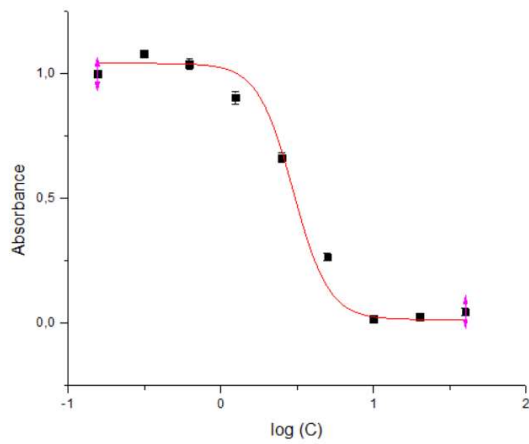
Equation			
$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(LOGx0-x)^p})$			
Adj. R-Square		0,94078	
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,05355	0,01567
Absorbance	A2	0,94891	0,07641
Absorbance	LOGx0	0,24858	0,09487
Absorbance	p	-3,64587	1,72779
Absorbance	EC50	1,77248	

### 4.2



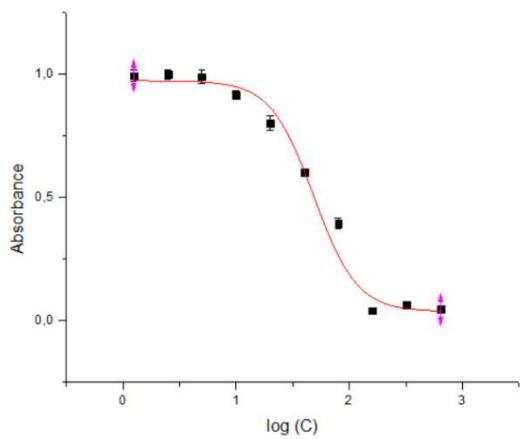
Equation			
$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(LOGx0-x)^p})$			
Adj. R-Square		0,9791	
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,02377	0,01301
Absorbance	A2	0,95457	0,07651
Absorbance	LOGx0	0,44724	0,05468
Absorbance	p	-5,02412	5,73916
Absorbance	EC50	2,8005	

### 4.3



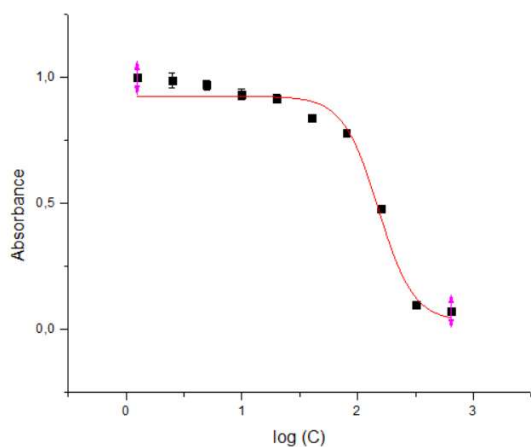
Equation			
$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{(LOGx0-x)^p})$			
Adj. R-Square		0,98969	
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,01476	0,01071
Absorbance	A2	1,04185	0,03754
Absorbance	LOGx0	0,47543	0,04627
Absorbance	p	-3,74224	0,90225
Absorbance	EC50	2,98836	

#### 4.4



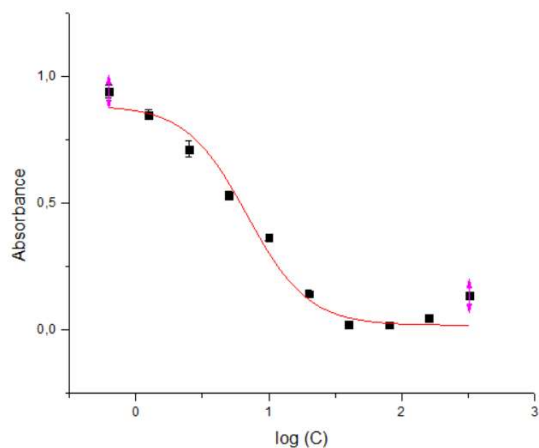
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,98361		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,03739	0,02252
Absorbance	A2	0,97418	0,04173
Absorbance	LOGx0	1,68701	0,04714
Absorbance	p	-2,28411	0,51469
Absorbance	EC50	48,64136	

#### 4.5



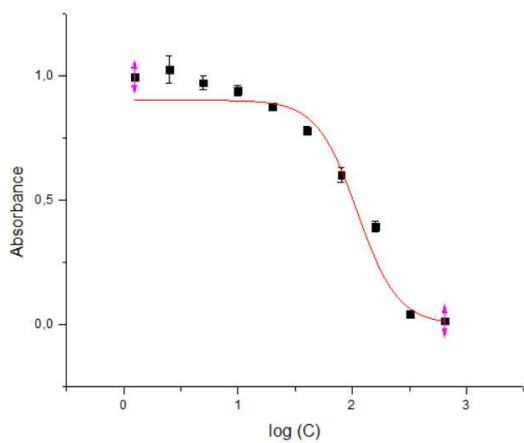
Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,98612		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,03228	0,03689
Absorbance	A2	0,92529	0,03405
Absorbance	LOGx0	2,17979	0,03161
Absorbance	p	-2,85613	0,49152
Absorbance	EC50	151,28201	

#### 4.6



Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)^p)})$		
Adj. R-Square	0,94829		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,01864	0,02031
Absorbance	A2	0,88736	0,0985
Absorbance	LOGx0	0,8373	0,091
Absorbance	p	-1,89458	0,59582
Absorbance	EC50	6,87539	

## 4.7



Equation	$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{-(\text{LOG}x - x)/p})$		
Adj. R-Square	0,99		
		Value	Standard Error
Absorbance	A1	0,00209	0,01325
Absorbance	A2	0,90324	0,03646
Absorbance	LOGx0	2,04565	0,0639
Absorbance	p	-2,45305	0,52878
Absorbance	EC50	111,08471	

## Références des annexes

1. Chen, W. W.; Freinkman, E.; Wang, T.; Birsoy, K.; Sabatini, D. M., *Cell* **2016**, 166 (5), 1324.
2. Gravel, J.; Schmitzer, A. R., *Supramol Chem* **2014**, 27 (5-6), 364.

