

Université de Montréal

**Conception, synthèse et applications biologiques d'inhibiteurs de
biofilms à base d'imidazole et de benzimidazole**

Par

Jérémy Tessier

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorale
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph. D) en Chimie

Septembre 2020

© Jérémy Tessier, 2020

Université de Montréal

Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

Cette thèse intitulée :

**Conception, synthèse et applications biologiques d'inhibiteurs de biofilms à base
d'imidazole et de benzimidazole**

Présenté par :

Jérémie Tessier

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Pr. William D. Lubell

Président-rapporteur

Pr. Andreea R. Schmitzer

Directeur de recherche

Pr. Alexis Vallée-Bélisle

Membre du jury

Pr. Sylvie Garneau-Tsodikova

Examineur externe

Résumé

La résistance aux antibiotiques est l'une des menaces les plus graves pour la santé mondiale de nos jours. L'émergence de bactéries multirésistantes encourage les chercheurs à développer de nouveaux antibiotiques et stratégies pour compenser leurs différents mécanismes de résistance. L'un de ces mécanismes de défense est la formation de biofilms. Sous cette forme, les bactéries développent une matrice extracellulaire protectrice les rendant plus résistantes à divers traitements antimicrobiens. Nous avons conçu et synthétisé des composés de déstabilisation des membranes avec des caractéristiques clés : un cation benzimidazolium ou imidazolium, une chaîne apolaire hydrophobe et/ou un site de reconnaissance des anions lipophiles. Ces caractéristiques leur confèrent une activité antimicrobienne accrue et une grande capacité à perturber les membranes cellulaires. Ces composés perturbateurs de la membrane agissent via un mécanisme rapide et efficace et ont montré de bons résultats contre les souches de SARM (*staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline) en tant que candidats antibiofilms prometteurs. Ces nouveaux agents ont le potentiel de se disperser et d'inhiber la formation de biofilms et pourraient avoir un impact positif sur la médecine humaine à l'avenir.

Mots-clés : benzimidazolium, imidazolium, membrane cellulaire, biofilms, bactéries, antibiotique, perturbateur membranaire, ammonium quaternaire.

Abstract

Antibiotic resistance is one of the most serious threats to global health nowadays. Emergence of resistant bacteria encourages researchers to develop new antibiotics and strategies to mitigate their different resistance mechanisms. One of these defense mechanisms is the formation of biofilms. In this form, bacteria develop a protective extracellular matrix making them more resistant to various antimicrobial treatments. We have designed and synthesized membrane destabilizing compounds with three key features: a benzimidazolium or an imidazolium cation, a hydrophobic apolar chain, and a lipophilic anion recognition site. These characteristics give these compounds increased antimicrobial activity and greater ability to disrupt cell membranes. These membrane-disrupting compounds act via a fast and efficient mechanism and showed good results against MRSA (methicillin-resistant *staphylococcus aureus*) strains as promising antibiofilms candidates. These new agents have the potential to disperse and inhibit the formation of biofilms and could have a positive impact on human medicine in the future.

Keywords : benzimidazolium, imidazolium, cellular membrane, biofilms, bacteria, antibiotic, membrane perturbator, quaternary ammonium.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vii
Table des matières	ix
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des figures et des schémas.....	xix
Liste des sigles et abréviations	xxvii
Remerciements	xxxiii
Chapitre 1 : Introduction générale.....	1
1.1 Découverte des pénicillines et leurs utilisations.....	1
1.2 Facteurs influençant le développement de la résistance bactérienne	3
1.3 Mécanisme d'action des antibiotiques.....	4
1.3.1 Inhibition de la synthèse d'ADN	5
1.3.2 Inhibition de la synthèse d'ARN	6
1.3.3 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	8
1.3.4 Inhibition bactérienne via la perméabilisation membranaire	10
1.4 La membrane cellulaire : une cible de choix.....	12
1.4.1 La bicouche phospholipidique.....	12
1.4.2 La membrane bactérienne	13
1.4.3 La membrane bactérienne des <i>S. aureus</i>	14
1.5 Les levures, un organisme cellulaire semblable au nôtre.....	15
1.5.1 La membrane des levures	16
1.6 Détermination de l'activité antibactérienne.....	17

1.6.1 La concentration minimale inhibitrice	17
1.7 Les biofilms.....	19
1.7.1 Le cycle de développement des biofilms	20
1.7.2 Les biofilms mixtes.....	23
1.7.3 La détection des biofilms	25
1.7.4 Étude de l'activité sur les biofilms.....	27
1.8 Les composés cationiques antibactériens et antifongiques.....	28
1.8.1 Les composés de type ammonium quaternaire.....	29
1.8.2 Les composés azolés	32
1.8.3 Les sels d'imidazolium et de benzimidazolium	34
1.9 Description du projet de recherche	35
1.9.1 Propriétés antibactériennes d'analogues du miconazole.....	35
1.9.2 Propriétés antibactériennes et antibiofilms des sels d'imidazolium et de benzimidazolium	37
1.10 Références.....	39
Chapitre 2 : Synthèse d'agents anti-biofilms dérivés de la molécule antifongique Miconazole ..	48
2.0 Préface	48
2.0.1 Les liquides ioniques organiques.....	48
2.0.2 Références	51
Article 1 : Anti-staphylococcal biofilm activity of miconazole-zoetylium bromide.....	53
2.1 Abstract	54
2.2 Introduction	54
2.3 Results and discussion	56
2.4 Experimental	63

2.4.1 Materials and methods	63
2.4.2 Synthesis.....	63
2.4.3 Bacterial strains, culture conditions and viability	63
2.4.4 Biofilm inhibition	64
2.4.5 Biofilm disruption	64
2.4.6 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis.....	64
2.4.7 Minimal bactericidal concentration (MBC)	65
2.4.8 Hemolysis	65
2.5 Conclusions	65
2.6 Conflicts of interest	66
2.7 Acknowledgements	66
2.8 Notes and references.....	66
Chapitre 3 : Propriétés antibactériennes de plusieurs sels de lutidine-bis-benzimidazolium et l'étude de leur effet sur les biofilms bactériens	69
3.1 Préface	69
Article 2 : Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Disubstituted Bis-benzimidazolium Salts	70
3.2 Abstract	71
3.3 Introduction	71
3.4 Results and Discussion.....	73
3.4.1 Design and synthesis of benzimidazolium salts	73
3.4.2 Antibacterial and antifungal properties.....	74
3.4.3 Inhibition of biofilm formation.....	75
3.4.4 Destruction of mature biofilms	76
3.4.5. Mechanism of action	78

3.4.6 Toxicity evaluation	82
3.5 Conclusions	82
3.6 Experimental Section	82
3.7 Conflict of interest	82
3.8 References.....	82
Chapitre 4 : Propriétés antibactériennes de deux nouvelles générations de sel de benzimidazolium et l'étude de leur effet sur les biofilms bactériens	85
4.1 Préface	85
Article 3 : Benzimidazolium salts prevent and disrupt methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms	86
4.2 Abstract	87
4.3 Introduction	87
4.4 Results and discussion	89
4.5 Conclusions	96
4.6 Acknowledgements	96
4.7 Experimental	96
4.7.1 Synthesis and material	96
4.7.2 Bacterial strains, culture conditions, and viability assays.....	97
4.7.3 Hemolytic assay.....	97
4.7.4 Biofilm inhibition assay.....	97
4.7.5 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM).....	97
4.7.6 Scanning electron microscopy.....	98
4.8 References.....	98
Chapitre 5 : Produits phytochimiques et cyclodextrines - Émulsions de Pickering: potentialisateurs naturels de l'activité antibactérienne, antifongique et antibiofilm.....	102

5.1 Préface	102
5.1.1 Introduction sur les émulsions de Pickering	102
5.1.2 Références	106
Article 4 : Phytochemicals and Cyclodextrins-Based Pickering Emulsions: Natural Potentiators of Antibacterial, Antifungal and Antibiofilm Activity	107
5.2 Abstract	108
5.3 Introduction	108
5.4 Experimental section	110
5.4.1 General Information	110
5.4.2 Synthesis of miconazocetylum bromide	110
5.4.3 Emulsion preparation and phase diagram	111
5.4.4 Microscopy	111
5.4.5 X-ray powder diffraction	111
5.4.6 Differential scanning calorimetry	112
5.4.7 Multiple light scattering	112
5.4.8 Rheological study	112
5.4.9 Antimicrobial activity	112
5.4.10 Biofilm disruption	113
5.5 Results	114
5.6 Conclusion	123
5.7 Associated content	123
5.7.1 Supporting Information	123
5.7.2 Acknowledgment	123
5.8 References	124

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives	128
6.1 Vers la modification ciblée des antibiotiques commerciaux	128
6.2 Vers la synthèse de nouveaux analogues antibactériens à base de sels de benzimidazolium	129
6.3 Vers une administration contrôlée des composés antibactériens	131
6.4 Références.....	132
Annexes	133
A1.1 Synthesis and characterization.	I
A1.2 Concepts and methods used.....	VII
A1.2.1 Cellular reactive oxygen species (ROS) detection.	VII
A1.1.2 Ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) hydrolysis.	VIII
A1.1.3 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) Analysis.	XI
A1.3 References	XIII
A1.4 NMR spectra of newly synthesized compounds.....	XIV
Annexe 2 : informations supplémentaires de l'article 2 « Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Disubstituted Bis-benzimidazolium Salts ».....	XXI
A2.1 Materials and methods.....	XXI
A2.2 Synthesis and characterization.	XXI
A2.3 Concepts and methods used.....	XXX
A2.3.1 Bacterial strains, culture conditions, and viability assays.	XXX
A2.3.2 EYPC liposomes.....	XXXI
A2.3.3 Lucigenin-based ion transport assays.....	XXXI
A2.3.4 Biofilm inhibition assay.....	XXXI
A2.3.5 Biofilm disruption assay.....	XXXII

A2.3.6 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis.	XXXII
A2.3.7 Biofilm formation: crystal violet assay.	XXXIII
A2.3.8 Dynamic light scattering (DLS) assay.	XXXIV
A2.3.9 Molecular modelling.	XXXIV
A2.3.9 Hemolytic assay.	XXXV
Annexe 3 : informations supplémentaires de l'article 3 « Benzimidazolium salts prevent and disrupt methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms »	XXXVIII
A3.1 Synthesis and characterization.	XXXVIII
General procedure for 1st and 2nd generation benzimidazolium salt formation (.....	XL
General procedure for benzimidazole alkylation (.....	XLVIII
General procedure for 3rd generation benzimidazolium salt formation (.....	LIII
A3.2 Concepts and methods used.....	LVIII
A3.2.1 Hemolytic assay.....	LVIII
A3.2.2 Biofilm inhibition assay.....	LVIII
A3.2.3 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis.	LIX
A3.2.4. Scanning electron microscopy.	LIX
A3.3 NMR spectra and LCMS of newly synthesized compounds.....	LX
Annexe 4 : informations supplémentaires de l'article 4 «Phytochemicals and cyclodextrins based-Pickering emulsions: natural potentiators of antibacterial, antifungal and antibiofilm activity»	LXXXVI

Liste des tableaux

Table 2.1 Minimal concentrations (μM) required to inhibit the growth of different organisms..	57
Table 2.2. Bacterial mortality after 24 h at different antimicrobial concentrations	59
Table 2.3. Bacterial mortality in preformed biofilms at different antimicrobial concentrations .	62
Table 3.1. Minimal concentrations required to inhibit microorganism growth.....	74
Table 3.2. Calculated $\log P$ and proposed mechanism of action (MoA) in the membrane.	81
Table 4.1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of semi-flexible benzimidazolium salts (generation II)	91
Table 4.2 Minimal inhibitory concentration (MIC) of flexible benzimidazolium salts (generation III)	94

Liste des figures et des schémas

Figure 1.1. Structures des différentes générations d'antibiotique bêta-lactames.	1
Figure 1.2. Structure du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT).	2
Figure 1.3. Mécanismes d'action des antibiotiques et mécanismes de résistance bactérienne. ...	4
Schéma 1.1. Rétrosynthèse de l'acide nalixidique à partir du dérivé 6-méthylpyridin-2-amine. ...	5
Figure 1.4. Structure de l'antibiotique de deuxième génération ciprofloxacine.	6
Figure 1.5. Structure de l'antibiotique rifampicine.....	7
Figure 1.6. Structure générale des céphalosporines.....	8
Figure 1.7 Structure de la vancomycine et de la méthicilline.	9
Figure 1.8. Mécanisme d'action des agents perturbateurs de la membrane. Copyright 2011, avec la permission de Macmillan Publishers Limited. ^[49]	11
Figure 1.9. Exemple de deux phospholipides : la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine. 12	
Figure 1.10. Représentation de l'auto-assemblage des phospholipides en solution aqueuse.....	13
Figure 1.11. Structures des différentes membranes bactériennes.	14
Figure 1.12. Structure de l'acide téichoïque.....	15
Figure 1.13. Structure de la membrane des levures (haut) et structure des différentes composantes de la membrane externe (bas).	16
Figure 1.14. Représentation d'une plaque à 96 puits utilisée lors de la détermination de la CMI.	18
Figure 1.15. Les différentes étapes du développement des biofilms.....	21
Figure 1.16. Représentation de l'interaction entre deux espèces au sein d'un biofilm.	24
Figure 1.17. Structure du colorant cristal violet et son effet sur les biofilms.	25
Figure 1.18. Représentation de différents biofilms avec le test de viabilité <i>BaClight</i>	26
Figure 1.19. Structure de l'iodure de propidium utilisé comme colorant.	26
Figure 1.20. Image MEB d'un biofilm <i>S. aureus</i> . ^[112]	27
Figure 1.21. Représentation des deux modèles utilisés pour la détermination de l'activité antibiofilm. (I) : inhibition ; (II) : perturbation/destruction.....	27
Figure 1.22. Structure du chlorure de benzalkonium.	29

Figure 1.23. Structure de la norspermidine et des nouveaux analogues synthétisés.....	30
Figure 1.24. Structure des différents analogues synthétisés par J. Haldar et ses collègues.....	31
Figure 1.25. Structure du noyau 1 <i>H</i> -imidazole et de l'acide aminé essentiel <i>L</i> -histidine.....	32
Schéma 1.2. Synthèse du nitrate de miconazole en trois étapes. ^[133]	33
Figure 1.26. Interaction entre le miconazole et le noyau flavohémoglobine. ^[136]	33
Figure 1.27. Structure de l'antifongique fluconazole.....	34
Schéma 1.3. Synthèse générale des sels d'imidazolium et de benzimidazolium.....	34
Figure 1.28. Composé NH125 et différents analogues de la librairie de Huigens. ^[142]	35
Schéma 1.4. Synthèse du dérivé amphiphile de la vancomycine. ^[143]	36
Schéma 1.5. Réaction d'alkylation afin d'obtenir divers bromures de miconazolium	37
Figure 1.29. Structure des antibiotiques synthétisés au sein de notre groupe de recherche.	37
Figure P2.1. Structures des analogues après la réaction d'alkylation du miconazole.....	49
Figure P2.2 Structures des différents sels d'imidazolium et de pyridinium.....	50
Figure P2.3 Structures des différents sels d'imidazolium et d'ammonium	50
Figure 2.1. Formation, maturation, and dispersion of bacterial biofilms.....	55
Figure 2.2. Synthesis of alkylmiconazolium salts.....	56
Figure 2.3. <i>S. aureus</i> biofilms labeled with Live/Dead stains after a 24 h incubation in growth medium (LB broth). (a) Negative control (DMSO). (b) Positive control (70% ethanol). (c) Miconazole (2.4) at 50 μM. (d) Miconazoctylium bromide (2.5c) at 50 μM. (e) Miconazoctylium bromide (2.5c) at 25 μM. (f) Miconazoctylium bromide (2.5c) at 12.5 μM.....	58
Figure 2.4. <i>MRSA</i> biofilms labeled with Live/Dead stains after a 48 h incubation in growth medium (LB broth). (a) Negative control (DMSO). (b) Positive control (70% ethanol). (c) Miconazoctylium bromide (2.5c) at 25 μM. (d) Miconazoctylium bromide. (2.5c) at 12.5 μM.....	60
Figure 2.5. Pre-formed <i>MRSA</i> biofilms treated with 50 μM antimicrobials in 0.9% NaCl. (a) Negative control (DMSO only, after 24 h). (b) Miconazole (2.4) (after 24 h). (c) Miconazoctylium bromide (2.5c) (after 5 min). (d) Miconazole (2.4) (after 48 h).....	60
Figure 2.6. Preformed <i>S. aureus</i> biofilms treated with different concentrations of miconazoctylium bromide (2.5c) over 24 h monitored in 0.9% NaCl solution. (a) Negative control	

(DMSO only, after 24 h). (b) Positive control (70% ethanol). (c) 25 μM ($1/2 \times \text{MIC}$ after 5 min). (d) 12 μM ($1/4 \times \text{MIC}$ after 30 min). (e) 6 μM ($1/8 \times \text{MIC}$ after 6 h). (f) 3 μM ($1/16 \times \text{MIC}$ after 24 h). ... 61

Figure 2.7. Red blood cells hemolysis of compound (**2.5c**) and miconazole (**2.4**). 63

Figure 3.1. Structure of benzimidazolium salts previously reported (**3.1**, **3.2** and **3.3**) and newly studied (**3.4–3.6a–c**)..... 73

Figure 3.3. Mature *MRSA* biofilms treated with different concentrations of **3.4a** for 24 h in 0.9 % NaCl solution labeled with (A) live/dead cell staining and (B) crystal violet. (A) Live/dead cell staining of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (f) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC), (g) 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and (h) 1.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of **3.4a**. (B) Larger pictures of crystal violet assay of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (f) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC) of **3.4a**. 77

Figure 3.4. Mature *MRSA* biofilms treated with different concentrations of **3.5a** for 24 h in 0.9 % NaCl solution labeled with (A) live/dead cell staining and (B) crystal violet. (A) Live/Dead cell staining of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and (f) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC) of **3.5a**. (B) Crystal violet assay of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and (f) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC) of **3.5a**..... 78

Figure 4.1. Structure of different generation benzimidazolium salts..... 88

Figure 4.2. Synthesis of second and third generation analogues..... 90

Figure 4.3. (top) *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after a 12 h incubation at the MIC concentration of the generation II antimicrobials. 1a) Negative control (DMSO); 1b) Compound **4.6** (PEB); 1c) Compound **4.11** (4-Bromo); 1d) Compound **4.14** (4-*tert*-butyl); 1e) Compound **4.21** (octyl); (bottom) SEM images of *MRSA* biofilms after a 12h incubation with MIC concentration of the antimicrobials. 2a) Negative control (DMSO); 2b) Compound **4.6**; 2c) Compound **4.11**; 2d) Compound **4.14**; 2e) Compound **4.21**. 92

Figure 4.4. (top) *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after a 12 h incubation with MIC concentration of the antimicrobials. 1a) Negative control (DMSO); 1b) Compound **4.34**; 1c) Compound **4.39**; 1d) Compound **4.42**; (bottom) SEM images of *MRSA* biofilms after a 12h

incubation with MIC concentration of the antimicrobials. 2a) Negative control (DMSO); 2b) Compound 4.34 ; 2c) Compound 4.39 ; 2d) Compound 4.42	94
Figure 4.5. Antibiofilm activity of studied compounds. Compared to commercially available BAC, all the benzimidazolium salts possess the ability to prevent the formation and disrupt mature biofilms. The dotted line represents the 25-fold selectivity towards <i>MRSA</i> bacteria compared to HC ₅₀	95
Schéma 5.1. Structure du cation TBA utilisé comme agent de transfert de phase.....	103
Schéma 5.2. Structure de la béta-cyclodextrine et l'image d'une émulsion de Pickering à base d'eau, d'huile de paraffin et de cyclodextrine.....	104
Schéma 5.3. Illustration de la formation du complexe huile/ β CD dans un mélange eau/huile. Reproduite avec la permission (Leclercq and Nardello-Rataj, 2016 ^[11]). Copyright 2016, Elsevier.	105
Figure 5.1. Structure and abbreviation of compounds used in this work.....	109
Figure 5.2. Observations of β -CD/water/oil emulsions (10/45/45 wt.%, 3,200 rpm, 90s, 25 °C) using optical microscope (A) and WETSEM (B) and of β -CD/oil complexes using dry SEM (C). The inset shows the X-ray powder diffraction patterns of dry powders (D).	114
Figure 5.3. Ternary phase diagrams of the oil/water emulsion stabilized by β -CD at 25 °C. The composition is represented in weight fractions (3,200 rpm, 90s, 25 °C).....	116
Figure 5.4. Backscattering (Δ BS) versus sample height and time at 25 °C (A) and shear viscosity as a function of shear rate (B) for β -CD/water/oil emulsions (10/45/45 wt.%, 3,200 rpm, 90s)....	117
Figure 5.5. Zone of inhibition obtained by the diffusion method against <i>MRSA</i> , <i>E. coli</i> and <i>C. albicans</i> of the β -CD/water/oil emulsions compared to the commercial cream (Monistat Derm™; see the experimental section for more information).	119
Figure 5.6. Normalized biocidal factor (BF) against <i>MRSA</i> , <i>E. coli</i> and <i>C. albicans</i> for β -CD/water/oil emulsions (oil = carvacrol, C, or terpinen-4-ol, T) combined with [HMC][NO ₃] (2) or [C ₈ MC][Br] (3).	121
Figure 5.7. Pre-formed <i>MRSA</i> biofilms (<i>Live/Dead</i> stains) treated with 1 μ L of β -CD/water/oil emulsions (oil = paraffin, P, carvacrol, C, or terpinen-4-ol, T) without (1) or with [HMC][NO ₃] (2) or with [C ₈ MC][Br] (3) after incubation. Negative control (DMSO only). Positive controls (EtOH	

70% and aqueous solution of [C ₈ MC][Br] 1 wt.%; see the experimental section for more information).....	122
Figure 6.1 Structure des différents bromures de miconazolium.....	128
Figure 6.2. Structure des antibiotiques commerciaux le clotrimazole et le kétoconazole.....	129
Figure 6.3 Structure des différents analogues de sel de lutidine-bis-benzimidazolium.....	130
Figure 6.4. Structures des différents analogues de la nouvelle librairie d'antibiotique.....	130
Figure A1.1. Fluorescence intensity of compound (2.5c), miconazole (2.4), and BAC relative to <i>tert</i> -butyl hydroperoxide (100%) and DMSO (0%) in different cell lines (OD _{600nm} = 0.1). Note: ROS production was not calculated for <i>E. coli</i> (MG1655) since a very low intensity was observed with positive-control. All cell lines were tested with unstained cells for autofluorescence. <i>S. aureus</i> ATCC 43300 and <i>E. coli</i> SK037.....	VIII
Figure A1.2. Membrane permeabilization induced by miconazole (2.4) at different concentrations. Assay performed with a bacterial population of 2.2×10^7 CFU mL ⁻¹ (OD _{600nm} = 0.1).....	IX
Figure A1.3. Membrane permeabilization induced by miconazoctylum bromide (2.5c) at different concentrations close to the MIC value. Assay performed with a bacterial population of 2.2×10^7 CFU mL ⁻¹ (OD _{600nm} = 0.1).	X
Figure A1.4. Dose–response relationship between the concentration of (2.5c) and the ONPG hydrolysis rate for a bacterial population of 2.2×10^7 CFU mL ⁻¹ (OD _{600nm} = 0.1).....	X
Figure A1.5. <i>S. aureus</i> biofilms were labeled with Live/Dead stains after 12 h incubation in growth medium (LB broth) with a solution at 50 μM antimicrobials. (a) Negative control (LB only). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) Miconazole (2.4). (d) Miconazoctylum bromide (2.5c) e) 50 μM BAC	XI
Figure A1.6. Preformed <i>S. aureus</i> biofilms treated with different concentration of BAC over 24 h monitored in 0.9 % NaCl solution. (a) Negative control (DMSO only, after 24 h). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) 330 μM (MIC after 5 min). (d) 165 μM (1/2 x MIC after 5 min). (e) 83 μM (1/4x MIC after 1 h). (f) 41 μM (1/8x MIC after 24 h). (g) 20 μM (1/8x MIC after 24 h).....	XII
Figure A2.1. Synthesis of 3.4a-c . Reagents and conditions: (i) Octylbromide, MeCN, 110 °C, MW, 82%; (ii) LiOTf, MeOH, 95%; (iii) LiNTf ₂ , MeOH, 95%.	XXI

Figure A2.2. Synthesis of 3.5a-c . Reagents and conditions: (i) Bromoadamantane, MeCN, 70 °C, 86% (ii) LiOTf, MeOH, 95%; (iii) LiNTf ₂ , MeOH, 95%.....	XXII
Figure A2.3. Synthesis of (3.7). Reagents and conditions: (i) Bromoacetyl bromide, K ₂ CO ₃ , CH ₂ Cl ₂ , 88%.....	XXII
Figure A2.4. Synthesis of 3.6a-c . Reagents and conditions: (i) (7), pyridine, acetone, reflux, 53%. (ii) LiOTf, MeOH, 95%; (iii) LiNTf ₂ , MeOH, 95%.....	XXIII
Figure A2.5. MRSA biofilms labeled with Live/Dead stains after a 24 h incubation in growth medium with 50 µg mL ⁻¹ antimicrobial. (a) Negative control (DMSO 10%). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) 3.3a-c , 50 µg mL ⁻¹ = 20xMIC.....	XXXII
Figure A2.6. Preformed MRSA biofilms treated with different concentrations of 3.4a after 24 h monitored in 0.9 % NaCl solution. Crystal violet assay (right) (a) Negative control (DMSO only). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) 50 µg/mL. (d) 20 µg/mL. (e) 10 µg/mL. (f) 5 µg/mL (MIC). (g) 2.5 µg/mL. (h) 1.25 µg/mL.....	XXXIII
Figure A2.7. Size (radius) of the aggregates formed by 3.4a at different concentrations.	XXXIV
Figure A2.8. Red blood cells hemolysis of compound 3.3a , 3.3b , and 3.3c	XXXV
Figure A2.9. Red blood cells hemolysis of compound 3.4a , 3.4b , and 3.4c	XXXVI
Figure A2.10. Red blood cells hemolysis of compound 3.5a , 3.5b , and 3.5c	XXXVII
Figure A4.1. Microphotographs of oil/water emulsion (weight ratio: 1/1) stabilized with β-CD (10 wt. %) observed under: transmitted light illumination (A), reflected oblique light illumination (B) and 3D surface plot interpretation (C).	LXXXVI
Figure A4.2. Microphotographs of terpinen-4-ol/water emulsion (weight ratio: 1/1) stabilized with β-CD (10 wt. %) observed under: transmitted light illumination (A) reflected oblique light illumination (B) and 3D surface plot interpretation (C).	LXXXVII
Figure A4.3. DSC of the dry powders compared to the free β-CD.....	LXXXVII

Liste des sigles et abréviations

β CD : béta-cyclodextrine

°C : degré Celsius

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPs : peptides antimicrobiens

ARN : acide ribonucléique

aq. : aqueux

Ar : aromatique

atm : atmosphere

BAC : chlorure de benzalkonium

Bn : benzyle

Boc : tert-butyloxycarbonyle

Bu : butyle

c : concentration en g/mL

cat. : catalytique

CCM : chromatographie sur couche mince

CI₅₀ : concentration inhibitrice à 50%

CMI : concentration minimale inhibitrice

DCE : 1,2-dichloroéthane

DCM : dichloromethane

DIBAL : hydrure de diisobutylaluminium

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

DMP : périodine de Dess-Martin

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

DTT : dichlorodiphényltrichloroéthane

ESI : ionisation par électronébuliseur

Et : éthyle

g : gramme

GRH : globules rouges humains

h : heure

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HRMS : spectre de masse haute résolution

Hz : Hertz

Im : imidazole

IR : infrarouge

J : constante de couplage

L : litre

LG : groupe partant

LRMS : spectre de masse basse résolution

M : molaire

Me : méthyle

MED : microscopie à balayage électronique

mg : milligramme

MHz : megahertz

min. : minute

mL : millilitre

mmol : millimole

MRSA : methicilin resistant *staphylococcus aureus*

Ms : mésyle

N : normalité

NAG : N-acétyl-glucosamine

NAM : acide N-acétyl-muramique

OMS : organisation monidale de la santé

O/W : huile/eau

PEB : phényléthynylbenzyl

PG : groupe protecteur

Ph : phényle

Ppm : partie par million

PQ : paraquat

py : pyridine

QAC : “quaternary ammonium coumpound”

quant. : quantitative

QS : quorum sensing

R : alkyle

rdt : rendement

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : espèces réactives de l'oxygène

sat. : saturée

SEP : substance extracellulaire polymérique

T : temperature

t.p. : temperature pièce

TBA : tetra-n-butylammonium

Tf : triflyle

THF tétrahydrofurane

TLC : "thin layer chromatography"

TMS : tétraméthylsilane

Ts : tosyle

UV : ultraviolet

δ : déplacement chimique

μL : microlitre

À ma famille et mes proches

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Andreea de m'avoir accueilli à bras ouverts dans son groupe. Dès les premiers jours, j'ai senti qu'elle nous donnait toute la liberté que nous voulions autant dans les horaires de laboratoire que dans les idées de projets. Cette attitude m'a permis de devenir indépendant et de travailler de manière organisée et structurée. Notre facilité à communiquer a permis à Andreea de toujours être là pour moi dans les moments un peu plus difficiles. Elle sait comment nous remettre en confiance et nous remotiver lorsque la chimie ne va pas comme on veut. Je tiens également à la remercier pour les conférences que nous avons faites ensemble : un voyage à Toronto, une semaine à Québec et un voyage en Italie que je n'oublierai jamais. Andreea, ne change jamais et merci pour tout !

Je tiens ensuite à remercier mes parents qui m'ont supporté lors de mon retour aux études. Je sais que ce n'est pas facile pour des parents de voir leur enfant retourner à l'école à 26 ans et je tiens à les remercier pour le soutien qu'ils m'ont donné.

Je tiens également à remercier Lorena qui m'a supporté pendant 4 ans de doctorat avec mes horaires atypiques et mes sorties tardives après le labo. Nous avons passé des moments difficiles durant ce doctorat et je suis fier de dire que cela nous a rendus plus forts. Je t'aime de tout mon cœur.

Ensuite, je tiens à remercier Bianca... et Alex pour qu'il ne chiale pas... encore. Elle s'est portée volontaire pour lire ma thèse et corriger les multiples, et quand je dis multiple c'est peu dire, erreurs de français. Merci beaucoup!

J'aimerais remercier Jean-Philippe qui m'a tenu compagnie dans les labos de Zargarian durant une bonne partie de doctorat avant de me délaisser pour Sherbrooke. Tous ces petits cafés pris au Café-in en chialant sur la chimie! Inoubliable.

Ensuite, je tiens à dire un énorme merci à Julien qui fut mon seul collègue masculin durant une bonne partie du début de mon doctorat. Julien, si vous ne le connaissez pas, est assez intense lorsque l'on parle de chimie. Cette qualité nous a permis de devenir de bons amis et de discuter

longuement de nos projets. Je tiens à le remercier pour tout son savoir sur la biologie qu'il a partagé avec moi. Sans toi, mon chum, j'aurais galéré à faire tout ça !

Ensuite, une mention spéciale pour ma première stagiaire dans le groupe. Margaux est arrivée avec nous un jour de verglas, les lunettes embuées et pleine de bonne volonté. Avec son enthousiasme, nous avons complété, durant son stage de M2, un article qui se retrouve dans cette thèse. Même si à ce moment tu galérais pour analyser des RMN, je sais qu'aujourd'hui tu es une étudiante exemplaire et que notre groupe avance grâce à toi.

Je tiens à souligner l'appui de mes autres stagiaires durant mon doctorat qui m'ont permis d'avancer grandement dans mes projets. Amélie, Thibault, Célia et Maude, je vous remercie d'avoir travaillé de manière assidue et autonome durant vos stages. Plusieurs des articles courants ou à venir sont en grande partie grâce à vous.

Je ne peux faire des remerciements sans mentionner les *boys* actuels du groupe. Guillaume et Pierre sont arrivés il y a près d'un an et, avec leur enthousiasme, m'ont motivé à travailler plus fort. Bonne chance à vous deux, même si je sais très bien que tout ira bien durant votre doctorat!

Ensuite, je tiens à remercier Julie V. qui m'a suivi dans nos soirées à la maisonnée et qui, avec son sourire, avait souvent le moyen de nous remonter le moral. Nous avons passé un voyage magnifique grâce à son organisation et ses suggestions de restaurants en Italie. Merci Juju.

Je tiens également à remercier Claude qui fut un collègue exceptionnel lors de mon passage à Brébeuf. Tous les cafés le matin et les soupes *viet* que nous avons pris ensemble sont des souvenirs chers pour moi. Même si tu as l'âge de mon père, dans ton cœur tu as 30 ans et c'est pour ça qu'on s'entend bien!

Je tiens à remercier Joëlle qui nous a toujours accueillis à bras ouverts dans ses laboratoires et qui nous a apporté beaucoup de soutien dans nos expériences de biologie. Je tiens aussi à remercier le professeur K. Wilkinson pour l'accès à ses laboratoires pour les biofilms.

Finalement, je tiens à remercier tous les membres du groupe avec qui j'ai passé des moments mémorables soit dans les sofas ou durant les fameux BBQ d'Andreea. Julie K., Solène, Marc, Philippe, Audrey, Samy, Julien D. et Thierry. Aussi, je voudrais remercier les gens des Collins qui partagent le corridor avec nous. Plus particulièrement Antoine qui, lorsque je disais *bière* dans les corridors, était toujours partant pour me suivre dans mes folies.

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1 Découverte des pénicillines et leurs utilisations

Les bactéries multirésistantes ou pathogéniques sont un problème bien connu que de nombreux scientifiques considèrent comme étant la prochaine crise épidémique mondiale.^[1] La découverte de la pénicilline par Fleming en 1929, un antibiotique bêta-lactamine provenant d'une souche bactérienne de *staphylocoque*, qui agit comme inhibiteur de la synthèse des protéines membranaires, nous a permis de mieux gérer les infections et ainsi de sauver des millions de vies.^[2]

Depuis l'introduction de cet antibiotique dans le milieu pharmaceutique, nous avons été non seulement en mesure de traiter des infections graves, mais également de diminuer de manière significative le taux de mortalité dans les pays développés et sous-développés. Dans le tiers monde, un accès minimal aux soins de santé et un environnement sanitaire déficient font en sorte que l'utilisation des antibiotiques est une solution à faible coût parfaite à ces problèmes.^[3]

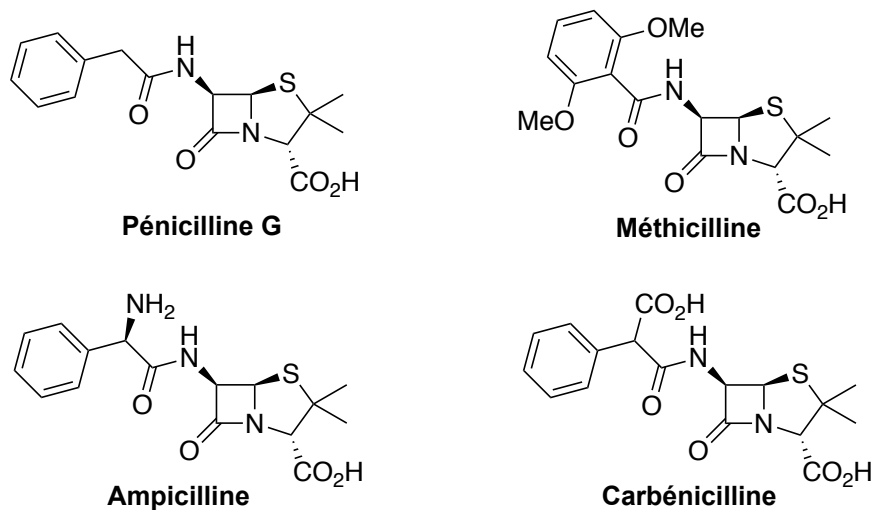


Figure 1.1. Structures des différentes générations d'antibiotique bêta-lactames.

Cette grande découverte a mené des milliers de scientifiques vers ce domaine de recherche que nous connaissons aujourd'hui comme « l'âge d'or des antibiotiques ». En peu de temps, de nombreux antibiotiques ont été découverts.

Les tétracyclines ont été introduites peu de temps après la découverte de la pénicilline sous forme d'antibiotiques à large spectre agissant comme inhibiteurs de la synthèse des protéines et pouvant être directement isolées de la souche bactérienne *Streptomyces*. De nouvelles générations d'antibiotiques (**Figure 1.1**) bêta-lactames ont été introduites plus tard, comme la méthicilline (2ème génération), l'ampicilline (3ème génération) et la carbénicilline (4ème génération).^[4]

La plupart de ces antibiotiques nouvellement trouvés ont le même mécanisme d'action que la pénicilline, ce qui a rapidement entraîné une augmentation de la résistance bactérienne contre ces médicaments.^[5] Il a fallu plus de 20 ans après la découverte de la pénicilline pour découvrir une souche de bactéries résistantes à celle-ci, mais seulement 2 ans pour observer l'apparition de la souche résistante à la méthicilline.^[6] Ces résistances nous obligent à utiliser des doses de plus en plus élevées d'agents antibactériens et à développer de nouvelles molécules, ce qui entraîne des coûts énormes.

Ces résistances sont également observées chez les insectes et les animaux.^[7] En effet, un autre exemple est celui du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT, **figure 1.2**), cet insecticide puissant découvert en 1939 par Paul Hermann Muller qui lui valut le prix Nobel en 1948.^[8] Dix ans après sa découverte, des résistances chez certaines espèces d'insectes étaient déjà observées et, pas moins de cinquante ans plus tard, 500 espèces d'insectes montraient une résistance à cet insecticide.^[9]

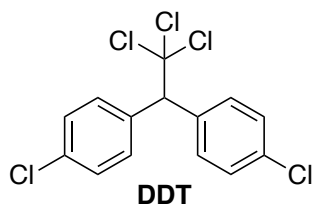


Figure 1.2. Structure du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT).

1.2 Facteurs influençant le développement de la résistance bactérienne

De nombreux facteurs peuvent expliquer cette adaptation bactérienne rapide aux antibiotiques nouvellement trouvés. La surutilisation ou la surexposition d'un certain médicament à la fois dans le domaine de la santé et de l'agriculture, en particulier dans l'administration d'antibiotiques au bétail, est le premier facteur.^[10]

Ceci est particulièrement important lorsque l'on examine la résistance bactérienne, car l'approche typique pour traiter une épidémie chez l'animal était de donner à tout le troupeau la même quantité d'antibiotique pour limiter la propagation de l'infection.^[11] Cette méthode qui a été longtemps utilisée pour sauver les troupeaux est désormais interdite. En effet, les grandes quantités d'antibiotiques administrées au bétail ne sont pas entièrement métabolisées par les animaux. L'excédent d'antibiotique est excrété du système animal via l'urine ou les matières fécales. Ces excréments, une fois en contact avec l'environnement, sont retrouvés dans les eaux de surface et/ou souterraines adjacentes à ces fermes.^[12] L'exposition prolongée d'une souche bactérienne à de faibles concentrations d'antibiotiques conduit généralement au développement d'une résistance à ceux-ci.^[13]

Un autre facteur qui conduit au développement des résistances bactériennes est le manque de réglementation et la prescription inappropriée d'un médicament.^[14] La structure moléculaire et la ressemblance du mécanisme d'inhibition de plusieurs antibiotiques de différentes générations jouent également sur le développement de la résistance bactérienne.^[15] Il existe de nombreuses façons pour un microorganisme de se protéger contre un stress externe, comme l'exposition aux antibiotiques, pour éviter la mort cellulaire. Pour ce faire, les bactéries peuvent modifier les sites de liaison du médicament, perméabiliser leur membrane, induire l'excrétion de l'antibiotique via l'activation des pompes à efflux ou détruire/métaboliser simplement l'antibiotique.^[16]

Ces mécanismes peuvent être utilisés par les bactéries individuellement ou en combinaison les uns avec les autres.^[17] Dans le cas de la pénicilline, les souches bactériennes qui avaient déjà été exposées aux premières générations d'antibiotiques ont très rapidement développé une résistance aux nouvelles générations d'antibiotiques.^[18]

Ces analogues, plus efficaces, possèdent tous un noyau bêta-lactame au sein de leur structure. Par conséquent, ces organismes se sont protégés très rapidement via la surexpression des bêta-lactamases, enzymes permettant le métabolisme/destruction de ces antibiotiques.^[18b] Tout bien considéré, la modification structurelle d'une famille d'antibiotiques est un moyen efficace et crucial de lutter contre les infections bactériennes de plus en plus puissantes. Cependant, cette stratégie présente de graves lacunes et doit être considérée comme une solution à court terme du à l'apparition très rapide de résistance tel que décrit précédemment.^[19]

1.3 Mécanisme d'action des antibiotiques

Afin de mieux comprendre les résistances bactériennes et pouvoir développer des outils pour les limiter, il faut s'attarder aux différents mécanismes d'action que peuvent utiliser les antibiotiques afin de tuer la bactérie. Ces différents mécanismes sont : l'inhibition de la synthèse D'ADN et D'ARN, l'inhibition de la synthèse protéique ou membranaire ainsi que la perméabilisation membranaire.^[20]

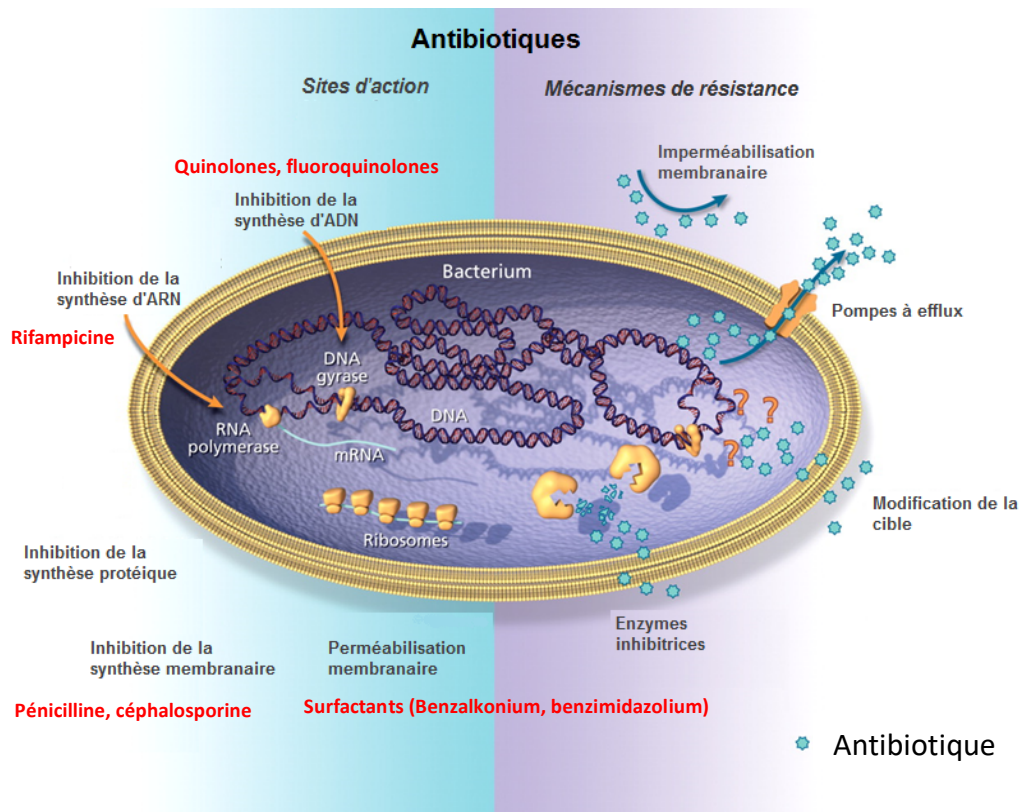


Figure 1.3. Mécanismes d'action des antibiotiques et mécanismes de résistance bactérienne.

1.3.1 Inhibition de la synthèse d'ADN

Lorsque l'on parle de ce mode d'action antibactérien, on ne peut s'empêcher de parler de la famille des quinolones et des fluoroquinolones.^[21] Ces classes d'antibactériens se différencient des autres classes de composés découvertes pendant la même période puisque celles-ci ont été synthétisées et non extraites d'un microorganisme. C'est en 1962, dans les laboratoires de George Y. Leshner, que la recherche sur des dérivés naphthyridines comme agents antibactériens a commencé.^[22] L'acide nalidixique (**Schéma 1.1**), obtenu par une synthèse en trois étapes à partir du dérivé 6-méthylpyridin-2-amine, a montré une activité antibactérienne contre une variété de microorganismes causant des maladies chez l'humain et les animaux.^[23] Une sélectivité contre les bactéries Gram-négatives a également été observée lors des tests *in-vivo*.

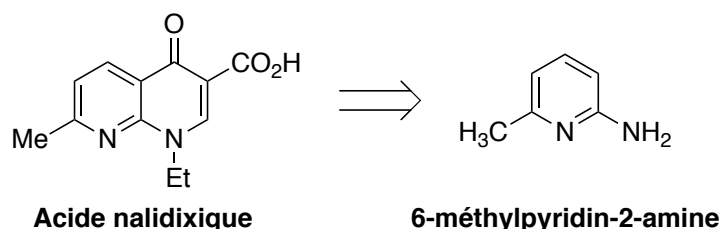


Schéma 1.1. Rétrosynthèse de l'acide nalidixique à partir du dérivé 6-méthylpyridin-2-amine.

Au vu des résultats de cette étude, plusieurs scientifiques se sont penchés par la suite sur l'étude du mécanisme d'action de ce composé afin de mieux comprendre son activité antibactérienne. En 1976, un autre groupe de recherche a remarqué que l'acide nalidixique causait une accumulation de simples brins d'ADN.^[23] Quelques années plus tard, les chercheurs ont identifié une enzyme qui entaillait l'ADN chromosomique à double brin, et l'ont appelée « ADN gyrase » ou « topoisomérase II ».^[24] Cette enzyme est présente autant dans les cellules procaryotes que eucaryotes. Toutefois, les quinolones sont très spécifiques à la topoisomérase II présente dans les bactéries. Dans les années qui suivent, plusieurs nouvelles générations d'antibiotiques appartenant à cette famille ont été synthétisées afin d'en améliorer leur activité en ciblant un autre domaine de l'ADN gyrase : la topoisomérase IV.

Plusieurs modifications ont été effectuées dans la structure de la molécule, mais on retient trois changements qui affectent grandement l'activité antibactérienne, comme dans le cas de la ciprofloxacine (**Figure 1.4**) : l'addition d'un fluor (**bleu**), l'addition d'un groupement pipérazine (**vert**) et l'ajout d'un cyclopropane (**rouge**).^[25]

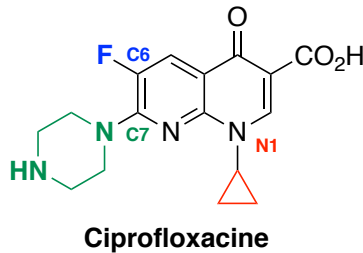


Figure 1.4. Structure de l'antibiotique de deuxième génération ciprofloxacine.

L'ajout d'un atome de fluor en position C6 augmente l'activité inhibitrice de l'ADN gyrase, facilite la pénétration dans la bactérie et fournit une activité contre les staphylocoques, une bactérie à Gram-positif. L'ajout d'un groupement pipérazine en position C7 a conduit à l'obtention d'une meilleure activité contre les bactéries à Gram-négatif et à une meilleure activité contre les bactéries à Gram-positif. Finalement, l'ajout d'un groupement cyclopropane en position N1 a conduit à une meilleure activité antibactérienne contre les pathogènes Gram-positifs et Gram-négatifs.^[26]

L'utilisation excessive de ces antibiotiques à large spectre a donné lieu à une mutation au niveau de l'ADN gyrase dans les bactéries.^[27] Ces mutations se produisent principalement dans les gènes de la topoisomérase II et IV pour donner une bactérie très résistante. De plus, il existe des gènes qui influencent l'absorption du médicament dans les bactéries et la surexpression de pompes à efflux conduit à l'augmentation de l'excrétion des quinolones.^[28]

1.3.2 Inhibition de la synthèse d'ARN

La rifampicine (**Figure 1.5**) est un antibiotique qui inhibe fortement l'ARN polymérase et bloque la synthèse d'ARN chez les bactéries à Gram-négatif *Escherichia coli* (*E. coli*) et Gram-positif *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Celui-ci agit en se liant à l'ARN polymérase (ARNP), un complexe enzymatique responsable de la transcription de l'ADN en ARN.^[29]

Des études ont montré que cet antibiotique se lie à la poche de la sous-unité bêta de l'ARNP dans le canal ADN/ARN, mais loin du site actif. Le mécanisme d'action ainsi que les fortes interactions sont apportés par les groupements hydroxyles de la molécule (rouge) qui forment des liaisons hydrogène avec des résidus d'acides aminés de la protéine.^[30]

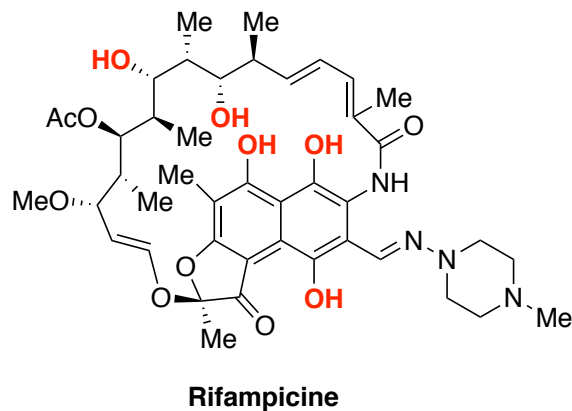


Figure 1.5. Structure de l'antibiotique rifampicine.

Comme mentionné précédemment, les antibiotiques qui ciblent une protéine spécifique sont sujets au développement de la résistance bactérienne. En effet, les bactéries ont la capacité de muter le récepteur ciblé afin de se défendre contre ces antibiotiques. Dans le cas de la rifampicine, c'est la mutation d'un gène qui encode pour la sous-unité bêta de l'ARNP qui diminue drastiquement l'activité antibactérienne de cet antibiotique.

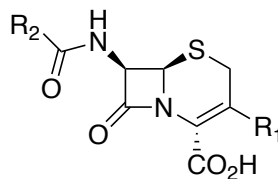
Cette mutation a apporté une modification du site de reconnaissance de la rifampicine, ce qui a diminué la capacité de former des ponts-hydrogènes avec la protéine et a entraîné une diminution de son activité.^[31] Afin de diminuer l'apparition de cette résistance, la rifampicine est souvent administrée en combinaison avec d'autres antibiotiques.^[32] Néanmoins, le développement de résistance a grandement affecté l'utilisation de cet antibiotique.

1.3.3 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

Une bactérie est composée d'une paroi cellulaire que l'on appelle également membrane plasmique ou cellulaire. Elle agit comme barrière entre le milieu extérieur de la cellule et le milieu intérieur de celle-ci et régit le transfert entre ces deux milieux.^[33] Elle est principalement constituée d'une bicouche lipidique qui se forme par auto-assemblage et qui contient majoritairement des phospholipides et parfois du cholestérol.^[34] Elle comprend également des lipides, des glucides et des protéines qui se modifient constamment, dépendamment des changements extérieurs que subit la cellule.

En d'autres mots, la cellule s'adapte aux différents stimuli extérieurs et permet de moduler sa fluidité.^[35] Étant donné la grande importance de cette paroi, plusieurs chercheurs se sont intéressés à des antibactériens qui peuvent inhiber ou interrompre la synthèse de la membrane cellulaire.

Comme mentionné précédemment, les pénicillines sont des antibiotiques à large spectre agissant comme inhibiteurs de la synthèse des protéines membranaires.^[18b] Les pénicillines agissent en bloquant la synthèse de la transpeptidase, une enzyme bactérienne responsable de la réticulation du peptidoglycane agissant sur la rigidité des membranes.^[36] Les bactéries qui se trouvent en phase de croissance ou de multiplication sont alors affaiblies, ce qui conduit à l'apoptose cellulaire. Nous savons désormais que les bactéries utilisent la surexpression des bêta-lactamases permettant le métabolisme/destruction de ces antibiotiques en limitant leur utilisation.^[37]



Céphalosporine

Figure 1.6. Structure générale des céphalosporines.

Les céphalosporines (**Figure 1.6**), découvertes en 1945, sont également reconnues pour inhiber la formation de la membrane cellulaire par inhibition de la transpeptidase.

Même si ces antibiotiques ont la caractéristique d'être moins reconnus par les bêta-lactamases que les pénicillines, de nombreuses souches bactériennes résistantes à ces antibiotiques ont été découvertes. Ce phénomène s'explique par la similitude structurale de ceux-ci (contenant le noyau bêta-lactame).

La vancomycine est une molécule qui a été isolée en 1953 des échantillons de sol. On utilisait cet antibiotique surtout pour traiter des infections au *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), une bactérie à Gram-positif qui est résistante à la pénicilline.^[38] Toutefois, lors de sa découverte, la vancomycine n'était jamais utilisée en premier recours puisqu'elle possède une très faible biodisponibilité orale. Des antibiotiques, comme la méthicilline (**Figure 1.7**), sont très adéquats contre les infections non résistantes au *S. aureus*, mais on a observé une toxicité accrue de ce composé au niveau des reins et de l'oreille interne, toxicité provenant d'une impureté et non de la molécule elle-même.

Cet antibiotique agit en inhibant la synthèse de la membrane cellulaire chez les bactéries Gram-positives. La vancomycine n'est pas active sur les bactéries Gram-négatives. Cette espèce de bactérie possède deux membranes cellulaires, une interne et une externe, et c'est l'incapacité de pénétrer la membrane externe qui rend cet antibiotique inactif dans ce type de bactéries.^[39]

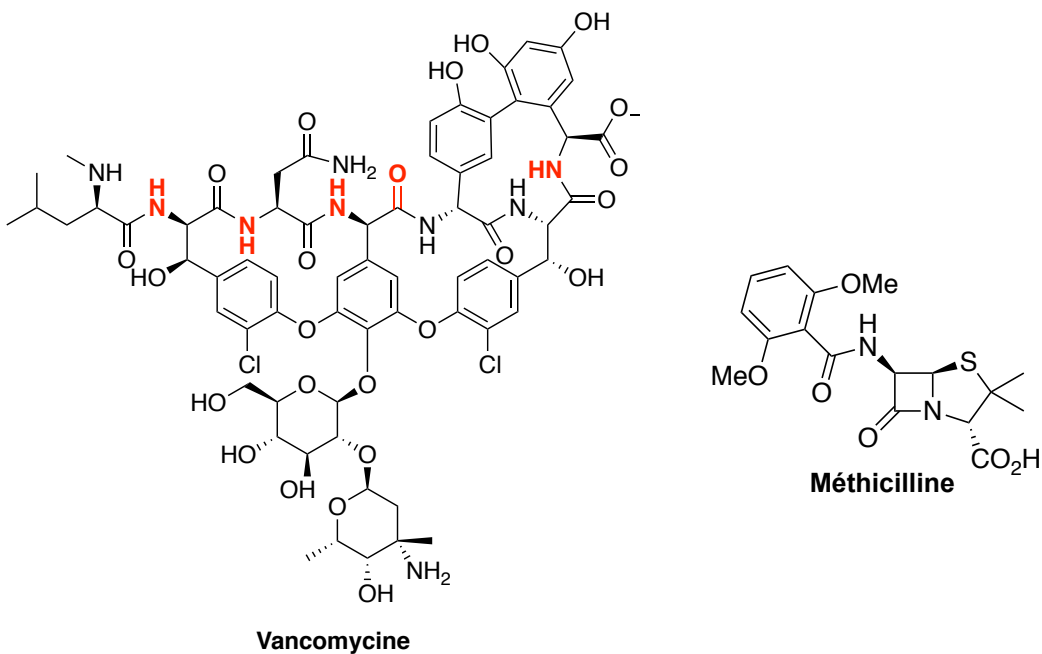


Figure 1.7 Structure de la vancomycine et de la méthicilline.

La vancomycine est très hydrophile et est capable de former des liaisons hydrogènes (**Figure 1.7, rouge**) avec les fragments terminaux D-alanyl-D-alanine du peptide liant les unités N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM). En se liant, elle empêche la synthèse du peptidoglycane, une composante essentielle des membranes cellulaires qui est principalement formée des unités NAG-NAM. Cette inhibition résulte l'affaiblissement des membranes bactériennes, ce qui mène éventuellement à la mort des cellules.

1.3.4 Inhibition bactérienne via la perméabilisation membranaire

Il est important de parler de la vancomycine, puisque même si certaines souches bactériennes ont développé des résistances à cet antibiotique, la majorité des infections se traitent encore de nos jours avec cet antibiotique. En effet, n'étant utilisée qu'en dernier recours, la vancomycine n'a pas été exposée au grand public comme c'est le cas des pénicillines. De ce fait, très peu de résistances sont observées, ce qui fait de la vancomycine une très bonne référence lorsque l'on parle d'infection bactérienne à Gram-positif.^[40]

Les infections persistantes impliquent des bactéries à croissance lente ou non croissante, qui sont difficiles à traiter avec des antibiotiques qui ciblent les processus de biosynthèse présents dans les cellules en croissance. Cette problématique s'applique à tous les mécanismes d'action que nous avons présentés auparavant.^[41] En effet, si on prend comme exemple l'inhibition de la synthèse de la membrane bactérienne, ce processus d'inhibition a lieu au niveau de la croissance bactérienne. Toutefois, les bactéries ont la capacité de se mettre en dormance, c'est-à-dire un état dans lequel la croissance et le développement sont temporairement arrêtés.^[42] Ces bactéries sont en mode conservation d'énergie et sont donc très difficiles à cibler avec les processus d'inhibition classiques que nous avons décrits auparavant.^[43]

Une stratégie pour cibler autant les bactéries en croissance que celle en dormance est de perturber ou de perméabiliser leurs membranes.^[44] Les antimicrobiens endommageant la membrane sont généralement de nature lipophile et interagissent directement avec la bicouche membranaire, perturbant sa fonction (ou ses fonctions) et son intégrité physique.^[45] Le fait de cibler directement la membrane fait abstraction de l'état dans lequel la bactérie se retrouve dans l'organisme.

Récemment, l'efficacité de la perturbation ou de la fragilisation de la membrane bactérienne a été démontrée pour la daptomycine, un lipopeptide antibactérien.^[46] Cet antibiotique est généralement utilisé cliniquement pour traiter les infections au *S. aureus*.

Lorsque l'on parle d'infection bactérienne, il est important de parler des infections au *S. aureus*, mais plus précisément des souches résistantes à la méthicilline (*MRSA*). Cette bactérie possède une capacité impressionnante d'adaptation à plusieurs antibiotiques connus et est rapidement devenue un danger dans les milieux hospitaliers.^[47] En plus d'avoir la capacité de développer des résistances sous leur forme planctonique, les *MRSA* ont la capacité de se protéger dans une matrice pour former ce que l'on appelle des biofilms.^[6] Ce mécanisme de défense sera détaillé plus loin dans la thèse. Les infections par les biofilms et la tuberculose sont deux exemples majeurs de besoins cliniques non satisfaits dus à des bactéries à croissance lente ou dormante et donc difficiles à traiter.^[48]

Les agents qui visent spécifiquement à perturber la membrane s'y insèrent et la déstabilisent (**Figure 1.8**).^[44] Pour ce faire, ces composés peuvent soit former des agrégats dans la membrane, soit ouvrir des canaux au travers de la membrane et/ou former des micelles.

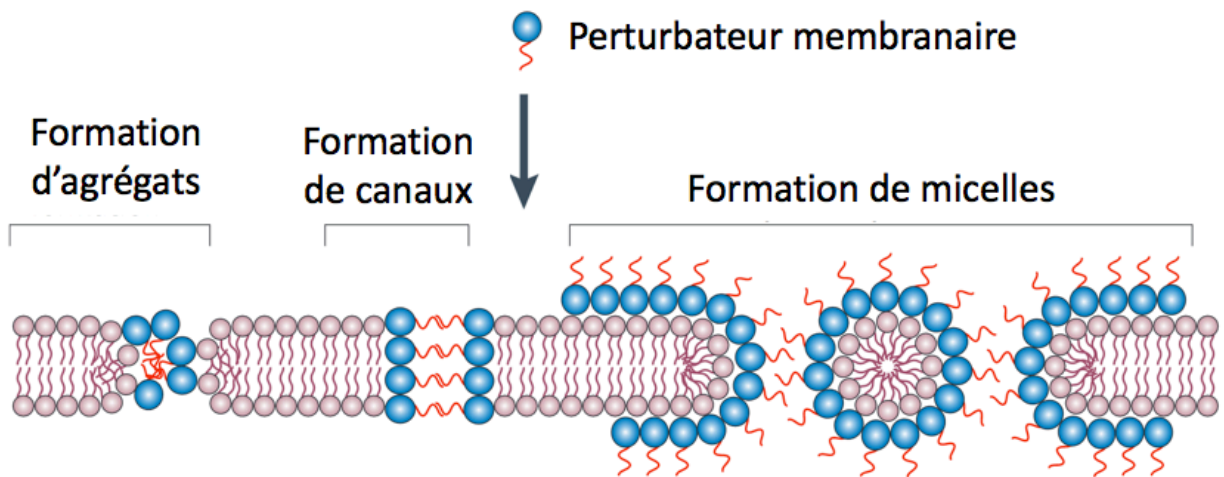


Figure 1.8. Mécanisme d'action des agents perturbateurs de la membrane. Copyright 2011, avec la permission de Macmillan Publishers Limited.^[49]

Les mécanismes de perméabilisation membranaire sont généralement rapides, ce qui limite le développement de résistance chez les bactéries. Par exemple, une résistance à la daptomycine, qui agit comme agent perturbateur membranaire, a été détectée peu de temps après son introduction clinique, mais les souches résistantes à ce composé sont extrêmement rares. [46]

1.4 La membrane cellulaire : une cible de choix

1.4.1 La bicouche phospholipidique

Peu importe la nature de la cellule, elle possède une membrane externe composée d'une bicouche phospholipidique. [50] Cette bicouche est imperméable aux molécules hydrophiles, tel que les ions, ce qui permet aux bactéries de, par exemple, réguler le pH et la salinité de leur espace intracellulaire. [51] Les membranes biologiques sont principalement constituées de phospholipides qui représentent plus de la moitié de leur composition.

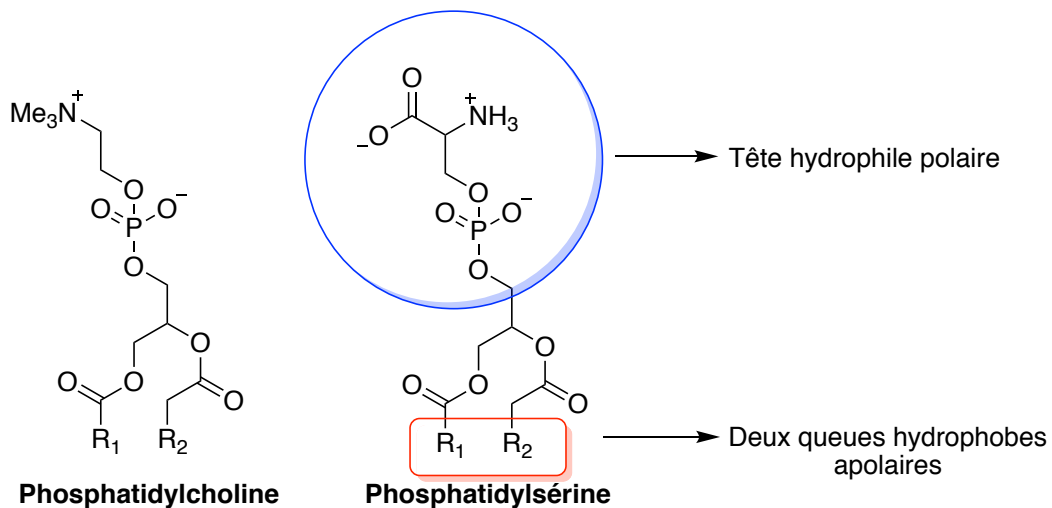


Figure 1.9. Exemple de deux phospholipides : la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine.

Les phospholipides sont composés d'une tête hydrophile chargée (**bleue**) et de deux queues hydrophobes, des longues chaînes carbonés aliphatiques, non chargées (**rouge**) (Figure 1.9). [52]

Dans le cas de la phosphatidylcholine, une molécule isolée à partir de la lécithine de jaune d'œuf, on dénote un groupement ammonium (NMe^+) et un groupement phosphate (PO_4^-) chargé, formant la tête polaire, ainsi que deux longues chaînes d'acide gras (R_1 et R_2), formant les queues hydrophobes. En solution aqueuse, les phospholipides s'auto-assemblent pour former des bicouches lipidiques, des liposomes ou des micelles (**Figure 1.10**).^[53]

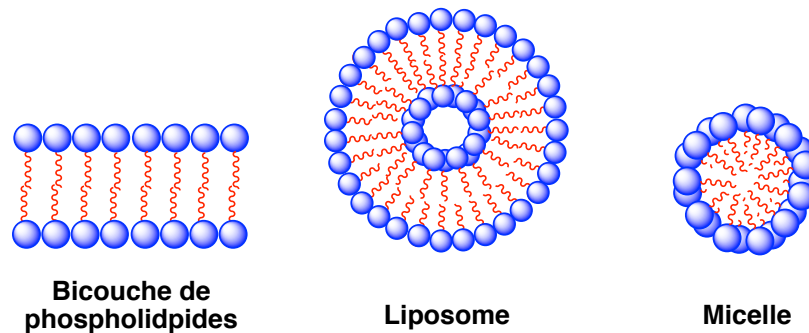


Figure 1.10. Représentation de l'auto-assemblage des phospholipides en solution aqueuse.

Lors de l'auto-assemblage, les têtes polaires sont orientées de façon à faire le plus d'interactions possible avec le milieu aqueux extérieur, laissant ainsi les chaînes aliphatiques hydrophobes former des interactions de van der Waals entre elles et limiter leurs contacts avec les molécules d'eau, phénomène que l'on appelle effet hydrophobe.^[54] Ces interactions stabilisantes sont au cœur de la formation des bicouches lipidiques.

1.4.2 La membrane bactérienne

Les bactéries sont des entités unicellulaires dépourvues de noyau et entourées d'une membrane. Le matériel génétique, tels que l'ADN, est dispersé dans le cytoplasme.^[55] Les organismes eucaryotes unicellulaires ou multicellulaires, tel que les cellules humaines, sont généralement plus grosses et possèdent un noyau interne entouré d'une membrane qui contient tout le matériel génétique. Plusieurs mécanismes d'action antibactérienne se basent sur cette différence majeure entre les cellules procaryotes et eucaryotes pour cibler les protéines ou l'ADN plus facilement accessibles chez les bactéries que chez l'humain. Il en résulte des composés plus efficaces contre les bactéries et peu toxiques pour l'être humain.^[56]

Lorsqu'on s'intéresse à développer de nouveaux agents destabilisateurs des membranes cellulaires, on doit également se pencher sur la composition des différentes membranes bactériennes, cette barrière qui leur confèrent une protection contre les éléments externes. Ces membranes diffèrent grandement d'une souche bactérienne à une autre (**Figure 1.11**).^[55]

Par exemple, les membranes des bactéries Gram-négatives (Gram⁻) sont constituées d'une couche phospholipidique externe et interne, entrelacée d'une monocouche de peptidoglycanes, alors que dans le cas des bactéries Gram-positives (Gram⁺), la bactérie est composée d'une seule membrane phospholipidique, surplombée d'une couche de peptidoglycanes plus épaisse que dans le cas des Gram-négatives.^[57] Il est donc, en théorie, plus facile de perturber et destabiliser la membrane des bactéries Gram⁺ telle que celle des bactéries *MRSA*. Malgré le fait que les bactéries Gram⁻ peuvent causer des infections graves, nous nous sommes concentrés, dans les travaux présentés dans cette thèse, sur l'inhibition de la prolifération des bactéries Gram⁺, et en particulier sur les *MRSA*.

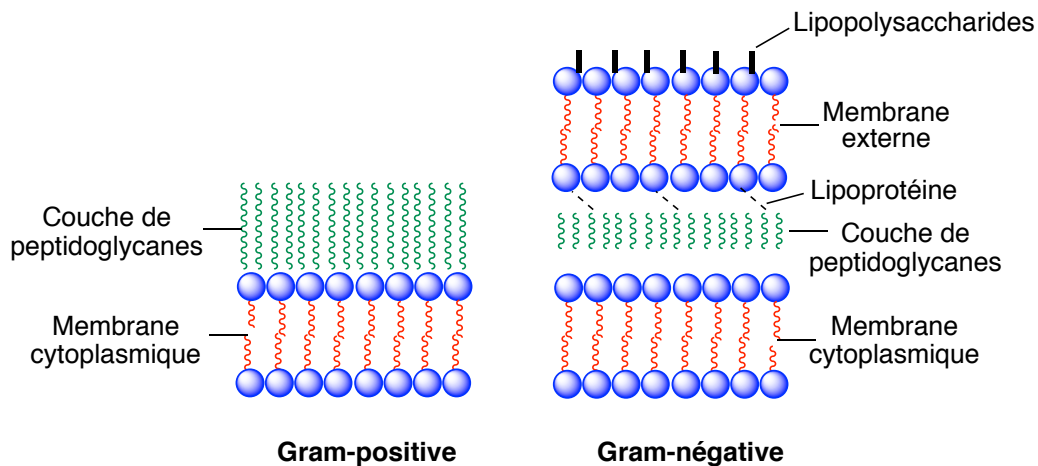


Figure 1.11. Structures des différentes membranes bactériennes.

1.4.3 La membrane bactérienne des *S. aureus*

La membrane de cette souche bactérienne Gram⁺ est très intéressante puisqu'elle possède des propriétés bien spécifiques.^[58] De par sa structure, la *S. aureus* est très résistante au lysosyme, une protéine qui est impliquée dans la défense contre les infections bactériennes.^[59]

Cette caractéristique est innée chez cette souche, ce qui lui confère une résistance naturelle contre notre système immunitaire. En plus de la bicouche lipidique, les membranes des bactéries Gram⁺ sont composées d'une couche de peptidoglycane qui contient de l'acide téichoïque (**Figure 1.12**).^[60]

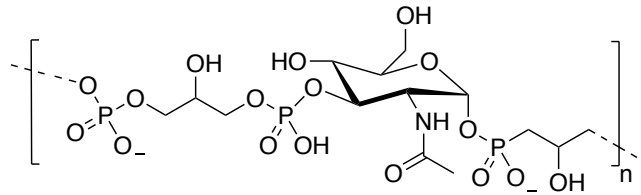


Figure 1.12. Structure de l'acide téichoïque.

L'acide téichoïque peut s'attacher fortement à la membrane en formant des liens covalents avec l'acide N-acétylmuramique des peptidoglycanes ou tout simplement on se liant à la membrane cytoplasmique avec une ancre lipidique. Par conséquent, la couche de peptidoglycane des bactéries Gram⁺ est plus épaisse que celle des Gram⁻ qui ne possèdent pas d'acide téichoïque.^[61] La fonction principale de cet acide est de fournir une rigidité accrue à la membrane en attirant et fixant des cations, tels que le sodium et le potassium, en formant des paires d'ions avec les anions phosphate (PO₄⁻). De ce fait, la membrane de *S. aureus* attirera fortement les composés cationiques, caractéristique que nous utiliserons à notre avantage lors de la conception des antibiotiques présentés dans cette thèse, afin de cibler cette membrane bactérienne.

1.5 Les levures, un organisme cellulaire semblable au nôtre

Les levures, ou champignons, sont des organismes unicellulaires qui se rapprochent plus des cellules humaines que les bactéries, puisque celles-ci sont des cellules eucaryotes.^[62] Dû à leur forme unicellulaire, les levures et leur génome sont souvent utilisés comme modèle des cellules humaines, permettant de comprendre des aspects fondamentaux du fonctionnement de nos cellules.^[63] En utilisant ce modèle simplifié, les travaux du Dr. Yoshinori Ohsumi sur le renouvellement cellulaire par autophagie se sont vus octroyer le prix Nobel de médecine en 2016.^[64] Dans un autre domaine, les travaux du Dr. Roger D. Kornberg sur le modèle moléculaire de la transcription chez les eucaryotes lui valut le prix Nobel de chimie en 2006.^[65]

Il n'existe pas moins de 1500 espèces de levures aux usages multiples, comme la fermentation dans la bière et le vin, ou pour la fabrication du pain.^[66] Toutefois, les mycoses ou infections fongiques (aux levures) causées par le *Candida albicans* (*C. albicans*) sont les plus fréquentes dans le monde.^[67] De plus, comme les souches de *MRSA*, les *C. albicans* sont reconnus pour se protéger des composés antifongiques en formant des biofilms.^[68] Une partie des travaux présentés dans cette thèse se penchera sur l'inhibition de cette souche et la possibilité d'empêcher la formation des biofilms.

1.5.1 La membrane des levures

Bien que les levures soient des organismes qui se rapprochent énormément des cellules humaines, leur membrane se rapproche plus de celle des bactéries Gram⁺. En effet, la membrane des levures est composée d'une bicouche phospholipidique surplombée d'une membrane externe.^[63] Cette dernière est principalement constituée de manoprotéines, de polysaccharides, des glucanes et de chitine (**Figure 1.13**). Ces composantes forment un réseau très organisé/rigide déterminant la forme et la taille de la cellule.^[69]

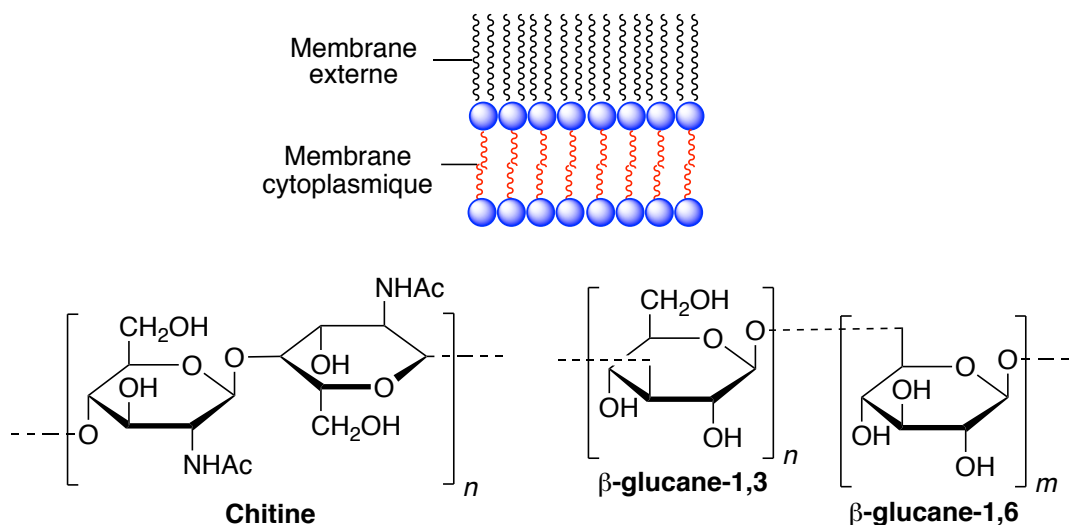


Figure 1.13. Structure de la membrane des levures (haut) et structure des différentes composantes de la membrane externe (bas).

Dans le cas des levures, la membrane externe subit une pression interne que l'on appelle pression de turgescence, supérieure à celle observée dans le cas des bactéries.^[70] Les perturbateurs ou interférents membranaires sont donc des candidats idéaux pour ce genre de microorganisme, puisqu'une fragilisation de la membrane mène généralement à une lyse cellulaire amplifiée par la pression de turgescence.^[71]

1.6 Détermination de l'activité antibactérienne

1.6.1 La concentration minimale inhibitrice

Afin de déterminer la capacité ou l'activité antimicrobienne des antibiotiques présentés dans cette thèse, on déterminera d'abord la concentration minimale inhibitrice (CMI).^[72] Cette concentration est définie comme étant la plus petite concentration d'un antibiotique qui inhibe la prolifération des bactéries. Afin de déterminer cette valeur, on prépare une solution mère de bactéries à partir de bactéries gardées en dormance à -80 degré Celsius que l'on met dans un bouillon stérile de nutriments. Cette solution aqueuse nutritive est généralement composée de tryptone, de levure nutritionnelle et de sel (NaCl).^[73] Une fois en contact avec ces nutriments, les bactéries se multiplient jusqu'à l'obtention de la concentration bactérienne désirée. Cette dernière est déterminée en mesurant l'absorbance de la solution à 600 nm, qu'on appelle également la densité optique (DO).^[74] Cette longueur d'onde est spécifiquement choisie pour les mesures de DO bactérienne, car contrairement aux longueurs d'onde UV, le 600 nm n'est pas nocif pour la bactérie. La concentration bactérienne est très importante puisqu'elle nous informe sur la nature des bactéries dans la solution.^[75] L'absorbance désirée se situe entre 0,1 et 0,2 afin d'obtenir des bactéries saines et en pleine croissance. En dessous de cette valeur, les bactéries sont en phase de latence (aucune multiplication ou très peu) et, au-dessus de cette valeur, les bactéries sont généralement en phase stationnaire ou bien elles sont tout simplement mortes.^[76]

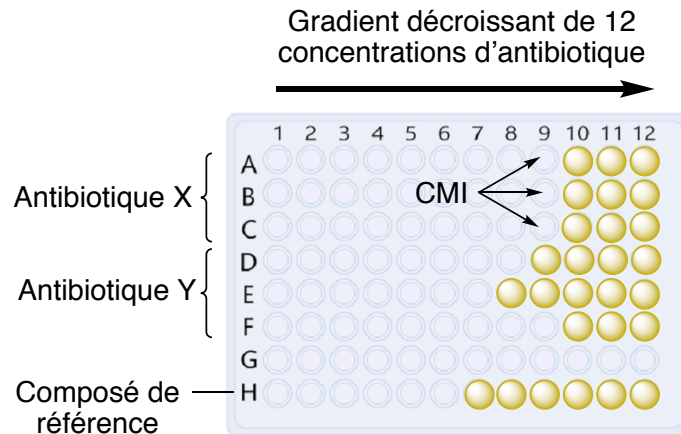


Figure 1.14. Représentation d'une plaque à 96 puits utilisée lors de la détermination de la CMI.

Une fois la solution mère préparée, on fait le mélange dans une plaque à 96 puits avec différentes concentrations d'antibiotique (**Figure 1.14**). Cette plaque est ensuite incubée à 37 °C pendant une période de 12 à 24 h. On utilise généralement trois rangées de puits par antibiotique, afin d'obtenir un triplicata sur chaque mesure, ce qui assure l'obtention d'une valeur précise et exacte de la CMI. Après 24 h, on analyse les plaques visuellement, ou par spectrométrie d'absorbance, afin de déterminer la CMI. Pour ce faire, on note simplement la concentration à laquelle les bactéries ont arrêté de proliférer. Une différence majeure d'absorbance est généralement visible entre les puits.

Pour chaque expérience de croissance bactérienne il faut vérifier sa validité. Dans l'exemple de la **figure 1.14**, l'antibiotique X donne une valeur de CMI reproductible, tandis que l'antibiotique Y donne des valeurs exactes, mais non précises. C'est un exemple où nous devons éliminer cette expérience et la refaire, afin d'obtenir un triplicata exact et précis pour l'antibiotique Y.

De même, il faut toujours s'assurer que les conditions d'expérimentation sont adéquates. Pour ce faire, on utilise trois tests qui nous permettent de confirmer l'obtention d'un résultat valable. Premièrement, on incube un antibiotique de référence qui possède une valeur de CMI connue pour la souche étudiée et on compare ensuite notre expérience avec cette valeur théorique (**Figure 1.14**, rangée H).

Deuxièmement, on utilise un puits de la plaque afin d'y faire croître des bactéries sans antibiotique (test de croissance/contrôle positif) afin de prouver que nos bactéries étaient bel et bien en croissance saine. Troisièmement, on utilise un puits avec la solution nutritive seule (test de stérilité/contrôle négatif) afin de prouver que notre plaque et nos milieux de croissance étaient bien stériles et que seule la bactérie étudiée a proliféré dans le milieu. Si chacun des tests est concluant on peut considérer la valeur de CMI obtenue pour nos antibiotiques. Plus cette valeur est petite, meilleur est le composé pour inhiber la croissance bactérienne. Les mêmes procédures sont utilisées afin de déterminer l'activité antifongique.

1.7 Les biofilms

Dans la nature, les bactéries se retrouvent sous deux formes : la forme planctonique et la forme de biofilm.^[77] Une bactérie, lorsqu'elle se développe dans la nature, se retrouvera d'abord sous la forme planctonique et pourra se déplacer librement dans son milieu. Dans le cas de la bouche, nous retrouvons dans la salive de nombreuses bactéries planctoniques qui régulent et entretiennent notre microbiome buccal.^[78] Elles permettent une régulation du pH, la formation de l'émail protecteur, ainsi que le maintien global de la santé buccodentaire.^[79]

Toutefois, dans le monde biologique ainsi que dans le corps humain, les bactéries se développent principalement dans des communautés que l'on appelle biofilms multicellulaires.^[80] Les biofilms peuvent se former sur des surfaces vivantes/biotiques (la bouche) ainsi que sur des surfaces inertes/abiotiques tel que les comptoirs dans les milieux hospitaliers.^[81]

Les biofilms sont le résultat d'un stress ou d'une perturbation extérieure sur le microorganisme. Lorsque ce dernier ressent un danger, par exemple l'application d'un antibiotique chez les bactéries, ou par un manque de nutriment lorsqu'en contact avec une surface abiotique, les mécanismes de défense intrinsèques pousseront ce microorganisme à se protéger.^[82] L'un de ces mécanismes est de s'attacher à une surface et former une matrice fermée, le protégeant de l'environnement extérieur. Nous parlons ici d'une communauté organisée dans laquelle les microorganismes utilisent des canaux pour s'approvisionner mutuellement. Les bactéries dans les biofilms sont donc isolées et protégées, contrairement aux bactéries planctoniques.^[83]

En reprenant l'exemple de la bouche, nous savons que celle-ci possède des bactéries planctoniques, mais également des bactéries sous forme de biofilm. Ces biofilms se retrouvent principalement sur les dents, surface sur laquelle les bactéries peuvent adhérer, et forment ce qu'on appelle la plaque dentaire.^[84] La plaque dentaire ne cause généralement pas de problème et peut être contrôlée avec une bonne santé buccodentaire. Toutefois, avec le temps, une couche plus importante de bactéries peut se former sur les dents et ce malgré un brossage quotidien. On parle ici du tartre, biofilm plus nocif pour notre santé buccodentaire que la plaque dentaire.^[85] Une fois le tartre formé, il est très difficile à l'enlever avec les méthodes traditionnelles telles que la brosse à dent, la soie dentaire et le rince bouche. Il faudra donc utiliser des outils de détartrage chez le dentiste et même parfois des ultrasons puissants afin de briser le réseau bactérien si le dépôt de tartre est très épais.^[86]

La formation d'un biofilm est un processus compliqué, car il implique des changements majeurs dans l'utilisation de l'information génétique de l'organisme et de l'énergie cellulaire.^[87] Cette modification structurelle apporte des conséquences profondes sur la survie bactérienne. Le comportement des bactéries dans le biofilm, ainsi que la faible accessibilité des bactéries à l'intérieur de celui-ci, peut compliquer énormément le traitement des infections bactériennes.^[80] La formation de ces communautés de microorganismes est également associée aux infections chroniques, de par la difficulté d'éradiquer complètement les bactéries présentes dans le biofilm.^[88]

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour but de démontrer qu'avec une approche de perturbation membranaire et de la matrice de polysaccharides du biofilm, nous pouvons inhiber et détruire la formation de biofilm afin de contrer les problèmes susmentionnés.

1.7.1 Le cycle de développement des biofilms

Le mécanisme de formation et de développement de biofilm peut être généralisé en un cycle continu de quatre étapes qui diffèrent légèrement d'une souche de bactérie à une autre (**Figure 1.15**).^[89] Le processus commence avec un signal environnemental qui génèrera un changement au niveau du programme génétique chez les bactéries.

Ce changement génétique poussera les bactéries planctoniques à adhérer de manière réversible sur une surface (**Figure 1.15**, étape I).^[90]

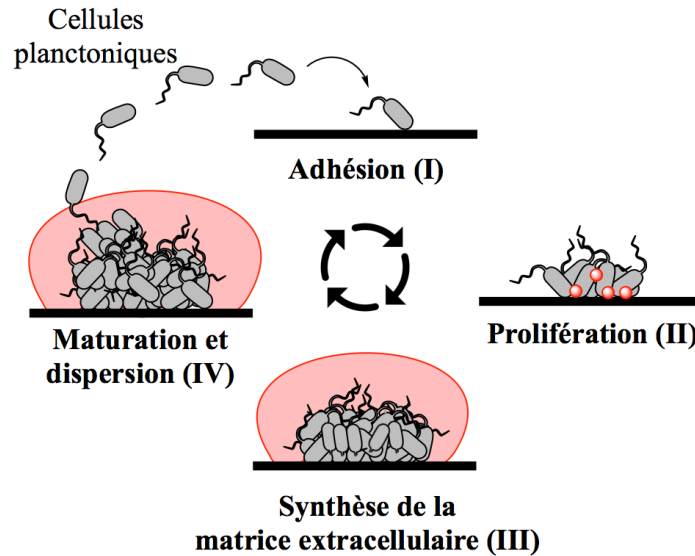


Figure 1.15. Les différentes étapes du développement des biofilms.

Pour se faire, les bactéries utilisent les flagelles, les pilis, des lipopolysaccharides ou d'autres appendices situés à la surface cellulaire. Pour permettre une survie cellulaire, il faut que la surface d'attachement permette une croissance bactérienne.^[91]

Lors de cette étape, il faut distinguer deux types de bactéries bien spécifiques : les bactéries mobiles qui possèdent des flagelles pour se déplacer et les bactéries non mobiles qui ne possèdent aucun moyen de se déplacer. En effet, les bactéries avec des flagelles peuvent les utiliser comme moyen de déplacement, ainsi que de surface d'attachement, ce qui favorise la formation de biofilm. Toutefois, les bactéries qui n'en possèdent pas, tel que les *MRSA*, doivent développer d'autres méthodes pour cibler la surface et s'y attacher. Lorsque les conditions sont propices à la formation de biofilm, les bactéries non-mobiles augmentent l'expression d'adhésines présentes à leur surface externe. Ce facteur favorise à la fois l'adhérence à la surface, mais également l'interaction avec les autres cellules permettant la formation d'une couche initiale de bactéries à la surface.^[92]

Une fois attachées, les bactéries commencent à produire, sur la surface biotique (dents, poumons, colons ou la peau) ou abiotique (surface ou instrument médical) des polysaccharides et des glycoprotéines permettant à d'autres bactéries d'y adhérer et de former un réseau bien structuré (**Figure 1.15**, étape II). Sous cette forme, les bactéries sont attachées à la surface et entre elles de manière irréversible. Les bactéries qui possèdent des flagelles les perdront, afin de former un biofilm plus compact. Ces bactéries, maintenant non-mobiles, utilisent une méthode de convulsion afin de se déplacer et de se structurer dans le biofilm.^[93]

Sur une même surface, on voit apparaître plusieurs microcolonies avec le temps. Ces communautés indépendantes doivent réduire la confluence entre-elles et pour ce faire, les espaces non colonisés sont remplis de bactéries afin de couvrir toute la surface et de former un seul biofilm. Une fois la colonie formée, les bactéries au sein de celle-ci commencent à communiquer entre elles en envoyant et en recevant un signal chimique dans un processus appelé détection du quorum (QS, *quorum sensing*).^[94] Des molécules de signalisation, ou auto-inductrices, sont continuellement fabriquées et sécrétées par les cellules individuelles. Le QS ne peut être senti que si la population est très dense, comme c'est le cas dans un biofilm. Si la population bactérienne n'est pas assez grande, la diffusion des auto-inducteurs est très rapide, ce qui empêche les bactéries de communiquer entre-elles. Une fois que la population atteint un certain nombre, le signal chimique atteint une concentration spécifique, on dit alors que le quorum est atteint, ce qui déclenche des changements génétiques importants. Le changement génétique majeur apporté par cette communication bactérienne est la formation de la matrice extracellulaire (**Figure 1.15**, étape III).

Le QS est principalement responsable de la quantité de substance extracellulaire polymérique (SEP) formée.^[95] Cette matrice, qui régit l'intégrité fonctionnelle et structurelle des biofilms, est principalement composée de polymères, de polysaccharide et de protéines. Celle-ci contient également de l'ADN, des lipides, ainsi que d'autres macromolécules essentielles à la survie du biofilm.^[96] Plus précisément, l'ADN extracellulaire est une composante essentielle à la survie du biofilm puisqu'elle protège les bactéries des facteurs environnementaux. Cette protection confère une résistance nettement supérieure au biofilm contre les antibiotiques et aussi contre les réponses immunitaires du corps humain. Ces composantes sont entourées de

canaux responsables du transport de l'air, de l'eau et des nutriments dans l'ensemble du biofilm. Ce mélange de biopolymères et de nutriments offre un environnement viable à tout microorganisme pour survivre et proliférer. La SEP a également pour but de protéger les bactéries au sein du biofilm. Une fois la SEP formée, les bactéries sont moins sensibles aux antibiotiques et aux antimicrobiens en raison de la diffusion limitée de ces composés dans le biofilm et de l'impossibilité pour ceux-ci d'atteindre leur site d'action. Cette caractéristique est directement reliée au caractère très virulent de certaines souches bactériennes.^[97]

Finalement, à l'aide du QS, les bactéries peuvent se développer sous forme d'une matrice tridimensionnelle (**Figure 1.15**, étape **IV**). À ce stade, le QS régit et régule la densité de la population au sein du biofilm, tout en maintenant l'approvisionnement de nutriments nécessaires à la maturation de celui-ci. Si le niveau de nutriments commence à diminuer, les signaux moléculaires envoyés par les bactéries produisent des protéines permettant la dissolution locale de la SEP.^[98] Une fois la matrice endommagée ou dissoute, les bactéries retournent à l'état planctonique et peuvent quitter le biofilm. Une fois libres, celles-ci peuvent se disperser de nouveau, et ainsi coloniser de nouveaux sites propices à la croissance bactérienne, où les nutriments sont abondants.^[99]

1.7.2 Les biofilms mixtes

Bien que la plupart des biofilms utilisés en laboratoire soient formés avec une seule souche de microorganisme, dans la nature il est plutôt question de cohabitation au sein d'un même biofilm par plusieurs espèces.^[100] Ces biofilms mixtes sont souvent formés de levures entrelacées de bactéries. Les levures sont des microorganismes ayant une taille qui varie entre 4 et 12 μm .^[101] Pour ce qui est des bactéries, celles-ci sont généralement plus petites que les levures et mesure entre 0,2 et 2 μm . On retrouve toutefois une différence majeure dans la structure des biofilms de levures puisque celles-ci ont la capacité de former des hyphes, principalement composé de chitine, dans la matrice du biofilm. La formation des hyphes se produit généralement pendant la maturation du biofilm. L'ajout de ces hyphes génère un réseau filamenteux dans le biofilm, ce qui est très propice à la propagation et au développement de la colonie.^[102]

Dans notre corps, les souches de *C. albicans* sont parmi les espèces fongiques les plus répandues et n'entraînent généralement aucune maladie.^[103] Toutefois, ce pathogène est très opportuniste et une fois sous forme de biofilm, il peut provoquer des infections graves. De par la structure filamenteuse des biofilms de *C. albicans*, ceux-ci sont généralement isolés sous forme de co-biofilms avec plusieurs bactéries telles que les *MRSA*.^[104] En s'accrochant aux hyphes des *C. albicans*, les *MRSA* forment une entité synergique qui permet la cohabitation des espèces (**Figure 1.16**). Une fois les espèces réunies, celles-ci communiquent via le QS afin de maximiser la survie du biofilm.

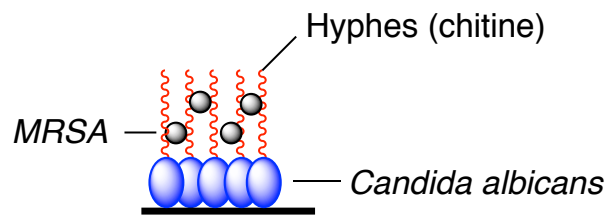


Figure 1.16. Représentation de l'interaction entre deux espèces au sein d'un biofilm.

Les deux espèces établissent une forte cohésion qui stabilise la structure globale du biofilm, tout en permettant une colonisation contrôlée par les membres individuels. En plus de leurs interactions physiques, de leurs relations synergiques et de la régulation du biofilm via le QS, les espèces peuvent également s'échanger des nutriments.^[105] Dans un cas, les espèces s'échangent mutuellement des nutriments, et dans un autre, une espèce peut utiliser les nutriments disponibles afin de produire des nutriments qui seront métabolisés par l'autre espèce dans le biofilm. Cette cohésion inter-espèce entraîne une formation de biofilm très virulent. Une étude a montré que lorsque les *C. albicans* et les *MRSA* cohabitent, les *C. albicans* protègent les bactéries contre des antibactériens, tel que la vancomycine.^[106] Cet antibiotique très efficace contre les bactéries Gram⁺ aurait normalement dû éradiquer les colonies de *MRSA*, mais ce ne fut pas le cas. Une protection additionnelle proviendrait de la matrice extracellulaire des biofilms de *C. albicans* qui contiennent plus de glucanes que les biofilms de *MRSA* seuls. Cependant, une autre étude a démontré que cet effet de protection mutuelle pouvait être réduit par l'ajout d'un perturbateur de la matrice, ou si la synthèse des glucanes était inhibée.^[107]

Au vu des résultats de ces études, il est évident que l'inhibition des biofilms uni ou multicellulaire est facilitée si celui-ci est perturbé ou perméabilisé. Les travaux présentés dans cette thèse porteront donc sur la conception et la synthèse d'agents ayant la capacité de perturber les matrices et les membranes cellulaires afin d'inhiber la formation de biofilms ou de détruire des biofilms formés.

1.7.3 La détection des biofilms

Bien que les biofilms soient parfois visibles à l'œil nu, il est très souvent difficile de déterminer l'épaisseur ou l'uniformité de ceux-ci. Afin de déterminer ses caractéristiques, plusieurs méthodes sont utilisées pour analyser leur structure.

La première méthode est la méthode de coloration au cristal violet.^[108] Cette molécule colorée possède une interaction très forte avec les peptidoglycanes qui se retrouvent sur la membrane cellulaire. Ainsi, lorsque l'on met les biofilms en présence de cet agent de coloration, les bactéries se colorent en mauve et nous pouvons visuellement (qualitatif) ou expérimentalement (quantitatif) déterminer la présence de biofilm dans notre échantillon (**Figure 1.17**).^[109]

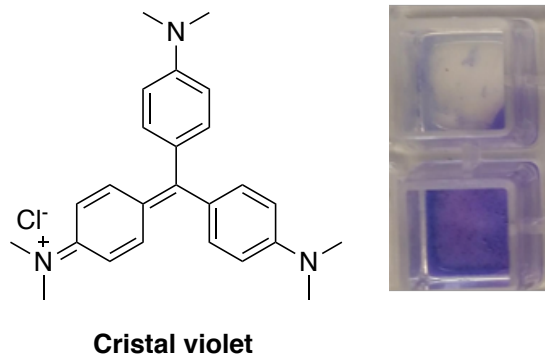


Figure 1.17. Structure du colorant cristal violet et son effet sur les biofilms.

Cependant, cette méthode ne renseigne aucunement sur la viabilité et l'organisation structurale du biofilm sur la surface. Pour ce faire un test de fluorescence bicolore (vert et rouge) de la viabilité bactérienne, basé sur l'intégrité de la membrane appelée *Baclight* est utilisé.^[110]

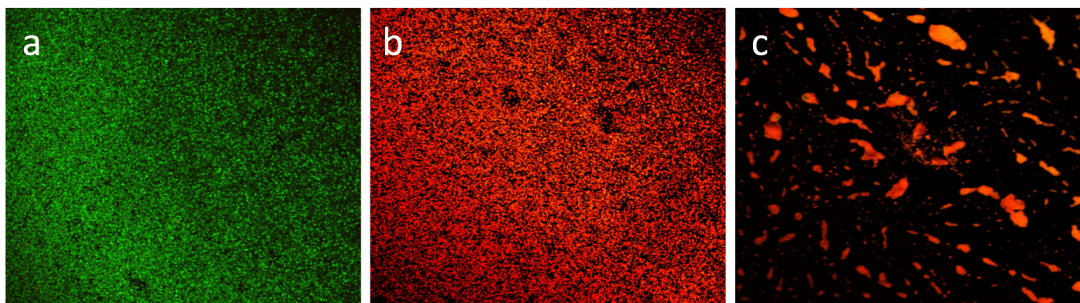
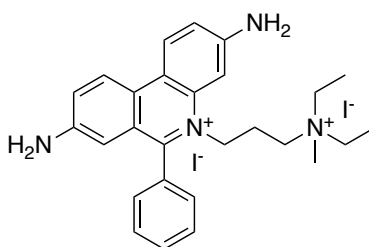


Figure 1.18. Représentation de différents biofilms avec le test de viabilité *BaClight*.

Cette analyse consiste à mettre en présence du biofilm deux agents intercalants de l'ADN. Ces deux sondes sont la protéine verte fluorescente SYTO9 et l'iodure de propidium (PI). Lorsque la protéine verte fluorescente (perméable aux membranes) est utilisée seule, celle-ci est capable de pénétrer les membranes bactériennes et s'intercaler à l'ADN. Cette interaction avec l'ADN apporte une augmentation de la fluorescence qui émet dans le vert (**Figure 1.18a**). Cette sonde ne fait aucune distinction entre les bactéries dont les membranes sont intactes et celles dont les membranes sont endommagées. En revanche, de par son caractère très hydrophobe, l'iodure de propidium (**figure 1.19**) ne pénètre que dans les bactéries dont les membranes sont endommagées. Une fois intercalé entre les bases de l'ADN, cet agent émet de la lumière rouge 20 à 30 fois plus intense que la protéine SYTO9 (**Figure 1.18b**).^[111]



Iodure de propidium

Figure 1.19. Structure de l'iodure de propidium utilisé comme colorant.

Lorsque ces deux colorants sont mélangés en présence d'un biofilm, le PI émet donc une fluorescence plus intense que la protéine, permettant de distinguer clairement les bactéries saines de celles dont la membrane est endommagée. En plus d'indiquer la viabilité du biofilm, cette méthode d'analyse permet également de visualiser la morphologie et l'uniformité des biofilms étudiés (**Figure 1.18c**).

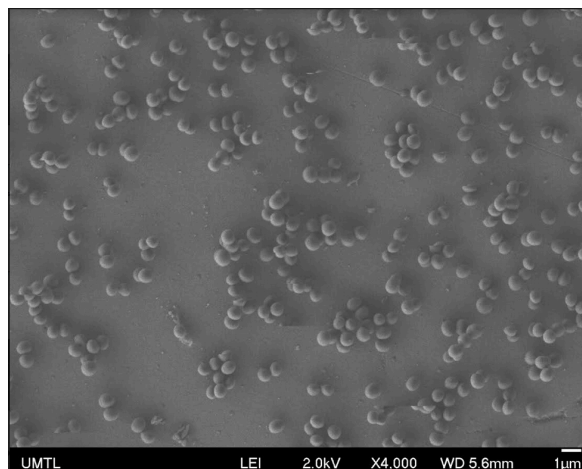


Figure 1.20. Image MEB d'un biofilm *S. aureus*.^[112]

Finalement, afin d'analyser la morphologie du biofilm de manière très précise, la microscopie électronique à balayage (MEB) est utilisée.^[113] Cette méthode permet de visualiser les bactéries (1-2 μm) présentes dans le biofilm et d'obtenir des images de haute résolution (**Figure 1.20**). Ces images permettent ensuite de déterminer la morphologie exacte du biofilm, c'est-à-dire l'agglomération des bactéries dans le biofilm, ainsi que leur taux de survie. Bien que toutes ces techniques possèdent leurs avantages et leurs inconvénients, une fois utilisées ensemble, une analyse complète des biofilms peut être obtenue.

1.7.4 Étude de l'activité sur les biofilms

Afin de déterminer l'activité antibiofilm de nos composés, deux modèles seront employés : un modèle d'inhibition de la formation du biofilm, ainsi qu'un modèle de perturbation/destruction de biofilm déjà formé ou mature (**Figure 1.21**).

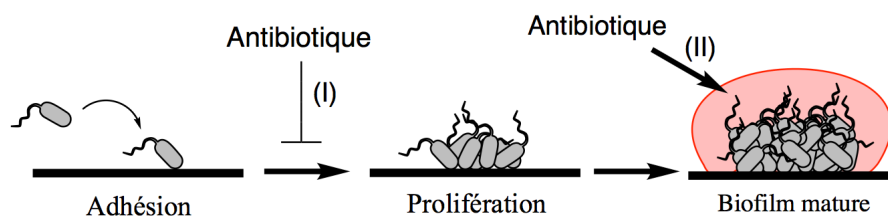


Figure 1.21. Représentation des deux modèles utilisés pour la détermination de l'activité antibiofilm. (I) : inhibition ; (II) : perturbation/destruction.

Le modèle d'inhibition consiste à incuber des bactéries planctoniques en présence d'antibiotique et par la suite étudier la capacité des antibactériens à inhiber la formation du biofilm. Pour ce qui est du test de perturbation/destruction des biofilms, on incube d'abord des bactéries jusqu'à l'obtention d'un biofilm viable, et on étudie ensuite la capacité de nos molécules à agir sur celui-ci. Ainsi, nous pouvons déterminer l'activité antibiofilm des composés en utilisant les différentes méthodes de détection discutées dans la section précédente.

Afin de valider les résultats obtenus, il est important d'avoir des contrôles positifs et négatifs. Le contrôle négatif se fait en présence de DMSO, généralement 10-20% en solution aqueuse, puisque les composés utilisés sont préalablement dissouts dans celui-ci. Il est donc important de vérifier que le DMSO n'a aucun effet sur la densité et la morphologie du biofilm. Pour ce qui est du test positif, l'éthanol est utilisé, puisque celui-ci est reconnu pour tuer plus de 95% des biofilms.^[114] Nous pouvons également utiliser des composés de référence qui ont montré une capacité à inhiber ou détruire les biofilms.

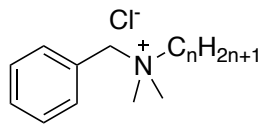
Fait intéressant à noter, même si certains composés possèdent la même activité antibactérienne planctonique (CMI), ceux-ci peuvent montrer des activités antibiofilm très différentes. Les travaux de cette thèse présentent les résultats obtenus sur les bactéries planctoniques, ainsi que leur capacité à agir sur les biofilms.

1.8 Les composés cationiques antibactériens et antifongiques

Les composés cationiques amphiphiles sont depuis longtemps utilisés comme produits désinfectants et dans l'industrie pharmaceutique.^[115] Tel que présenté dans la section précédente, l'ADN chargé négativement est une composante majeure de la matrice des biofilms. Ceci a conduit au développement des agents amphiphiles cationiques afin d'interagir avec l'ADN présent dans la matrice des biofilms, et ainsi obtenir une inhibition/destruction de ces derniers. Plusieurs études ont démontré que des polymères,^[97] des pillararènes,^[116] des porphyrines,^[117] des dendrimères^[118] et des petites molécules amphiphiles^[119] pouvaient agir sur la matrice des biofilms et les perturber.

1.8.1 Les composés de type ammonium quaternaire

Lors d'une infection microbienne, les peptides antimicrobiens (AMPs) sont utilisés comme réponse immunitaire pour éradiquer rapidement les agents pathogènes, et ce par la destruction des membranes cellulaires des organismes envahisseurs.^[120] Inspirés de ces AMPs, des composés de type ammonium quaternaire (QACs) sont largement utilisés comme antimicrobiens depuis le début des années 1900.^[121] De par leur facilité de synthèse, les QACs ont fait l'objet de nombreuses études sur leur capacité inhibitrice des biofilms.^[122] Le chlorure de benzalkonium par exemple, aussi connu sous le nom de BAC, possède une activité biocide importante.^[123]



Chlorure de benzalkonium
n = 8, 10, 12, 14, 16, 18

Figure 1.22. Structure du chlorure de benzalkonium.

Le mécanisme bactéricide des QACs est dû à la perturbation des interactions intermoléculaires dans la membrane cellulaire, ce qui compromet la perméabilité de la cellule et induit la fuite de son contenu. Les chlorures de benzalkonium sont des agents à action rapide et actifs contre certains virus, bactéries et levures. Ils sont donc utilisés à profusion dans les établissements hospitaliers comme désinfectants, comme additif dans les détergents, ainsi que dans l'industrie du textile.^[124]

Cet agent antibactérien très simple est composé d'un mélange de chlorures d'alkylbenzyltriméthylammonium, dans lequel le groupe alkyle a diverses longueurs de chaîne (**Figure 1.22**). Son activité biocide importante est principalement associée aux dérivés C12 et C14. En plus de son activité biocide bien connue, P. Di Martino et ses collègues ont récemment démontré l'activité antibiofilm du BAC.^[125] En effet, lorsque des biofilms de différentes souches bactériennes sont exposés à des concentrations de BAC égale à la CMI, une inhibition totale de la formation du biofilm est observée. Toutefois, lorsque ces mêmes biofilms sont exposés à des concentrations inférieures à la CMI, une augmentation évidente de l'épaisseur du biofilm est observée, sans effet direct sur l'inhibition des bactéries planctoniques.

Cette réponse serait dûe au stress environnemental apporté par la basse concentration de BAC sur les bactéries. Celles-ci ressentiraient un danger et se protégeraient plus massivement sous forme de biofilm, sans que le BAC ne puisse exercer son effet antibactérien (concentration de BAC < CMI).

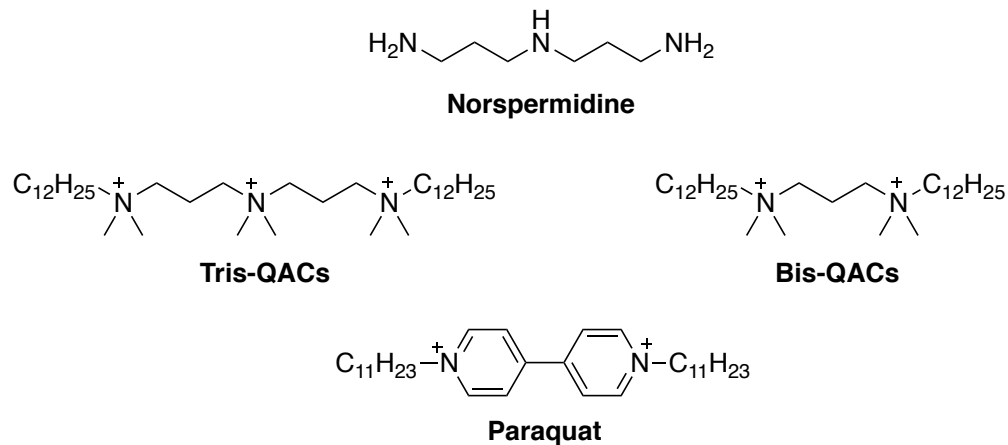


Figure 1.23. Structure de la norspermidine et des nouveaux analogues synthétisés.

Plus récemment, des travaux du groupe de Clardy ont démontré que la norspermidine possédait des capacités inhibitrices des biofilms (**Figure 1.23**). L'activité antibiofilm proviendrait d'une attraction des fonctions amines présentes sur la molécule avec la matrice négativement en utilisant des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène.^[126]

Au vu de ces résultats, M. Jennings et ses collègues se sont inspirés de la structure de cette molécule afin de synthétiser une nouvelle librairie de QACs (**Figure 1.23**). Leur librairie de composés mono, di- et tri-cations ammonium, comportant des longueurs de chaînes variées, a été désignée afin d'étudier si l'espacement de la charge et la structure tridimensionnelle jouent un rôle sur l'activité biologique des composés.^[127] Un composé de type pyridinium di-cationiques rigide, le paraquat (PQ), a également été synthétisé pour fin de comparaison avec les composés plus flexibles (**Figure 1.23**). Les résultats d'inhibition des biofilms ont été excellents et les auteurs ont rapporté que le PQ était l'un des composés les plus actifs de leur librairie. Basé sur ces résultats, les auteurs ont proposé que la nature de la charge cationique, et non l'emplacement relatif de celle-ci, avait une plus grande influence sur la bioactivité de ces composés.

De par leur nature cationique et amphiphile, les QACs démontrent généralement une assez grande toxicité sur les cellules eucaryotes humaines. En 2016, J. Haldar et ses collègues ont montré que les activités antibactériennes de petites molécules amphiphiles sont reliées à leur cytotoxicité. La stratégie qu'ils ont utilisée consiste à simplement modifier l'espacement des unités hydrophiles (Me_2N^+) tout en maintenant le nombre total d'atomes de carbone et la charge positive constants (**Figure 1.24**). Avec ces petits changements structurels, les auteurs ont pu moduler la toxicité de ces QACs, tout en gardant de bonne activité antibactérienne et antibiofilm.^[128]

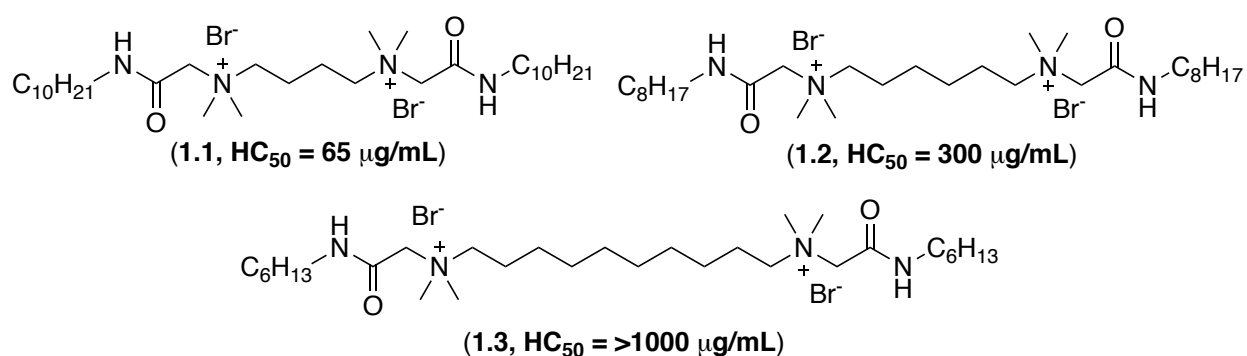


Figure 1.24. Structure des différents analogues synthétisés par J. Haldar et ses collègues.

Cette étude a démontré que l'activité antibactérienne des composés **1.1-1.3** ne varie que très peu avec les changements structurels apportés. En effet, la CMI de chacun de ces composés varie entre 2 et 4 μM sur différentes souches bactériennes (*MRSA* et *E. coli*). Cependant, lorsque ces composés ont été testés sur des globules rouges humains (GRH), leur activité hémolytique (indiquée par la HC_{50} , concentration à laquelle se produit une hémolyse de 50% des GRH) s'est révélée varier considérablement. En effet, on a observé une augmentation de la toxicité hémolytique lorsque les charges sont rapprochées. On peut en déduire que l'activité antibactérienne, ainsi que la toxicité peuvent être modifiées en apportant de légers changements structurels au sein d'une même série d'analogues. Les travaux de cette thèse tiendront compte de ces études dans la conceptualisation de nouvelles molécules amphiphiles actives et peu toxiques agissant sur les membranes bactériennes et sur les biofilms.

1.8.2 Les composés azolés

Dans un effort de réduire d'avantage la toxicité des composés cationiques amphiphiles, les travaux de cette thèse portent sur l'utilisation des noyaux imidazole et benzimidazole. Le noyau 1*H*-imidazole est très présent dans la nature et se retrouve même sur la chaîne latérale d'un des 22 acides aminés essentiels, l'histidine (**Figure 1.25**).^[129]

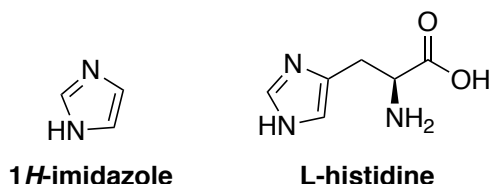


Figure 1.25. Structure du noyau 1*H*-imidazole et de l'acide aminé essentiel *L*-histidine.

De par sa très grande biocompatibilité, le noyau imidazole possède un grand potentiel pharmaceutique, ce qui explique qu'il soit utilisé depuis plusieurs années en tant qu'agent antifongique.^[129] Le miconazole, par exemple, est un antifongique topique de type imidazolé, facilement synthétisable en trois étapes (**Schéma 1.2**), qui est utilisé depuis près de 50 ans dans le traitement des infections aux levures.^[130] Cet antifongique, souvent utilisé sous sa forme protonée (sous forme de sel de nitrate), possède un large spectre d'activités, ce qui lui donne une place sur la liste des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).^[131] L'activité biocide de ce composé, ou en d'autres mots le mécanisme d'action, est attribuée à l'inhibition du cytochrome P450 (CYP450), une hémoprotéine impliquée dans plusieurs réactions d'oxydo-réduction essentielles à la survie de la cellule.^[132]

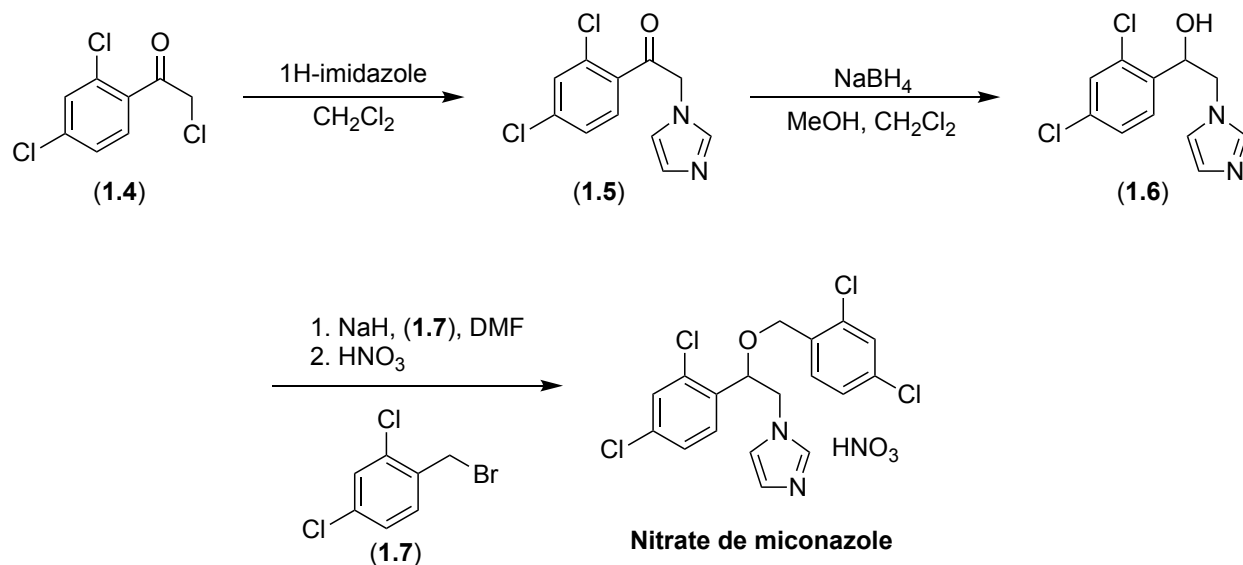


Schéma 1.2. Synthèse du nitrate de miconazole en trois étapes.^[133]

Lorsque le nitrate de miconazole interagit avec le CYP450, protéine responsable de la clairance de plusieurs composés dans le corps, la fonction amine du noyau imidazole se lie au noyau hème inhibant la synthèse de l'ergostérol, molécule essentielle à la structure membranaire des levures (**Figure 1.26**).^[134] Dans le cas des bactéries, plus spécifiquement dans le cas des souches *MRSA*, le miconazole se lie au noyau flavohémoglobine et induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) endogène, ce qui mène ultimement à l'apoptose cellulaire.^[135]

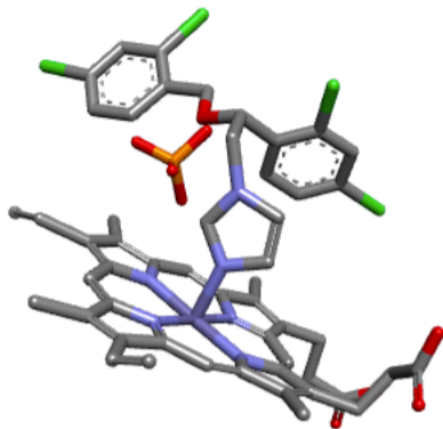
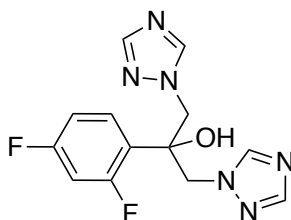


Figure 1.26. Interaction entre le miconazole et le noyau flavohémoglobine.^[136]

À part les composés imidazolés, d'autres types de composés azolés ont fait leur apparition sur le marché. Les triazoles représentent une autre famille d'antifongiques azolés qui sont utilisés dans le milieu pharmaceutique depuis 40 ans.^[137] Le fluconazole (**Figure 1.27**), qui fait également partie de la liste essentielle de l'OMS, est l'un des antifongiques les plus utilisés de nos jours.^[138] Il possède un mécanisme d'action similaire au miconazole et, dû à sa grande utilisation, il est généralement utilisé comme référence lors de la détermination et l'analyse de l'activité antifongique de nouveaux analogues.^[139]



Fluconazole

Figure 1.27. Structure de l'antifongique fluconazole.

1.8.3 Les sels d'imidazolium et de benzimidazolium

Nous avons vu désormais que les QACs possèdent un large spectre d'activité antiseptique et que les noyaux imidazole et benzimidazole possèdent une très bonne biocompatibilité. De par ces caractéristiques, les composés cationiques à base de sel d'imidazolium et de benzimidazolium représentent une sous-classe de QACs faciles à synthétiser, généralement en deux étapes (**Schéma 1.3**), qui ont démontré des propriétés antibactériennes, antifongiques et antibiofilms.^[140]

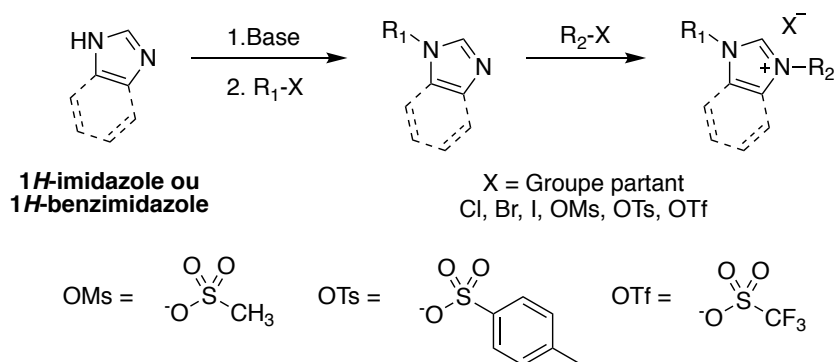


Schéma 1.3. Synthèse générale des sels d'imidazolium et de benzimidazolium.

Le composé NH125, par exemple, a montré la capacité d'éradiquer les bactéries présentes dans les biofilms de *MRSA* par la dépolarisation de leur membrane externe (**Figure 1.28**).^[141] Cet antibiotique possède un cation imidazolium benzylique et une chaîne hydrophobe à 16 atomes de carbone, lui conférant une structure amphiphile, capable de pénétrer les bicouches phospholipidiques et agissant comme un détergent pour perméabiliser les membranes cellulaires.

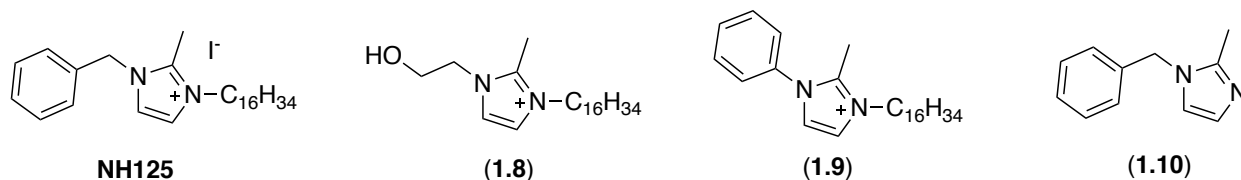


Figure 1.28. Composé NH125 et différents analogues de la librairie de Huigens.^[142]

Inspiré de ces résultats, Huigens et ses collègues ont récemment entrepris la synthèse d'une librairie d'analogues du NH125.^[142] Parmi ces analogues, deux composés (**1.8** et **1.9**) montrèrent une amélioration considérable de l'activité antibactérienne et antibiofilm sur des souches de *MRSA* (**Figure 1.28**). Ces analogues agissent via un mécanisme de lyse membranaire et possèdent une multitude d'applications biomédicales prometteuses. De plus, ces travaux ont également démontré l'importance du caractère amphiphile de ces antibiotiques, puisque le composé **1.10** n'a montré qu'une très faible activité sur les souches de *MRSA*.

1.9 Description du projet de recherche

Mes travaux de recherche ont eu comme but principal de synthétiser et caractériser des composés amphiphiles qui ont la capacité d'inhiber et de perturber les membranes bactériennes et les biofilms.

1.9.1 Propriétés antibactériennes d'analogues du miconazole

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du changement structural sur l'antifongique miconazole, en transformant le noyau imidazole en cation imidazolium, afin de lui apporter un caractère amphiphile capable de détruire les biofilms. Cette stratégie est couramment utilisée en chimie médicinale puisqu'elle implique très peu d'étapes synthétiques.

J. Haldar et ses collègues ont récemment proposé le même type de modification de la vancomycine via un couplage peptidique avec l'amine **1.11** (**Schéma 1.4**).^[143]

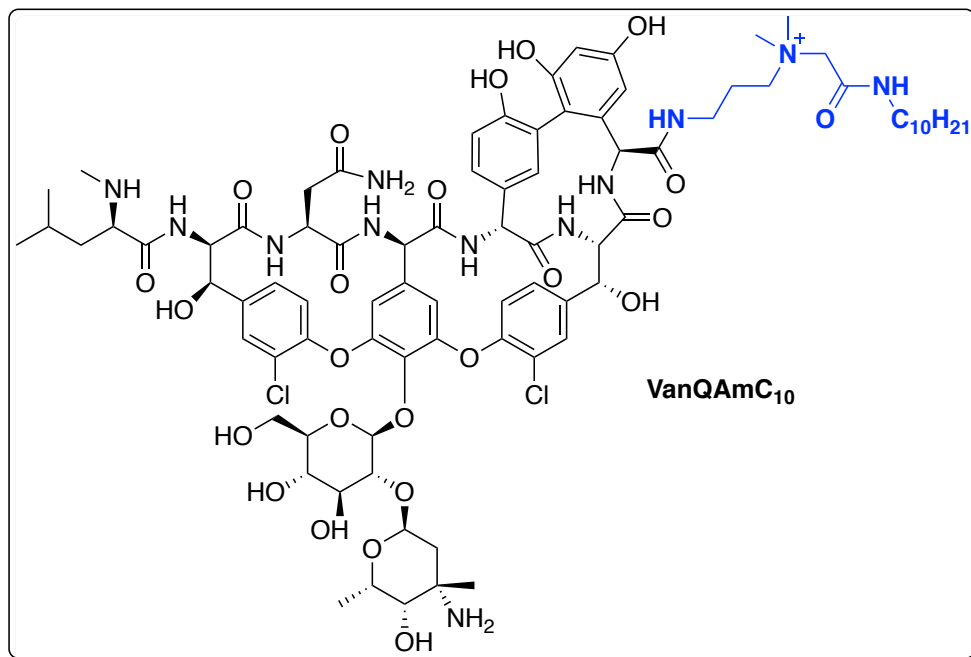
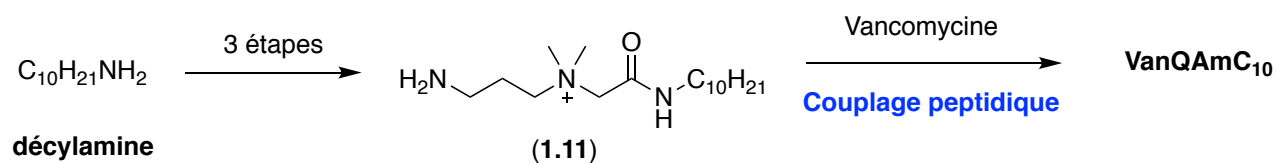
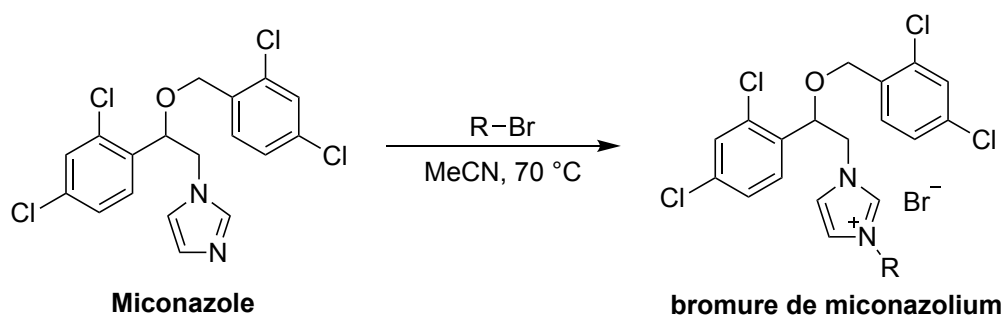


Schéma 1.4. Synthèse du dérivé amphiphile de la vancomycine.^[143]

Cette modification structurale a permis l'augmentation de l'activité antibiofilm de la vancomycine, tout en limitant l'apparition de résistance bactérienne. La **VanQAmC₁₀** possède également la capacité de promouvoir l'autophagie ce qui augmente sa capacité d'éliminer les agents pathogènes intracellulaires.^[143] Nos travaux ont porté sur la quaternisation du noyau imidazole de l'antifongique miconazole. En alkylant l'azote du miconazole avec des chaînes carbonées, le noyau imidazole est transformé en cation imidazolium, qui ne possède plus d'électrons libres sur l'atome d'azote (**Schéma 1.5**). Comme indiqué précédemment cette paire d'électrons libres est impliquée dans la liaison du miconazole avec l'hème. En enlevant ceux-ci, on enlève la capacité du miconazole à se lier au noyau hème de l'hémoglobine.

De ce fait, nous changeons totalement le mécanisme d'action antibactérien, car ces composés amphiphiles pourront perturber les membranes cellulaires et les biofilms.



R = C₆H₁₃ (**1.12**), C₈H₁₇ (**1.13**), C₁₀H₂₁ (**1.14**), C₁₂H₂₅ (**1.15**), C₁₄H₂₉ (**1.16**), C₁₆H₃₃ (**1.17**)

Schéma 1.5. Réaction d'alkylation afin d'obtenir divers bromures de miconazolium

1.9.2 Propriétés antibactériennes et antibiofilms des sels d'imidazolium et de benzimidazolium

Depuis quelques années, notre groupe de recherche a développé plusieurs séries de transporteurs de chlorure contenant le cation benzimidazolium (**1.18**, **1.19** et **1.20**). Ces transporteurs ont montré une bonne activité bactéricide due à leur capacité à induire un déséquilibre électrolytique et à perturber l'intégrité des membranes bactériennes.^[144]

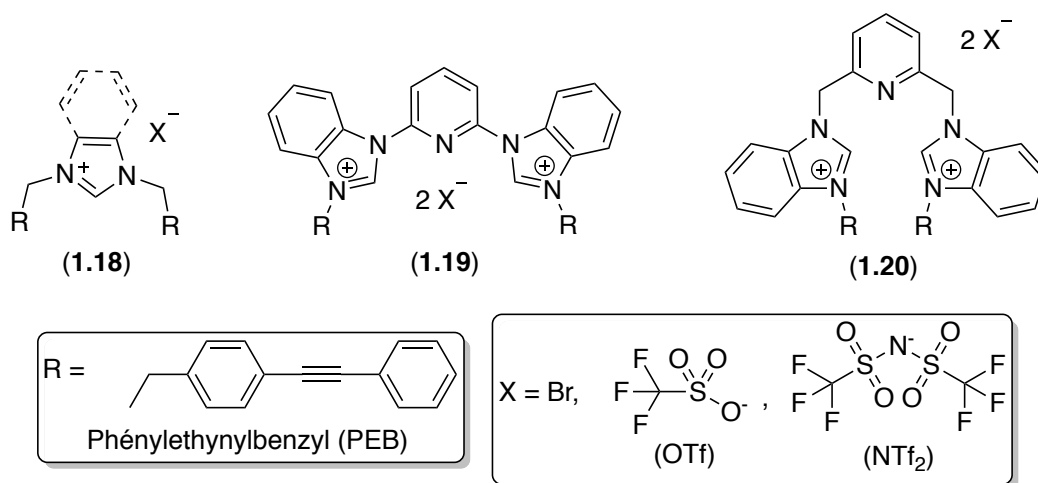


Figure 1.29. Structure des antibiotiques synthétisés au sein de notre groupe de recherche.

Leur nature amphiphile provenant du cation benzimidazolium et de la chaîne apolaire phényléthynylbenzyl (PEB) leur permet de s'insérer dans les bicouches lipidiques. Des images SEM ont également montré la formation de pores/canaux dans les membranes bactériennes.^[144] Ces pores entraînent une fuite du contenu intracellulaire, ce qui mène ultimement à la mort bactérienne. L'effet de la nature des contre anions a également été observé, puisque les composés portant des anions organiques tel que le OTf et le NTf₂ montrent généralement une meilleure activité bactéricide. En plus de leur facilité de synthèse, ces composés ont montré une très faible toxicité hemolytique.^[144]

Mes travaux de recherche ont porté sur la conception et la synthèse de nouveaux analogues amphiphiles contenant le même échafaudage cationique, mais ayant différentes chaînes apolaires octyle, adamantyle, cholestéryle et phényléthynylbenzyl.

Au travers de cet ouvrage, je présenterai les travaux de conception et de synthèse de nouveaux agents perturbateurs de membrane. Je présenterai également plusieurs applications biologiques de ces nouveaux composés, afin de montrer le spectre large d'applications des sels d'imidazolium et de benzimidazolium dans le domaine pharmaceutique.

1.10 Références

- [1] S. B. Zaman, M. A. Hussain, R. Nye, V. Mehta, K. T. Mamun, N. Hossain, *Cureus* **2017**, *9*, 1-9.
- [2] A. Fleming, *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.
- [3] R. Istúriz, C. Carbon, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2000**, *21*, 394-397.
- [4] E. L. Miller, *J. Midwifery Womens Health* **2002**, *47*, 426-434.
- [5] M. Lobanovska, G. Pilla, *YJBM* **2017**, *90*, 135-145.
- [6] K. M. Craft, J. M. Nguyen, L. J. Berg, S. D. Townsend, *MedChemComm* **2019**, *10*, 1231-1241.
- [7] F. J. Oppennoorth, *Bull. Wld. Hlth. Org.* **1971**, *44*, 195-202.
- [8] J. Hellou, M. Lebeuf, M. Rudi, *Environ. Rev.* **2013**, *21*, 53-69.
- [9] J. M. Schmidt, P. Battlay, R. S. Gledhill-Smith, R. T. Good, C. Lumb, A. Fournier-Level, C. Robin, *Genetics* **2017**, *207*, 1181-1193.
- [10] D. I. Masse, N. M. Saady, Y. Gilbert, *Animals (Basel)* **2014**, *4*, 146-163.
- [11] A. Cameron, T. A. McAllister, *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2016**, *7*, 68.
- [12] S. Zhang, *Nature news* **2013**.
- [13] J. Davies, D. Davies, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417-433.
- [14] N. Q. Balaban, S. Helaine, K. Lewis, M. Ackermann, B. Aldridge, D. I. Andersson, M. P. Brynildsen, D. Bumann, A. Camilli, J. J. Collins, C. Dehio, S. Fortune, J. M. Ghigo, W. D. Hardt, A. Harms, M. Heinemann, D. T. Hung, U. Jenal, B. R. Levin, J. Michiels, G. Storz, M. W. Tan, T. Tenson, L. Van Melderen, A. Zinkernagel, *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 441-448.
- [15] R. Gaynes, *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 849-853.
- [16] J. Martínez-Borra, S. González, C. López-Larrea, *Self and Nonself. Advances in Experimental Medicine and Biology* **2012**, 738.

- [17] S. T. Abedon, *Bacteriophage* **2012**, 2, 50-54.
- [18] a) K. Lewis, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12, 371-387; b) R. Rogers Yocum, J. R. Rasmussen, J. L. Strominger, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 3977-3986.
- [19] S. B. Levy, *Springer* **1992**, 1-12.
- [20] M. W. Hornef, M. J. Wick, M. Rhen, S. Normark, *Nat. Immunol.* **2002**, 3, 1033-1040.
- [21] V. T. Andriole, *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 41, 113-119.
- [22] George Y. Leshner, Ernest J. Froelich, Monte D. Gruett, John Hays Bailey, R. P. Brundage, *J. Med. Chem.* **1962**, 5, 1063-1065.
- [23] G. C. Crumplin, J. T. Smith, *Nature* **1976**, 260, 643-645.
- [24] M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, H. A. Nash, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, 73, 3872-3876.
- [25] P. C. Sharma, A. Jain, S. Jain, R. Pahwa, M. S. Yar, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, 25, 577-589.
- [26] Deborah M. Campoli-Richards, Jon P. Monk, Allan Price, Paul Benfield, Peter A. Todd, A. Ward, *Drugs* **1988**, 35, 373-447.
- [27] X. Qin, Y. Razia, J. R. Johnson, J. R. Stapp, D. R. Boster, T. Tsosie, D. L. Smith, C. R. Braden, K. Gay, F. J. Angulo, P. I. Tarr, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 3325-3329.
- [28] a) G. A. Jacoby, *Clin. Infect. Dis.* **2005**, 41, 120-126; b) L. J. V. Piddock, *BMJ* **1998**, 317, 1029-1030; c) D. C. Hooper, G. A. Jacoby, *Ann. N Y Acad. Sci.* **2015**, 1354, 12-31.
- [29] C. Calvori, L. Frontali, L. Leoni, G. Tecce, *Nature* **1965**, 207, 417-418.
- [30] W. Wehrli, *Rev. Infect. Dis.* **1983**, 5, S407-S411.
- [31] B. P. Goldstein, *J. Antibiot. (Tokyo)* **2014**, 67, 625-630.
- [32] Saranjit Singh, T.T. Mariappan, R. Sankar, N. Sarda, B. Singh, *Int. J. Pharm.* **2001**, 228, 5-17.

- [33] F. M. Goni, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 1467-1476.
- [34] J. H. Ipsen, G. Karlstrom, O. G. Mouritsen, H. Wennerstrom, M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162-172.
- [35] Borut Poljšak, I. Milisav, *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2012**, *12*, 122-126.
- [36] E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, P. Charlier, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 234-258.
- [37] Y. Yang, D. M. Livermore, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1385-1391.
- [38] D. P. Levine, *Clin. Infect. Diseases* **2006**, *42*, S5-S12.
- [39] C. Watanakunakorn, *J. Antimicrob. Chemother.* **1984**, *14*, 7-18.
- [40] F. R. Bruniera, F. M. Ferreira, L. R. M. Saviolli, M. R. Bacci, D. Feder, M. Da Luz Goncalves Pedreira, M. A. Sorgini Peterlini, L. A. Azzalis, V. B. Campos Junqueira, F. L. A. Fonseca, *Eur. Rev. Med. Pharmacol.* **2015**, *19*, 694-700.
- [41] a) N. R. Cohen, M. A. Lobritz, J. J. Collins, *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 632-642; b) T. C. Barrett, W. W. K. Mok, A. M. Murawski, M. P. Brynildsen, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1177.
- [42] T. K. Wood, S. J. Knabel, B. W. Kwan, *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 7116-7121.
- [43] I. Keren, N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang, K. Lewis, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *230*, 13-18.
- [44] J. G. Hurdle, A. J. O'Neill, I. Chopra, R. E. Lee, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 62-75.
- [45] aH. I. Boshoff, C. E. Barry, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 70-80 ; bK. Lohner, S. E. Blondelle, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2005**, *8*, 241-256.
- [46] P. M. Hawkey, *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62*, 7-14.
- [47] Andie S. Lee, J. G. Hermínia de Lencastre, J. Kluytmans, A. P. Surbhi Malhotra-Kumar, S. Harbarth, *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4*, 18033.

- [48] aJ. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science* **1999**, *284*, 1318–1322 ; bG.R. Stewart, B. D. Robertson, D. B. Young, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, 97-105.
- [49] K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 238-250.
- [50] O. S. Andersen, R. E. Koeppe, 2nd, *Annu. Rev.. Biophys Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 107-130.
- [51] A. Bienvenue, J. S. Marie, *Curr. Top. Membr.* **1994**, *40*, 319-354.
- [52] W. Dowhan, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 199–232.
- [53] D. Marsh, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 1079-1087.
- [54] N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521-533.
- [55] G. K. Auer, D. B. Weibel, *Biochemistry* **2017**, *56*, 3710-3724.
- [56] M. C. Roberts, *Periodontology 2000* **2002**, *28*, 280-297.
- [57] aW. Vollmer, *Periplasm* **2007**, 198-213; bL. Gan, S. Chen, G. J. Jensen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 18953–18957; cM. Beeby, J. C. Gumbart, B. Roux, G. J. Jensen, *Mol. Microbiol.* **2013**, *88*, 664–672.
- [58] R. E. Marquis, *J. Bacteriol.* **1973**, *116*, 1273–1279.
- [59] A. Bera, S. Herbert, A. Jakob, W. Vollmer, F. Gotz, *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 778-787.
- [60] S. Brown, J. P. Santa Maria, S. Walker, *Annu. Rev. Microbiol* **2013**, *67*, 313–336.
- [61] J. G. Swoboda, J. Campbell, T. C. Meredith, S. Walker, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 35-42.
- [62] D. Botstein, G. R. Fink, *Science* **1988**, *240*, 1439.
- [63] David Botstein, Steven A. Chervitz, J. M. Cherry, *Science* **1997**, *277*, 1259-1260.
- [64] T. Hornyak, *Nature Index* **2017**, S19.
- [65] Nicole Kresge, Robert D. Simoni, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284.
- [66] B. A. Dujon, E. J. Louis, *Genetics* **2017**, *206*, 717-750.
- [67] F. C. Odds, *Crit. Rev. Microbiol.* **1987**, *15*, 1-5.

- [68] P. R. Sawyer, R. N. Brogden, R. M. Pinder, T. M. Speight, a. C. S. Avery, *Drugs* **1975**, *9*, 424-447.
- [69] Rene Scherrer, Louise Loudon, P. Gerhardt, *J. Bacteriol.* **1974**, *118*, 534-540.
- [70] F. Chang, *Mol. Biol. Cell* **2017**, *28*, 1819-1824.
- [71] E. R. Rojas, K. C. Huang, *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *42*, 62-70.
- [72] J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 1049-1049.
- [73] aG. Sezonov , D. Roseleau-Petit , R. D'Ari, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8746-8749; bG. Bertani, *J. Bacteriol.* **1950**, *62*, 292-300.
- [74] A. Meyers, C. Furtmann, J. Jose, *Enzyme Microb. Technol.* **2018**, *118*, 1-5.
- [75] D. R. Caldwell, *Wm. C. Brown Publishers* **1995**, 55-59.
- [76] R.J Allen, W. B, *Rep. Prog. Phys.* **2019**, *82*, 1-55.
- [77] E. Hernández-Jiménez, R. Del Campo, V. Toledano, M.T. Vallejo-Cremades, A. Muñoz, C. Largo, F. Arnalich, F. García-Rio, C. Cubillos-Zapata, E. López-Collazo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *441*, 947-952.
- [78] P. W. Ross, *J. clin. Path.* **1971**, *24*, 717-720.
- [79] H. Marcotte, M. C. Lavoie, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **1998**, *62*, 71-109.
- [80] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, P. Stoodley, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95-108.
- [81] J. H. Merritt, D. E. Kadouri, G. A. O'Toole, *Curr. Protoc. Microbiol.* **2005**, *Chapter 1*, Unit 1B 1.
- [82] A. M. Giuliodori, C. O. Gualerzi, S. Soto, J. Vila, M. M. Tavio, *Ann. N Y Acad. Sci.* **2007**, *1113*, 95-104.
- [83] P. Watnick, R. Kolter, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2675-2679.
- [84] P. D. Marsh, *BMC Oral Health* **2006**, *6*, S14.

- [85] Seneviratne C.J., Zhang C.F., S. L.P., *Chin. J. Dent. Res.* **2011**, *14*, 87-94.
- [86] R.Chandki, P. Banthia, R. Banthia, *J. Indian Soc. Periodontol.* **2011**, *15*, 111-114.
- [87] C. A. Fux, J. W. Costerton, P. S. Stewart, P. Stoodley, *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 34-40.
- [88] T. Bjarnsholt, *APMIS Suppl.* **2013**, *136*, 1-51.
- [89] Y. Z. Nira Rabin, Clement Opoku-Temeng, Yixuan Du, Eric Bonsu, H. O. Sintim, *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 493-512.
- [90] T. R. Garrett, M. Bhakoob, Z. Zhang, *Prog. Nat. Sci.* **2008**, *18*, 1049-1056.
- [91] Hannah H. Tuson, D. B. Weibel, *Soft Matter.* **2013**, *9*, 4368-4380.
- [92] Holger Rohde, Johannes K.-M. Knobloch, Matthias A. Horstkotte, D. Mack, *Medical Microbiology and Immunology volume* **2001**, *190*, 105-112.
- [93] Maria Kostakioti, Maria Hadjifrangiskou, S. J. Hultgren, *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2013**, *3*, 1-23.
- [94] M. B. Miller, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 165-199.
- [95] T. C. H, K. S. Koh, C. Xie, M. Tay, Y. Zhou, R. Williams, W. J. Ng, S. A Rice, S. Kjelleberg, *ISME J.* **2014**, *8*, 1186-1197.
- [96] H. C. Flemming, T. R. Neu, D. J. Wozniak, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7945-7947.
- [97] J. N. C. Fong, F. H. Yildiz, *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3*.
- [98] Karatan E, W. P, *Microbio.l Mol. Biol. Rev.* **2009**, *73*, 310-347.
- [99] J. B. Kaplan, *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 205-218.
- [100] M. M. Harriott, M. C. Noverr, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3914-3922.
- [101] P. A. Levin, E. R. Angert, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2015**, *7*, 1-11.
- [102] M. B. Lohse, M. Gulati, A. D. Johnson, C. J. Nobile, *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 19-31.
- [103] J. M. Achkar, B. C. Fries, *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 253-273.

- [104] aM. Pammi, D. Zhong, Y. Johnson, P. Revell, J. Versalovic, *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 390;
bB. M. Peters, M. C. Noverr, *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 2178–2189.
- [105] T. M. Förster, *Cell. Microbiol.* **2016**, *28*, 1709-1715.
- [106] M. M. Harriott, M. C. Noverr, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *53*, 3914–3922.
- [107] E. F. Kong, *mBio* **2016**, *7*, e01365-01316.
- [108] M. Feoktistova, P. Geserick, M. Leverkus, *Cold Spring Harb Protoc.* **2016**, *4*.
- [109] Judith H. Merritt, Daniel E. Kadouri, G. A. O’Toole, *Curr. Protoc. Microbiol.* **2005**, *1*, 1-29.
- [110] J. Robertson, C. McGoverin, F. Vanholsbeeck, S. Swift, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1-13.
- [111] C. Davis, *J. Microbiol. Methods* **2014**, *103*, 9-17.
- [112] J. Tessier, A. R. Schmitzer, *RSC advances* **2020**, *10*, 9420-9430.
- [113] Vuotto C, D. G., *Microbial Biofilms. Methods Mol. Biol.* **2014**, *1147*.
- [114] Brian M. Peters, Raven M. Ward, Hallie S. Rane, Samuel A. Lee, M. C. Noverr, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 74-82.
- [115] C. J. Ioannou, G. W. Hanlon, S. P. Denyer, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 296-306.
- [116] R. Joseph, A. Naugolny, M. Feldman, I. M. Herzog, M. Fridman, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 754-757.
- [117] T. L. Collins, E. A. Markus, D. J. Hassett, J. B. Robinson, *Curr. Microbiol.* **2010**, *61*, 411-416.
- [118] A. Barrios-Gumiel, J. Sanchez-Nieves, J. Perez-Serrano, R. Gomez, F. J. de la Mata, *Int. J. Pharm.* **2019**, *569*, 118591.
- [119] J. Hoque, M. M. Konai, S. Gonuguntla, G. B. Manjunath, S. Samaddar, V. Yarlagadda, J. Haldar, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5486-5500.
- [120] K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238-250.

- [121] M. C. Jennings, L. C. Ator, T. J. Paniak, K. P. C. Minbiole, W. M. Wuest, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2211-2215.
- [122] M. C. Jennings, B. A. Buttaro, K. P. C. Minbiole, W. M. Wuest, *ACS Infect. Dis.*, **2015**, *1*, 304-309.
- [123] Christopher J. Ioannou, Geoff W. Hanlon, S. P. Denyer, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 296-306.
- [124] G. Kampf, A. Kramer, *Clinical Microbiology Reviews* **2004**, *17*, 863-893.
- [125] A. Houari, P. D. Martino, *Lett. App. Microbiol.* **2007**, *45*, 652-655.
- [126] Thomas Böttcher, Ilana Kolodkin-Gal, Roberto Kolter, Richard Losick, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2927-2930.
- [127] M. C. Jennings, L. E. Ator, T. J. Paniak, K. P. C. Minbiole, W. M. Wuest, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2211-2215.
- [128] Jiaul Hoque, Mohini M. Konai, Shanola S. Sequeira, Sandip Samaddar, J. Haldar, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10750-10762.
- [129] L. D. Luca, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *1*, 1-23.
- [130] G. E. Piérard , T. Hermanns-Lê , P. Delvenne, *Expert. opin. Pharmacother.* **2012**, *13*, 1187-1194.
- [131] D. Bansal, V. K. Purohit, *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2013**, *4*, 13-18.
- [132] Mahmoud A. Ghannoum, L. B. Rice, *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 501-517.
- [133] J. Tessier, M. Golmohamadi, K. J. Wilkinson, A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4288-4294.
- [134] K. H. Sreedhara Swamy, M. Sirsi, G. R. R. Rao, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *5*, 420-425.

- [135] Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozaawa S, Y. Tsuji N, agihashi A, W. N., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3113-3117.
- [136] E. El Hammi, E. Warkentin, U. Demmer, F. Limam, N. M. Marzouki, U. Ermler, L. Baciou, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1255-1264.
- [137] Peyton L.R., Gallagher S., H. M., *Drugs Today* **2015**, *51*, 705-718.
- [138] W. H. Organization, *World Health Organization model list of essential medicines: 21st list. Geneva* **2019**.
- [139] S. M. Grant, S. P. Clissold, *Drugs* **1990**, *39*, 877-916.
- [140] aC. R. Elie, A. Hebert, M. Charbonneau, A. Haiun, A. R. Schmitzer, *Org Biomol Chem* **2013**, *11*, 923-928; bClaude-Rosny Elie, Nadim Noujeim, C. Pardin, A. R. Schmitzer, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1788-1790.
- [141] W. Kim, N. Fricke, A. L. Conery, B. B. Fuchs, R. Rajamuthiah, E. Jayamani, P. M. Vlahovska, F. M. Ausubel, E. Mylonakis, *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 257-269.
- [142] A. Basak, Y. Abouelhassan, R. Zuo, H. Yousaf, Y. Ding, R. W. Huigens, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5503-5512.
- [143] P. Sarkar, S. Samaddar, V. Ammanathan, V. Yarlagadda, C. Ghosh, M. Shukla, G. Kaul, R. Manjithaya, S. Chopra, J. Haldar, *ACS Chem. Boil.* **2020**, *15*, 884-889.
- [144] C. R. Elie, G. David, A. R. Schmitzer, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2358-2366.

Chapitre 2 : Synthèse d'agents anti-biofilms dérivés de la molécule antifongique Miconazole

2.0 Préface

Le miconazole, un composé contenant un noyau imidazole, est un puissant agent antimycotique utilisé contre un large éventail de champignons pathogènes et possède également une activité antistaphylococcique. Il a été proposé que le miconazole inhibe la croissance bactérienne et fongique en se liant à la flavohémoglobine, une enzyme impliquée dans la défense bactérienne contre le stress externe. Reconnaisant le pouvoir antibactérien du miconazole, nous avons conçu et synthétisé des analogues de miconazole contenant un fragment imidazolium substitué. La modification structurelle du miconazole a conduit à un composé très puissant pour empêcher la formation et perturber les biofilms bactériens, en raison de l'accumulation dans la matrice du biofilm, de la perméabilisation de la membrane bactérienne et de la génération d'espèces réactives de l'oxygène dans le cytoplasme.

Ma contribution pour cet article a été la réalisation des synthèses organiques et des expériences de biofilm et la rédaction de l'article. Nous tenons à remercier le professeur K. Wilkinson pour l'accès à ses laboratoires tout au long de ce projet. Nous tenons à remercier M. Golmohamadi pour son aide aux niveaux des analyses au microscope ainsi que pour les analyses des pourcentages de mortalité dans les biofilms.

2.0.1 Les liquides ioniques organiques

Un liquide ionique organique (LIO) est défini comme étant une molécule possédant un cation ou un anion organique et dont la température de fusion est inférieure à 100 °C. Ces liquides ioniques sont couramment utilisés dans l'industrie, puisqu'ils possèdent plusieurs avantages.^[1] Tout d'abord, ceux-ci peuvent être utilisés en tant que solvants organiques sécuritaires, puisqu'ils ne s'enflamment pas, contrairement aux solvants classiques tels que l'acétate d'éthyle, l'acétone ou l'hexane. Ils peuvent également être utilisés afin de dissoudre des complexes organo-métalliques et des enzymes.

Ces caractéristiques sont modulables puisqu'un changement au niveau du cation/anion organique peut induire une modification de leurs propriétés physicochimiques.

Ces liquides ioniques organiques ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs, qui se sont penchés sur leurs propriétés antibactériennes.^[2] En effet, un antibactérien ou un antifongique possédant un noyau modulable, tel que le miconazole, peut être transformé en cation organique, permettant ainsi l'utilisation de ces principes actifs sous forme de liquides ioniques. Une réaction d'alkylation du miconazole en présence d'iodure de méthyle, d'éthyle ou de n-butyle leur a ainsi permis d'obtenir de nouveaux agents antifongiques (Figure P2.1).^[3] Les auteurs ont par la suite transformé l'ion iodure en ion PF₆ afin d'obtenir des liquides ioniques organiques stables possédant une activité biologique.

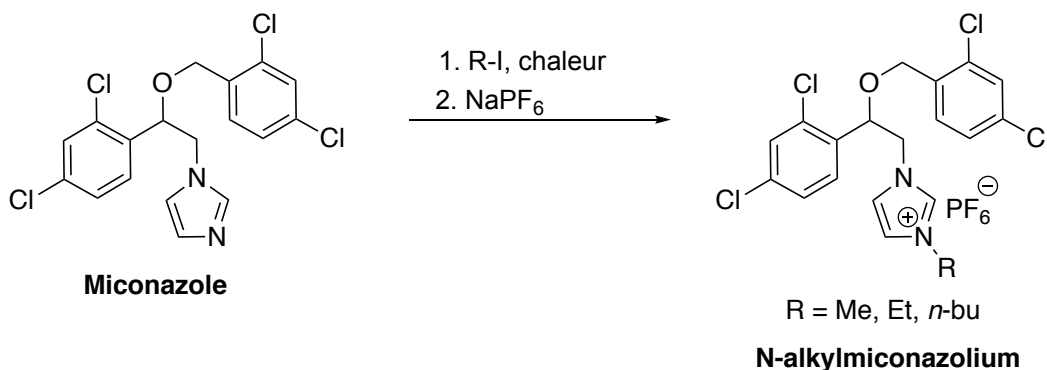


Figure P2.1. Structures des analogues après la réaction d'alkylation du miconazole.

Plus récemment, des études ont montré que les sels d'imidazolium et de pyridinium présentaient également une activité antibactérienne.^[4] Dans ces travaux, deux séries de liquides ioniques à base de cations 1-methylimidazolium et de pyridinium ont été synthétisées afin d'étudier l'effet de différentes longueurs de chaîne alkyle sur leurs propriétés physicochimiques et sur leur activité biologique (Figure P2.2). Bien que la plupart de ces analogues ait une activité antibactérienne, les analogues à plus longue chaîne tel que le C10, C12 et C14 se sont révélés plus efficaces.

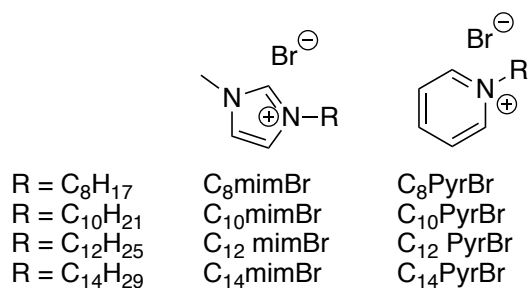


Figure P2.2 Structures des différents sels d'imidazolium et de pyridinium.

De plus, ces cations possédant des chaînes alkyles ont également été utilisés afin de combattre les biofilms.^[5] Dans une étude publiée en 2017, les auteurs ont étudié l'effet de quatre liquides ioniques (Figure P2.3) sur la perturbation de biofilms d'algues marines. La croissance de ces algues ainsi que la formation de biofilm ont été inhibées lors de l'ajout des liquides ioniques. Le composé [C₁₆MIM][Cl] a présenté la meilleure activité en inhibant complètement la formation des biofilms et ce, à de très basse concentration. Le composé [C₄MIM][Cl], quant à lui, a également montré une activité antibiofilm, mais à de plus haute concentration.

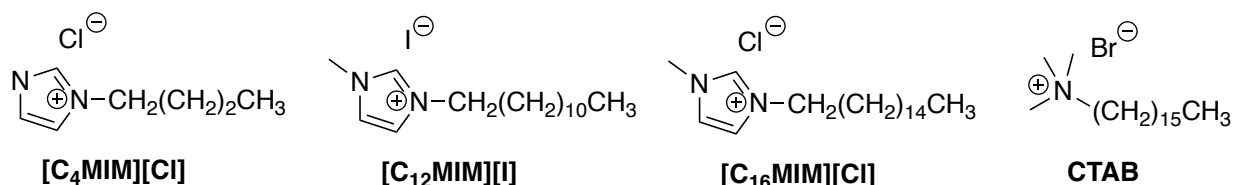


Figure P2.3 Structures des différents sels d'imidazolium et d'ammonium

Ces études nous ont donc permis de comprendre qu'il existe un ratio lipophile/hydrophile, qui doit être respecté afin d'obtenir un composé qui possède des propriétés de perturbations membranaires viable et efficace.

Un composé possédant un caractère cationique trop intense, comme dans le cas des courtes chaînes alkyles, aura une affinité trop élevée avec le milieu aqueux et ne pourra pas s'insérer dans les membranes hydrophobes ou dans les biofilms. En contrepartie, un composé ayant un caractère lipophile trop intense, comme dans le cas de très longues chaînes alkyles, sera souvent peu soluble dans les milieux biologiques et possèdera une interaction avec la membrane trop élevée. Celui-ci ne pourra pas pénétrer à l'intérieur des cellules afin d'y effectuer son action.

Afin de confirmer cette tendance, nous avons reproduit ces travaux pour des sels de miconazolium possédant différentes longueurs de chaînes. L'étude et la comparaison des activités antibactérienne et antibiofilm sont rapportées dans les travaux publiés, présentés dans ce chapitre.

2.0.2 Références

- [1] Z. Lei, B. Chen, Y. M. Koo, D. R. MacFarlane, *Chem Rev* **2017**, *117*, 6633-6635.
- [2] D. Demberelnyamba, K. S. Kim, S. Choi, S. Y. Park, H. Lee, C. J. Kim, I. D. Yoo, *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 853-857.
- [3] J. H. Davis, K. J. Forrester, T. Merrigan, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 8955-8958.
- [4] A. Cornellas, L. Perez, F. Comelles, I. Ribosa, A. Manresa, M. T. Garcia, *J Colloid Interface Sci* **2011**, *355*, 164-171.
- [5] G. K. K. Reddy, Y. V. Nancharaiah, V. P. Venugopalan, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2017**, *155*, 487-496.

Article 1 : Anti-staphylococcal biofilm activity of miconazoctylium bromide

Jérémie Tessier, Mahmood Golmohamadi, Kevin J. Wilkinson and Andreea R. Schmitzer*

Département de Chimie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville,
Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

Organic & Biomolecular Chemistry, **2018**, *16*, 4288-4294

Adapted with minor corrections, with permissions, from *Organic & Biomolecular Chemistry*,
Jérémie Tessier, Mahmood Golmohamadi, Kevin J. Wilkinson and Andreea R. Schmitzer*, "Anti-
staphylococcal biofilm activity of miconazoctylium bromide", **2018**, *16*, 4288-4294

2.1 Abstract

We designed and synthesized miconazole analogues containing a substituted imidazolium moiety. The structural modification of the miconazole led to a compound with high potency to prevent the formation and disrupt bacterial biofilms, as a result of accumulation in the biofilm matrix, permeabilization of the bacterial membrane and generation of reactive oxygen species in the cytoplasm.

2.2 Introduction

Bacterial biofilms are microbial communities held together by an extracellular matrix¹ that is composed of exo-polymeric substances (EPS);² polysaccharides, proteins, lipids, extracellular DNA and other bacterial decomposition substances. The polymers are held together by a complex network of hydrogen bonds, ionic and van der Waals interactions that are crucial for the integrity of the biofilm.^{3a-c} Bacterial biofilms can be found in numerous infections including those occurring in the lungs of cystic fibrosis patients, burns, teeth and ear infections.⁴ Their presence has led to a dramatic enhancement in bacterial resistance to antibiotics. They are a serious health concern as 17 million new biofilm-associated infections occur each year in the United States alone, resulting in up to 550 000 deaths annually.^{5,6} Therefore, there is an increasing interest in developing new strategies and agents to prevent the formation of biofilms or to destroy already formed biofilms. Biofilm formation is a multistep process as shown in **Figure 2.1**. Planktonic bacteria are first thought to attach to an abiotic surface; the attachment becomes irreversible in a second stage. Subsequent steps involve biofilm maturation and growth, which results in the formation of the three-dimensional bacterial community. Bacterial detachment occurs in the last step, when planktonic bacteria are released from the biofilm in order to colonize new sites. Among the different interactions responsible for the formation of biofilms, electrostatic interactions are the earliest forces affecting bacterial adherence to surfaces (**Figure 2.1**).⁷ Since the outer surfaces of biofilms consist of an anionic matrix, it is not surprising that cationic compounds may act as early stage biofilm inhibitors.⁸ Indeed, during the past decade, quaternary ammonium compounds (QACs) have been shown to be potent inhibitors for biofilm formation,⁹ but they have also been shown to be toxic to mammalian cells.¹⁰

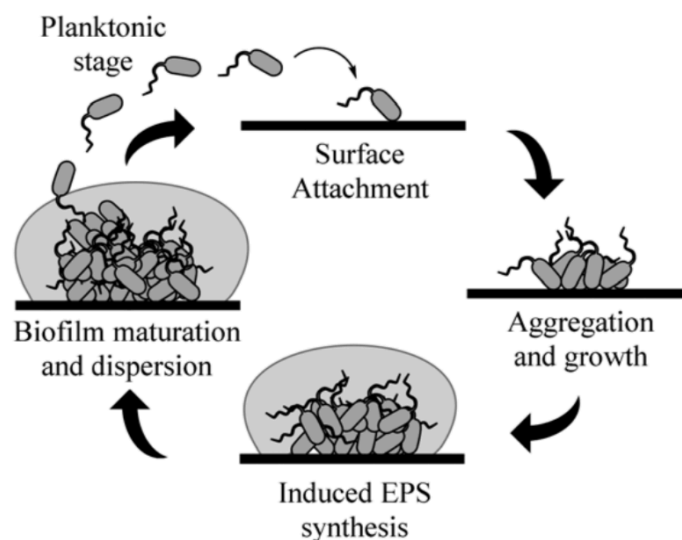


Figure 2.1. Formation, maturation, and dispersion of bacterial biofilms

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a Gram-positive, biofilm forming bacteria responsible for over 50 000 deaths annually in the United States. Furthermore, the emergence of antibiotic-resistant strains such as methicillin-resistant *S. aureus* (*MRSA*) has become a serious concern in clinical establishments since it was associated with viral infections and high levels of mortality.¹¹ The appearance of *MRSA* resistant to benzalkonium chloride (**BAC**),¹² a QAC widely used as disinfectant in hospitals, is now being reported on a regular basis.¹³

Miconazole, an imidazole-containing compound, is a potent antimycotic agent used against a wide range of pathogenic fungi that also possesses antistaphylococcal activity.^{14,15} It was proposed that miconazole inhibits bacterial and fungal growth by binding to flavohemoglobin, an enzyme involved in the bacterial defense against nitrosative stress. Miconazole's action was then related to the production of endogenous reactive oxygen species (ROS) that led to significant cellular structural damage, resulting in cell death.¹⁶ The imidazole ring was proposed to bind the iron centre of the heme moiety of flavohemoglobin resulting in the generation of intracellular ROS that act as nitric oxide dioxygenase inhibitors.¹⁷ Unfortunately, microorganisms rapidly develop resistance to compounds that act on one specific receptor as in the case of miconazole, especially in mixed biofilms.¹⁸ We show here that changing the imidazole ring of the known drug miconazole into an imidazolium cation results in a compound that has both antibacterial/antifungal activity and also anti-biofilm properties.

2.3 Results and discussion

As mentioned above, QACs in general, and **BAC** in particular, can act as anti-biofilm agents by disrupting the interactions of the extracellular DNA and other components of the bacterial EPS. QACs can alter the properties of abiotic surfaces, decreasing their surface tension and therefore preventing the formation of biofilms.¹⁹ With this information in mind, we transformed the imidazole unit of miconazole (**2.4**) into a quaternary amphiphilic imidazolium that should facilitate its penetration of EPS, due to the presence of the positive charge and the lipophilic alkyl chain. All the studied alkylmiconazolium salts (**Figure 2.2**) are also different from miconazole in terms of mechanism of action, because they do not possess the capacity to bind to flavohemoglobin. Also, the longer alkyl chains possess the amphiphilic balance of a QAC and can act as anti-biofilm agent. The antibacterial activity of the alkylmiconazolium bromides was first tested against planktonic Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi and compared to miconazole and **BAC** (**Table 2.1**).

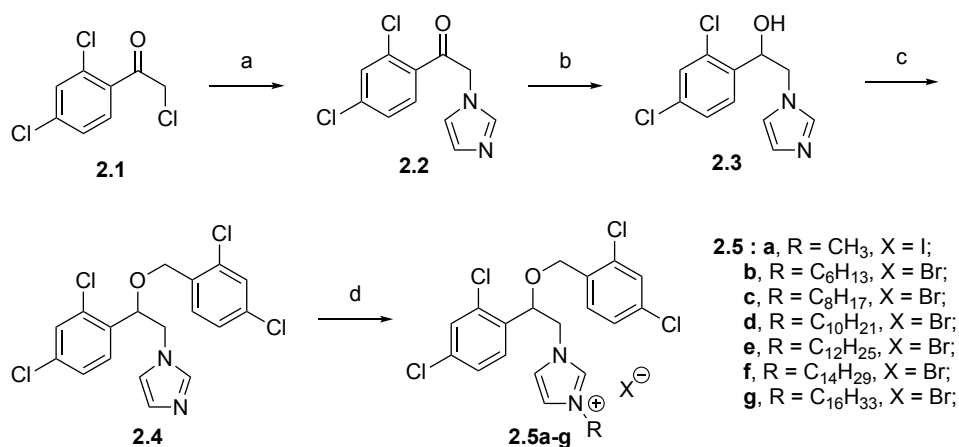


Figure 2.2. Synthesis of alkylmiconazolium salts

Reagents and conditions: (a) 1H-imidazole (3.0 equiv.), CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 72%; (b) NaBH₄, MeOH/CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 77%; (c) NaH, 2,4-dichlorophenylmesylate, DMF, 0 °C, 87%; (d) Alkyl halide, MeCN, 70 °C, 70–95%.

Table 2.1 Minimal concentrations (μM) required to inhibit the growth of different organisms

Antimicrobial	<i>S. aureus</i> ^a (ATCC 43300)	<i>E. coli</i> ^b (MG1655)	<i>C. albicans</i> ^c (SC5314)
Miconazole (2.4)	> 550	> 115	25
(2.5a)	345	> 345	20
(2.5b)	85	50	10
(2.5c)	45	25	2.5
(2.5d)	45	> 345	2.5
(2.5e)	150	> 345	10
(2.5f)	> 345	> 345	> 200
(2.5g)	> 345	> 345	> 200

^a Gram-positive bacteria. ^b Gram-negative bacteria. ^c Yeast. Each value is the mean of at least three independent experiments, each including three replicates for each antimicrobial concentration.

The minimal inhibitory concentrations (MIC)²⁰ of alkyl-miconazolium salts **2.5a–g**, corresponding to the lowest concentration of antimicrobial that resulted in the reduction of the visible growth of planktonic *MRSA* (ATCC 43300), *E. coli* (MG1655) and *C. albicans* (SC5314) are reported in Table 2.1. Miconazoctylium bromide (**2.5c**) was our lead compound since it showed a 12-fold increased inhibition activity compared to miconazole (**2.4**) and a 7-fold increased activity compared to **BAC** on *MRSA*. The higher activity of miconazoctylium bromide (**2.5c**) on *MRSA* cannot be attributed only to its surfactant properties, as it is more active than **BAC**.²¹ At the same time, the absence of free electrons on the imidazole’s nitrogen atom prevents its complexation of the heme. However, the transformation of the imidazole group into an imidazolium cation is not the only parameter responsible for the higher activity of **2.5c**, as analog **2.5a** was 8-fold less active than **2.5c**. The hydrophilic/hydrophobic balance responsible for the penetration and permeabilization of the bacterial phospholipid membrane is also an important factor, as salts **2.5b**, **5c** and **2.5d** were the most active compounds on Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. With these results in hand, we studied the ability of the most active miconazoctylium bromide (**2.5c**) to prevent the formation of *MRSA* biofilms, using a commercially available

fluorescent assay (Baclight Live/Dead) that differentiates between alive intact cells (green) and permeabilized dead cells (red) populations.²² Miconazoctylium bromide (**2.5c**) showed a remarkable biofilm-destruction activity, being able to completely inhibit the biofilm formation at its MIC value (45 μM). In contrast, at the same concentration, miconazole (**2.4**) and **BAC** induced the formation of thicker biofilms, likely due to an increased environmental stress on the bacteria (**Figure 2.3** and **Table 2.2**). Moreover, as shown in **Figure 2.3**, miconazoctylium bromide **2.5c** inhibits the formation of the biofilm in 24 h not only at its MIC concentration, but also at sub-MIC concentrations.

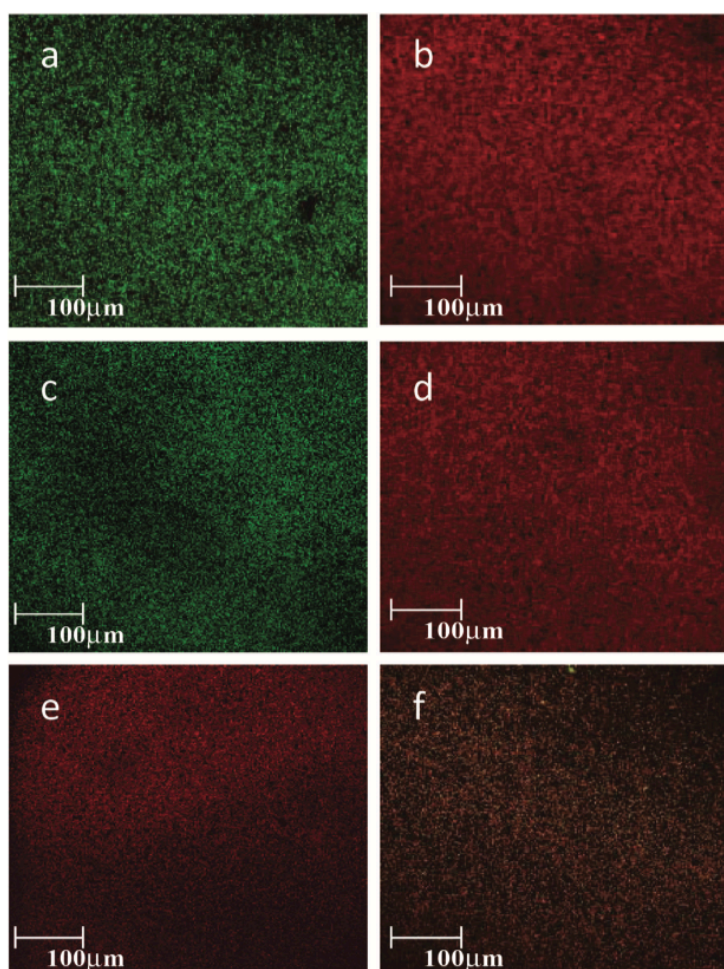


Figure 2.3. *S. aureus* biofilms labeled with Live/Dead stains after a 24 h incubation in growth medium (LB broth). (a) Negative control (DMSO). (b) Positive control (70% ethanol). (c) Miconazole (**2.4**) at 50 μM . (d) Miconazoctylium bromide (**2.5c**) at 50 μM . (e) Miconazoctylium bromide (**2.5c**) at 25 μM . (f) Miconazoctylium bromide (**2.5c**) at 12.5 μM .

Table 2.2. Bacterial mortality after 24 h at different antimicrobial concentrations

Antimicrobial	Concentration (μM)	% Mortality ^a
Miconazole (2.4)	50	27
Miconazoctylium bromide (2.5c)	50	87
	25	76
	12.5	51

^a Dead surface area/live surface area.

Even if some planktonic bacteria were still visible in the aqueous growth medium after 24 h, 50 % biofilm inhibition was achieved at 12.5 μM ($1/4 \times \text{MIC}$). Moreover, miconazoctylium bromide **2.5c** at sub-MIC concentrations completely inhibit the formation of the biofilm after 48 h (**Figure 2.4**). This time-dependent activity can be correlated to an accumulation of **2.5c** into the biofilm due to its lipophilic character.

This lipophilic property could be useful for in the treatment of biofilm-related diseases, because **2.5c** accumulate likely into the biofilm matrix due to its hydrophobicity and may not activate planktonic bacteria resistance mechanism. At lower concentrations ($1/8 \times \text{MIC}$) miconazoctylium bromide **2.5c** did not show significant biofilm-destruction activity, even after 48 h.

The minimal bactericidal concentration (MBC) of **2.5c** was determined by re-culturing broth dilutions that inhibited the growth of the bacteria at and above the MIC. The MBC for **2.5c** was 100 μM .

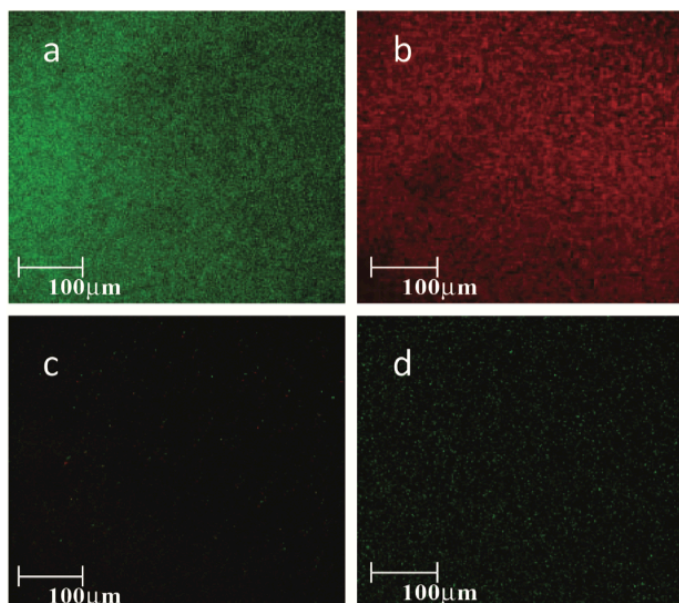


Figure 2.4. *MRSA* biofilms labeled with Live/Dead stains after a 48 h incubation in growth medium (LB broth). (a) Negative control (DMSO). (b) Positive control (70% ethanol). (c) Miconazoylium bromide (**2.5c**) at 25 μM . (d) Miconazoylium bromide. (**2.5c**) at 12.5 μM .

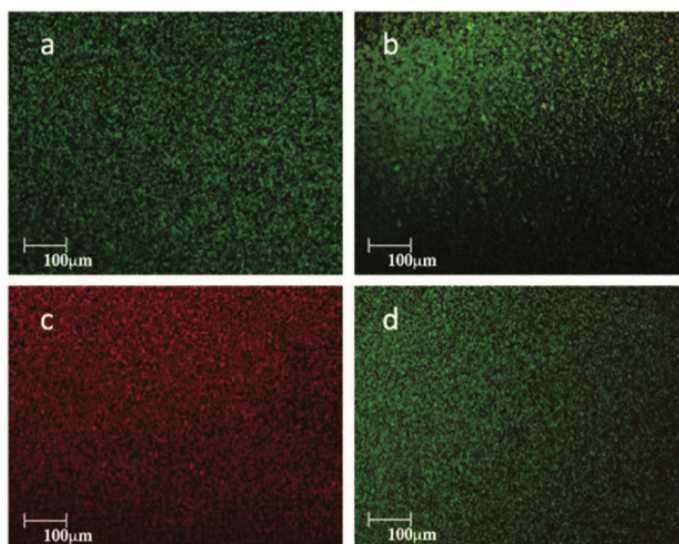


Figure 2.5. Pre-formed *MRSA* biofilms treated with 50 μM antimicrobials in 0.9% NaCl. (a) Negative control (DMSO only, after 24 h). (b) Miconazole (**2.4**) (after 24 h). (c) Miconazoylium bromide (**2.5c**) (after 5 min). (d) Miconazole (**2.4**) (after 48 h).

In contrast to inhibitors, which prevent the formation of biofilms, compounds that eradicate established biofilms at low concentrations are rare. Miconazoctylium bromide (**2.5c**) showed a strong capacity to disrupt pre-formed MRSA biofilms, being able to completely permeate bacterial membranes and disrupt the biofilm after 5 minutes at 50 μM (**Figure 2.5, image c**). At the same concentration, miconazole (**2.4**) had no effect on the pre-formed biofilm, even after 48 h of incubation (**Figure 2.5, image d**).

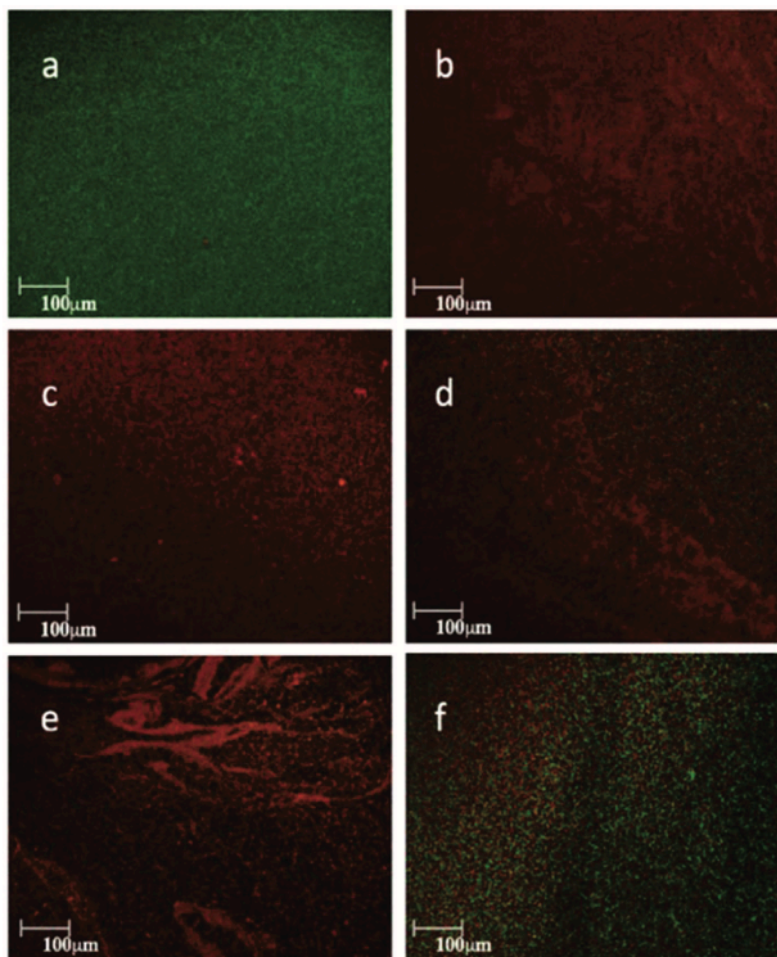


Figure 2.6. Preformed *S. aureus* biofilms treated with different concentrations of miconazoctylium bromide (**2.5c**) over 24 h monitored in 0.9% NaCl solution. (a) Negative control (DMSO only, after 24 h). (b) Positive control (70% ethanol). (c) 25 μM ($1/2 \times \text{MIC}$ after 5 min). (d) 12 μM ($1/4 \times \text{MIC}$ after 30 min). (e) 6 μM ($1/8 \times \text{MIC}$ after 6 h). (f) 3 μM ($1/16 \times \text{MIC}$ after 24 h).

Miconazoctylium bromide (**2.5c**) also showed an excellent ability to disrupt the *MRSA* biofilm at sub-MIC concentrations. For example, about 50% of the bacteria in the biofilm were dead after a 24 h exposure to 3 μM concentration of **2.5c** ($1/16 \times \text{MIC}$). Complete biofilm disruption was observed at 12 μM ($1/4 \times \text{MIC}$) after 30 min and at 6 μM ($1/8 \times \text{MIC}$) after 6 h of incubation (**Figure 2.6** and **Table 2.3**). Exposure to 6 or 12 μM of miconazoctylium bromide (**2.5c**) induced the formation of thicker stripes of colonies in the biofilm, indicating an increased stress on bacteria and increased ROS production (**Figure 2.6e** and **Figure A1.3**).²³

Table 2.3. Bacterial mortality in preformed biofilms at different antimicrobial concentrations

Antimicrobial	Concentration (μM)	Time (h)	Mortality ^a (%)
Miconazole (2.4)	50	24	4
Miconazoctylium bromide (2.5c)	50	0.1	98
	25	0.1	93
	12	0.5	87
	6	6	96
	3	24	57

^a Dead surface area/live surface area.

Once again, at sub-MIC concentrations, the biofilm disruption was time-dependent, indicating the slow penetration and accumulation of **2.5c** in the matrix of the biofilm over time.

If new compounds are identified to be useful as anti-biofilm agents and are in contact with the human body, it is important that they are not toxic to human cells at concentrations they possess anti-biofilm activity. The toxicity of miconazoctylium bromide (**2.5c**), evaluated by monitoring the hemolysis of red blood cells and haemoglobin release, is very low, as only 20% hemolysis was observed even at concentrations 10-fold higher than its MIC (**Figure 2.7**). This low toxicity is very encouraging for the use of this compound for further in vivo studies.

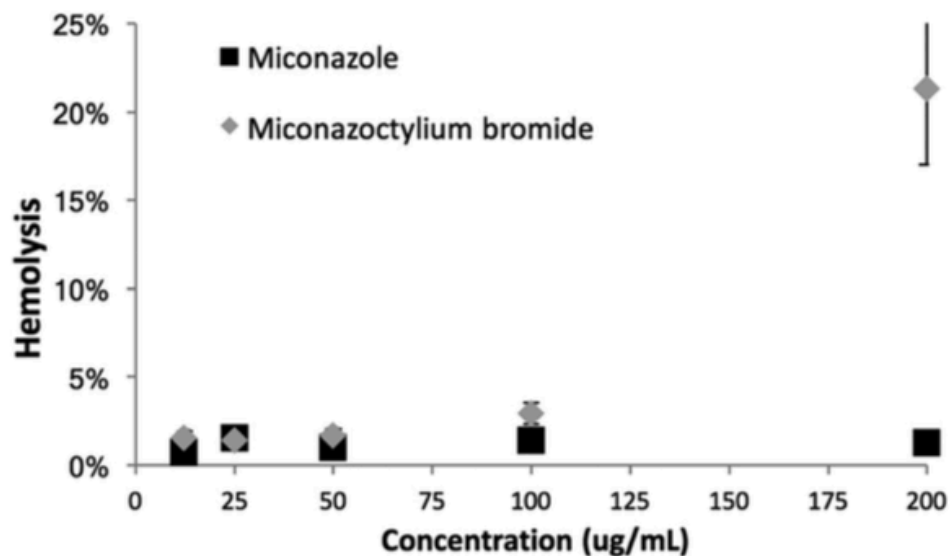


Figure 2.7. Red blood cells hemolysis of compound (2.5c) and miconazole (2.4).

2.4 Experimental

2.4.1 Materials and methods

All starting material, benzalkonium chloride (BAC), and 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) were purchased from Sigma-Aldrich. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in deuterated solvents at 400 and 100 MHz, respectively, on Bruker spectrometers.

2.4.2 Synthesis

The purity of final compounds used in biological assays was determined by ESI/LC-MS analysis (≥95%).

2.4.3 Bacterial strains, culture conditions and viability

MICs were determined on 96-well microtiter plates. Assays were conducted in Lysogeny Broth (LB) medium at 37 °C in triplicate, for three different bacterial inoculations and preculture. Bacterial cell density (OD at 600 nm) was measured using a Fischer Scientific cell density meter model 40. UV-vis and fluorescence spectroscopy experiments were performed on a Tecan Infinite M200 microplate reader. Bacterial cell lysis 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 $OD_{600\text{ nm}} = 0$).

2.4.4 Biofilm inhibition

S. aureus cells were incubated in LB medium at 37 °C for 5 h and rediluted in LB medium to the desired final concentration ($OD_{600\text{ nm}} = 0.1\text{--}0.15$). *S. aureus* biofilms were labeled with Live/Dead stain after 12 h incubation with antibiotics in growth medium (LB broth). Each experiment was performed at least three times.

2.4.5 Biofilm disruption

S. aureus cells were incubated in LB medium at 37 °C for 5 h and rediluted in LB medium to the desired final concentration ($OD_{600\text{ nm}} = 0.1\text{--}0.15$). After an incubation of 12 h in 8-well chambers, the growth media was removed via pipetting and the resulting biofilms were washed 2 times with 0.9% NaCl solution to remove the remaining planktonic cells. Formed *S. aureus* biofilms were treated with antibiotics over a 24 h monitoring in 0.9% NaCl solution. Each experiment was performed at least three times.

2.4.6 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis

Biofilms stained with FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm viability kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd). Briefly, a working solution of fluorescent stains was prepared by adding 1 μL of SYTO® 9 stain and 1 μL of PI stain to 1 mL of filter-sterilized water. Two hundred μL of staining solution were deposited on each well of a 8-well chambered coverglass, after 15 min at room temperature in the dark, samples were washed with sterile saline (0.9% NaCl) from base of the support material. Then, biofilms were examined with a confocal laser microscope (Leica model TCS SP5; Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) using a 20 \times dry objective (HC PL FLUOTAR 20.0 \times 0.50 DRY). A 488 nm laser line was used to excite SYTO® 9, while the fluorescent emission was detected from 500 to 540 nm. PI was sequentially excited with 561 nm laser line and its fluorescent emission was detected from 600 to 695 nm. Each experiment was performed at least three times.

2.4.7 Minimal bactericidal concentration (MBC)

MBCs were determined using LB-agarose plates at 37 °C in triplicate, from three independent inoculations. The MBC was determined by re-culturing broth dilutions (from 96-wells plates assay) that inhibited growth of the bacteria (at and above the MIC). The broth dilutions were streaked onto LB-agar plates and incubated for 24 h. The MBC is the lowest broth dilution of antimicrobial that prevents growth of the organism on the agar plate. The sterility tests used in the MIC assay (LB only) were streaked onto LB-agar plates as an overall negative-control and the bacterial growth tests used in the MIC assay were streaked onto LB-agar plates as a positive-control.

2.4.8 Hemolysis

Fresh human red blood cells (blood type O) purchased from Innovative Research in Alserver's solution were centrifuged 10 min at 300g, washed 3 times with PBS buffer and resuspended in PBS at 2% v/v. In a 96 wells plate were added 195 μ L of red blood cells solution and 5 μ L of compound in DMSO, the plate was incubated with gentle agitation for 1 h at 37 °C. The plate was centrifuged for 10 min at 300g and 50 μ L of the supernatant solution of each well was transferred to another plate. The absorbance was measured at $\lambda = 405$ nm.

2.5 Conclusions

We show here that the transformation of miconazole into a miconazoctylium cation resulted in a more potent compound for disrupting pre-formed biofilms and inhibiting the formation of new *S. aureus* biofilms. Miconazoctylium bromide (**2.5c**) was shown to be effective on *MRSA*, even at very low concentrations (6 μ M). Work is underway in our group to further study the activity of this cationic version of miconazole against a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Although they belong to distinct phylogenetic kingdoms, *S. aureus* and fungus *C. albicans* usually co-exist as complex polymicrobial biofilms within the human host. As we showed here that **2.5c** was also active on *C. albicans*, studies are underway to identify the capacity of miconazoctylium bromide **2.5c** to inhibit and destroy polymicrobial biofilms.

2.6 Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

2.7 Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Université de Montréal for financial support (ARS is the PI for grant 03866). We thank J. N. Pelletier and colleagues from the Département de Chimie– Université de Montréal for access to their laboratories and instruments.

2.8 Notes and references

1. L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton and P. Stoodley, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2004**, *2*, 95–108.
2. C. A. Fux, J. W. Costerton, P. S. Stewart and P. Stoodley, *Trends Microbiol.*, **2005**, *13*, 34–40.
3. (a) P. Watnick and R. Kolter, *J. Bacteriol.*, **2000**, *182*, 2675–2679; (b) H.-C. Flemming, T. R. Neu and D. J. Wozniak, *J. Bacteriol.*, **2007**, *189*, 7945–7947; (c) J. N. C. Fong and F. H. Yildiz, *Microbiol. Spectrum*, **2015**, *3*(2).
4. D. Davies, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2003**, *2*, 114–122.
5. R. J. Worthington, J. J. Richards and C. Melander, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 7457–7474.
6. T. Böttcher, I. Kolodkin-Gal, R. Kolter, R. Losick and J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 2927.
7. (a) G. O’Toole, H. B. Kaplan and R. Kolter, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2000**, *54*, 49–79; (b) L. D. Renner and D. B. Weibel, *MRS Bull.*, **2011**, *36*, 347–355; (c) N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, E. Bonsu and H. O. Sintim, *Future Med. Chem.*, **2015**, *7*, 493–512.
8. (a) E. Bullitt and L. Makowski, *Nature*, **1995**, *373*, 164–167; (b) M. S. Blackledge, R. J. Worthington and C. Melander, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2013**, *13*, 699–706; (c) T. Böttcher, I. Kolodkin-Gal, R. Kolter, R. Losick and J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*,

- 2927–2930; (d) M. S. Ganewatta, K. P. Miller, S. P. Singleton, P. Mehrpouya-Bahrami, Y. P. Chen, Y. Yan, M. Nagarkatti, P. Nagarkatti, A. W. Decho and C. Tang, *Biomacromolecules*, **2015**, *16*, 3336–3344.
9. A. Kugel, S. Stafslie and B. J. Chisholm, *Prog. Org. Coat.*, **2011**, *72*, 222–252.
 10. (a) Y. Xue, H. Xiao and Y. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 3626–3655; (b) L. Chang, J. Wang, C. Tong, L. Zhao and X. Liu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2016**, *133*, 43689.
 11. B. N. Green, C. D. Johnson, J. T. Egan, M. Rosenthal, E. A. Griffith and M. W. Evans, *J. Chiropr. Med.*, **2012**, *11*, 64–76.
 12. G. Kampf and A. Kramer, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2004**, *17*, 863–893.
 13. M. Tandukar, S. Oh, U. Tezel, K. T. Konstantinidis and S. G. Pavlostathis, *Environ. Sci. Technol.*, **2013**, *47*, 9730–9738.
 14. E. F. Godefroi, J. Heeres, J. Van Cutsem and P. A. J. Janssen, *J. Med. Chem.*, **1969**, *12*, 784–791.
 15. (a) J. P. Sung, M. Jan, G. Grendahl, M. Fresno and H. B. Levine, *West. J. Med.*, 1977, *126*, 5-16; (b) P. Nenoff, D. Koch, C. Kruger, C. Drechsel and P. Mayser, *Mycoses*, **2017**, *60*, 552–557.
 16. D. Kobayashi, K. Kondo, N. Uehara, S. Otokozawa, N. Tsuji, A. Yagihashi and N. Watanabe, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, *46*, 3113–3117.
 17. E. El Hammi, E. Warkentin, U. Demmer, F. Limam, N. M. Marzouki, U. Ermler and L. Baciou, *Biochemistry*, **2011**, *50*, 1255–1264.
 18. J. M. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu and L. J. Piddock, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2015**, *13*, 42–51.
 19. M. Simoes, M. O. Pereira and M. J. Vieira, *Water Res.*, **2005**, *39*, 5142–5152.
 20. J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2002**, *49*, 1049–1049.

21. C. J. Ioannou, G. W. Hanlon and S. P. Denyer, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, *51*, 296–306.
22. M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H. U. Weilenmann and T. Egli, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, *73*, 3283–3290.
23. A. M. Giuliadori, C. O. Gualerzi, S. Soto, J. Vila and M. M. Tavio, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2007**, *1113*, 95–104.

Chapitre 3 : Propriétés antibactériennes de plusieurs sels de lutidine-bis-benzimidazolium et l'étude de leur effet sur les biofilms bactériens

3.1 Préface

Nous avons conçu des sels de bis-benzimidazolium disubstitués par la lutidine (noyau lutidine-bis-benzimidazolium avec des chaînes latérales lipophiles octyl, adamantyl et cholestéryle). Par la suite, nous avons testé leur activité antimicrobienne ainsi que leur capacité à inhiber la croissance bactérienne et fongique planctonique. Une fois l'activité antibactérienne étudiée, nous avons regardé la capacité des analogues actifs contre les souches planctoniques à inhiber la formation ou perturber les biofilms de *Staphylococcus aureus* matures résistants à la méthicilline.

Ma contribution pour cet article a été d'aider à la rédaction de l'article ainsi que de réaliser les synthèses organiques et les expériences de biofilm. Nous tenons à remercier Margaux Lecluse qui nous a grandement aidé au niveau des synthèses, des manipulations biologiques et de la rédaction du premier jet de l'article. Nous tenons également à remercier Julien Gravel pour son aide aux niveaux des synthèses et des manipulations en biologie.

Article 2 : Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Disubstituted Bis-benzimidazolium Salts

Jérémie Tessier, Margaux Lecluse, Julien Gravel, and Andreea-Ruxandra Schmitzer*

Département de chimie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal,
Québec, H3C 3J7, Canada

ChemMedChem, **2018**, *13*, 2567–2572

Adapted with minor corrections, with permissions, from *ChemMedChem*, Jérémie Tessier, Margaux Lecluse, Julien Gravel, and Andreea-Ruxandra Schmitzer*, “Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Disubstituted Bis-benzimidazolium Salts”, **2018**, *13*, 1-7.

© 2018, Wiley

3.2 Abstract

The increased prevalence of antibiotic-resistant bacteria is a critical issue for human health. Developing new antibiotic agents is vital for fighting persistent infections and lowering mortality rates. In this study, we designed lutidine-disubstituted bis-benzimidazolium salts (lutidine-bis-benzimidazolium core with octyl, adamantyl, and cholesteryl lipophilic side chains), and tested their antimicrobial activity, their capacity to inhibit planktonic bacterial and fungal growth, and their ability to inhibit the formation of or disrupt mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms. The antibiofilm activity of these salts was analyzed in terms of their lipophilicity, capacity to induce transmembrane ion transport, perturbation of the cellular membrane, and mechanism of action in the phospholipid bilayer. The synthesized compounds were not active against MRSA biofilms, as the formation of transmembrane channels had no effect on the integrity of the extracellular polymeric substance matrix and only octyl and adamantyl derivatives possessed the capacity to inhibit biofilm formation. The synthesized derivatives could be used as lead candidates for the development of anti-MRSA agents.

3.3 Introduction

The design and development of new antibacterial agents is an important challenge, due to the continuous development of antibiotic resistance by bacteria.¹ The overconsumption of antibiotics in both humans and livestock often results in the development of resistance to these potent drugs.² The resulting natural selection induces the appearance of new bacterial strains that are usually more harmful and increasingly difficult to kill.³ Many studies have shown that bacterial resistance can be achieved via several metabolic pathways, such as receptor modification, drug metabolism, or hyperactivation of several transmembrane efflux pumps.^{4,5} The formation of biofilms—an organized group of microorganisms protected by an extracellular polymeric substance (EPS)—is also a common defense mechanism, often associated with chronic infections found in the human body, such as on teeth and ears as well as the lungs of cystic fibrosis patients.⁶ The EPS is mainly composed of carbohydrates, proteins, lipids, and extracellular DNA, making the biofilm a complex architectural network with low antibiotic penetration.

The formation of a biofilm begins with the attachment of planktonic cells to a surface (either biotic or abiotic) via their fimbriae appendages or attachment pili, followed by the self-induced production of EPS matrix that results in an irreversible attachment to the surface that leads to the formation of a stable and resistant biofilm.⁷ The EPS acts as a scaffold for the biofilm structure where the diffusion of nutrients, enzymes, and oxygen is limited, resulting in the formation of heterogeneous stratified zones with different bacterial compositions. The layering process and limited diffusion of drugs into the EPS account for the reduced susceptibility of microorganisms to common antibiotics inside the biofilm.⁸

Many biofilm-forming pathogens are associated with persistent infections; in particular, *Staphylococcus aureus* is responsible for the most common wound infections⁹ while methicillin-resistant *S. aureus* (*MRSA*) infections are associated with high mortality levels.¹⁰ Because the outer surfaces of biofilms consist of an anionic matrix (almost 90%), it is not surprising that cationic compounds act as inhibitors for the formation of *MRSA* biofilms. Quaternary ammonium compounds (QACs) are membrane-permeabilizing agents that are one of the most used antibacterial and antibiofilm agents.¹¹ The energy cost for microorganisms to rebuild a damaged membrane is very high and membrane-permeabilizing agents usually act on the surface of the microorganism, instead of a localized target (e.g., protein or mitochondria); thus, damaged membranes usually lead to fast or immediate cellular death. The mechanism of action of membrane-disruptive agents involves interactions between the agent and the phospholipid bilayer and the formation of structured channels or micelles inside the phospholipid bilayer, leading to alterations in membrane integrity, leakage, and cell death.^{11, 12}

Previous studies by our group have shown that the addition of two phenylethynylbenzyl (PEB) arms to a benzimidazolium cation (**Figure 3.1**) resulted in the formation of self-assembled channels in the phospholipid membranes.¹³ We previously showed that bis-benzimidazolium salts **3.3 a–c** have the ability of inducing electrolytic imbalance and disrupting the integrity and potential of planktonic bacterial membranes.¹⁴ Herein, we were interested to see how the replacement of the PEB arm with octyl, adamantyl and cholesteryl groups changes the mechanism of action on these salts in the phospholipid bilayer and if these compounds are *MRSA* biofilm-active agents.

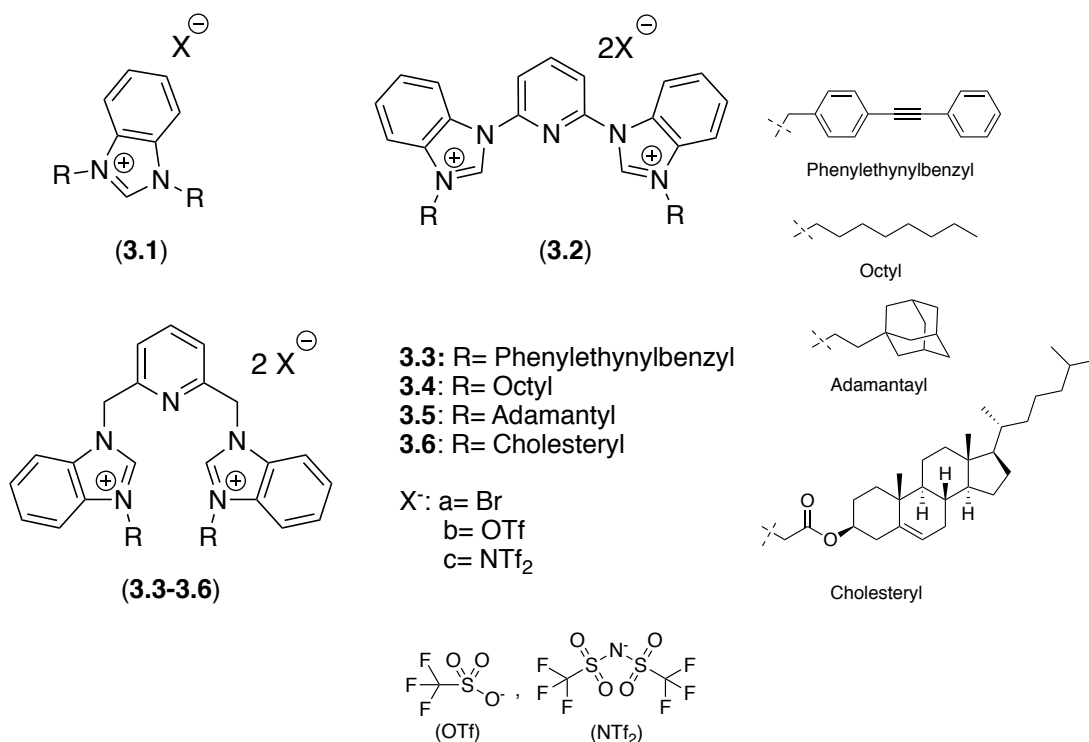


Figure 3.1. Structure of benzimidazolium salts previously reported (**3.1**, **3.2** and **3.3**) and newly studied (**3.4–3.6a–c**).

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Design and synthesis of benzimidazolium salts

New cationic compounds were designed to contain the same lutidine-bis-benzimidazolium core with octyl, adamantyl, and cholesteryl lipophilic side chains. The octyl and adamantyl groups were selected for their lipophilic properties that are similar to those of the PEB group, but without the possibility of self-assembling into channels in the phospholipid bilayer. The cholesteryl group was chosen for its natural presence in biological membranes and high hydrophobicity.¹⁵ We previously showed that the nature of counter-anions can strongly influence the capacity of salt to penetrate and alter the integrity of the phospholipid membrane; this is due to the force and degree of dissociation of the ion pair as well as their hydration, depending on the size and hydrophobicity of the anion. Three different counter-anions, Br (**a**), OTf (**b**), and NTf₂ (**c**); Figure 3.1, were associated with the bis-benzimidazolium cations.

We first investigated their capacity to inhibit planktonic bacterial and fungal growth and their ability to inhibit the formation or disrupt mature *MRSA* biofilms. Secondly, we analyzed the antibiofilm activity of these salts by studying their mechanism of action, capacity to induce transmembrane chloride efflux, and ability to alter the integrity of phospholipid membranes.

3.4.2 Antibacterial and antifungal properties

The minimal inhibitory concentrations (MIC)¹⁶ of the cationic amphiphiles **3.3–3.6** corresponding to the lowest concentration of antimicrobial resulting in a decrease in visible planktonic bacteria or fungi growth are reported in Table 1. Benzalkonium chloride (**BAC**), an amphiphilic compound known for its antimicrobial properties, was used for comparison, as it is widely used in hospitals to prevent bacterial infections.¹⁷ The mechanism of action of **BAC** relies on the disruption of membrane integrity, which leads to phospholipid bilayer perturbation. This perturbation results in membrane weakening that induces intracellular content leakage and ultimately cellular death.¹⁸

Table 3.1. Minimal concentrations required to inhibit microorganism growth.

Table 1. Minimal concentrations required to inhibit microorganism growth.				
Compd	MIC [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^[a]			
	<i>Escherichia coli</i> (SK037) ^[b]	<i>Bacillus thuringiensis</i> (HD73) ^[b]	MRSA (ATCC43300) ^[c]	<i>Candida albicans</i> (SC5314) ^[d]
3.3a	8	8	2.5	> 100
3.3b	10	10	2.5	> 100
3.3c	13	3	2.5	> 100
3.4a	15	72	5	50
3.4b	43	> 100	5	50
3.4c	100	50	5	50
3.5a	10	10	5	100
3.5b	6	6	5	100
3.5c	7	7	5	> 100
3.6a	> 100	> 100	> 100	> 100
3.6b	> 100	> 100	> 100	> 100
3.6c	> 100	> 100	> 100	> 100
BAC	10	25	> 100	50

[a] Values are the mean of at least three independent experiments with three replicates per experiment. [b] Gram-negative bacteria. [c] Gram-positive bacteria. [d] Yeast.

As shown in Table 1, compounds **3.3–3.5a–c** were active against both bacilli and cocci, ranging from excellent to moderate growth inhibition activity. The same **3.3–3.5a–c** salts possessed excellent anti-staphylococcal activity, with inhibition concentrations ranging from 2.5 to 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (compared with 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for vancomycin).¹⁹ The most active compounds, also showing a larger spectrum of activity, were **3.4a** and **3.5a–c**. Cholesteryl analogues **3.6a–c** showed low to no growth inhibitory activity against all tested microorganisms; this lack of activity is possibly due to the high resemblance of these compounds to the hydrophobic part of the phospholipid bilayer where they/if they are able to penetrate/accumulate.

3.4.3 Inhibition of biofilm formation

In view of their antimicrobial activity on planktonic *MRSA* and knowing the ability of this strain to form biofilms in the presence of antibiotics as a defense mechanism,²⁰ we investigated the capacity of the active bis-benzimidazolium salts **3.3–3.5a–c** to inhibit the formation of *MRSA* biofilms and/or disrupt mature biofilms. In general, a bacterial biofilm goes through a four-stage life cycle.²¹ As mentioned before, planktonic bacteria reversibly adhere to biotic or abiotic surfaces. Bacteria that have just adhered to a surface are as vulnerable as planktonic bacteria and it is only a few hours later when they irreversibly develop the EPS matrix.

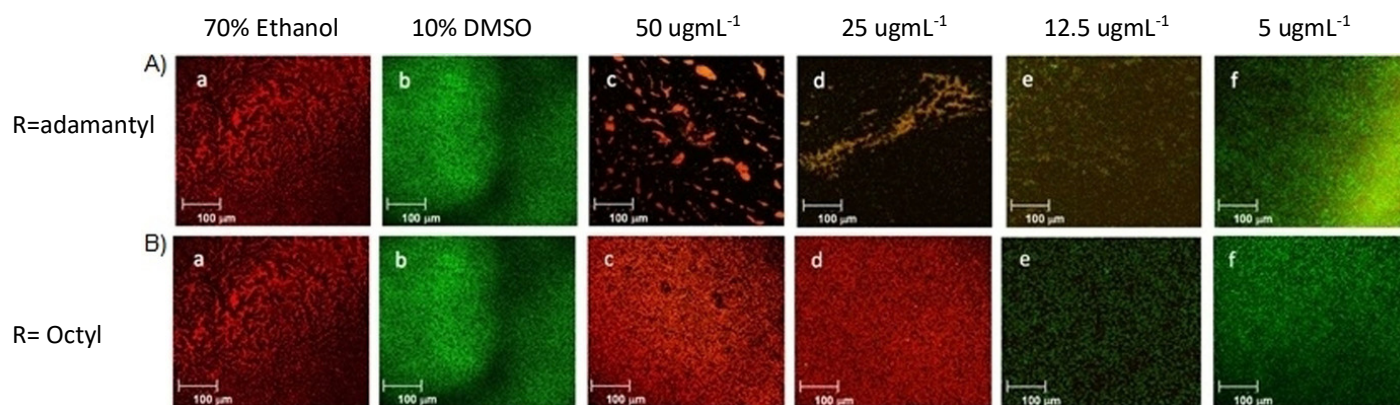


Figure 3.2. *MRSA* biofilms labeled with live (green)/dead (red) cell staining after incubation (24 h) in growth medium with different concentrations of (A) **3.4a** and (B) **3.5a**: (a) negative control (10 % DMSO), (b) positive control (70 % ethanol), (c) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (d) 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (e) 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (f) 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

During this stage, bacteria in the biofilm display the highest resistance to antibiotics, due to the low diffusion of drugs into the matrix.^{8,22} Therefore, we investigated the ability of our compounds to both inhibit biofilm formation and disrupt a mature pre-formed biofilm. For inhibition studies, planktonic bacteria were incubated with the salts and then their effect was analyzed in terms of formation and morphology of the resulting biofilm. First, we monitored the ability of compounds **3.3–3.5a–c** to inhibit the formation of *MRSA* biofilms at their planktonic MIC; however, no inhibition was observed at this concentration (**Figure 3.2f**)

The minimal concentrations that inhibited the formation of *MRSA* biofilms (MBIC) were 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for compounds **3.4a–c** (Figure 3.2 Ac) and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for **3.5a** (Figure 3.2 Bd). Compounds **3.3a–c** exhibited no inhibition of biofilm formation, even at 20-fold of their planktonic MIC, while compounds **3.5b,c** showed poor activity even at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (only 10 % mortality) possibly due to their high hydrophobicity and poor membrane penetration.

3.4.4 Destruction of mature biofilms

As mentioned previously, mature biofilms are generally less susceptible to antibiotics due to their thick EPS layer. During the destruction studies, mature biofilms were kept in contact with the salts in a non-growth media (PBS buffer or NaCl solution). We then analyzed the ability of the salt to penetrate the EPS and cause cellular death within the biofilm, ultimately destroying the mature biofilm. Surprisingly, compound **3.4a** showed complete biofilm disruption at planktonic MIC (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), whereas **3.5a** showed no capacity to disrupt the biofilm at the same concentration (**Figure 3.3** and **Figure 3.4**). At its MIC, **3.4a** completely disrupted the EPS, as no biofilm was observed on the abiotic surface. Even at 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (half of its MIC, compound **3.4a** perturbed biofilm formation, as only 60 % of the surface was covered by biofilm, compared with that of the DMSO control. Biofilm disruption was also confirmed using a crystal violet assay (**Figure 3.3B** and **Figure 3.4B**) to detect any trace of residual biofilm.²³ The minimal biofilm eradication concentration (MBEC) of compound **3.4a** and **3.5a** were 5 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Our results show that compound **3.4a** achieved complete biofilm disruption even at planktonic sub-MIC concentrations, whereas compound **3.5a** only exhibited an ability to penetrate and disrupt the pre-formed biofilm at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4 times its MIC; **Figure 3.4**).

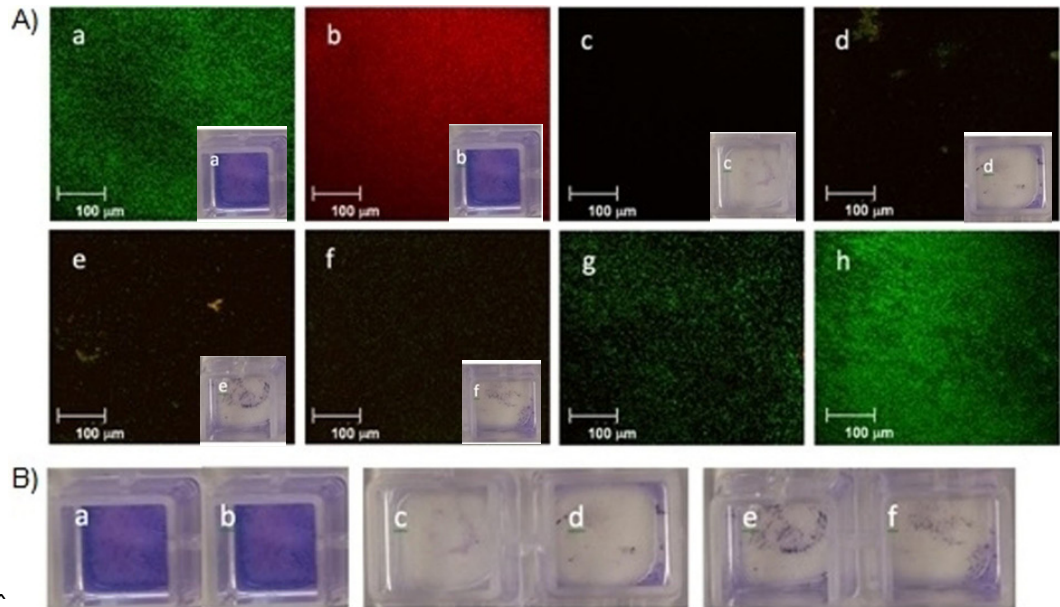


Figure 3.3. Mature *MRSA* biofilms treated with different concentrations of **3.4a** for 24 h in 0.9 % NaCl solution labeled with (A) live/dead cell staining and (B) crystal violet. (A) Live/dead cell staining of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (d) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, (e) $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, (f) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC), (g) $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, and (h) $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ of **3.4a**. (B) Larger pictures of crystal violet assay of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (d) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, (e) $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, (f) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC) of **3.4a**.

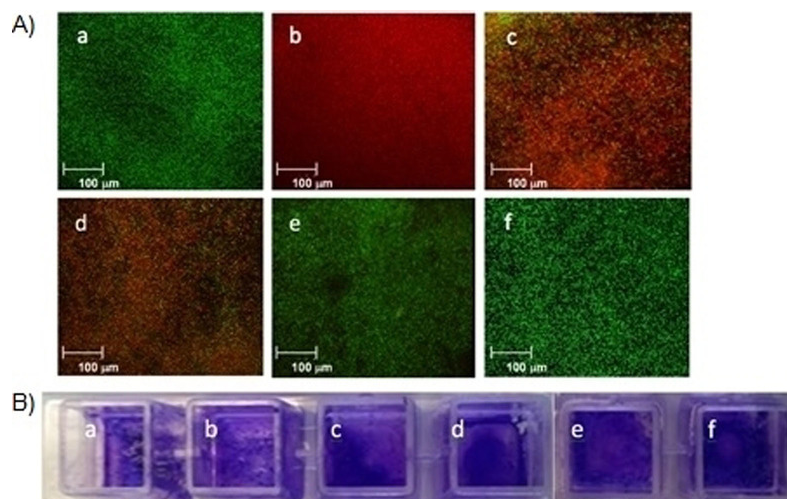


Figure 3.4. Mature *MRSA* biofilms treated with different concentrations of **3.5a** for 24 h in 0.9 % NaCl solution labeled with (A) live/dead cell staining and (B) crystal violet. (A) Live/Dead cell staining of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (d) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, (e) $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, and (f) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC) of **3.5a**. (B) Crystal violet assay of (a) negative control (DMSO only), (b) positive control (70 % ethanol), (c) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, (d) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, (e) $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, and (f) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC) of **3.5a**.

3.4.5. Mechanism of action

To understand the origin of antimicrobial activity of these compounds and their ability to affect biofilm integrity, we studied their interaction with simple phospholipid bilayers. We previously demonstrated that the antibiotic activity of benzimidazolium salts can be correlated with their ion transmembrane activity, as these anionophores mainly transport chloride across phospholipid membranes, inducing membrane depolarization.¹⁴ Synthetic liposomes are good models of biological membranes as they are composed of a unique phospholipid bilayer and do not contain any membrane proteins or efflux pumps that microorganisms could use as defense mechanisms.²⁴ First, we investigated the transmembrane chloride transport capacity of the compounds using egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) liposomes.

Chloride transmembrane transport was measured using the fluorescent probe lucigenin, which was incorporated in chloride-containing (NaCl solution) synthetic liposomes. Lucigenin fluorescence is quenched in the presence of chloride and when a compound that can perturb the phospholipid bilayer is added to the chloride-deprived external solution (NaNO₃ buffer), chloride efflux occurs and the internal chloride concentration decreases. The increase in lucigenin fluorescence can be monitored and correlated with the capacity of the compounds to induce chloride transmembrane transport.²⁵ The chloride efflux induced was monitored at 5 μg mL⁻¹ of the salt (20 mol % relative to the EYPC) for 300 seconds at room temperature (**Figure 3.5**).

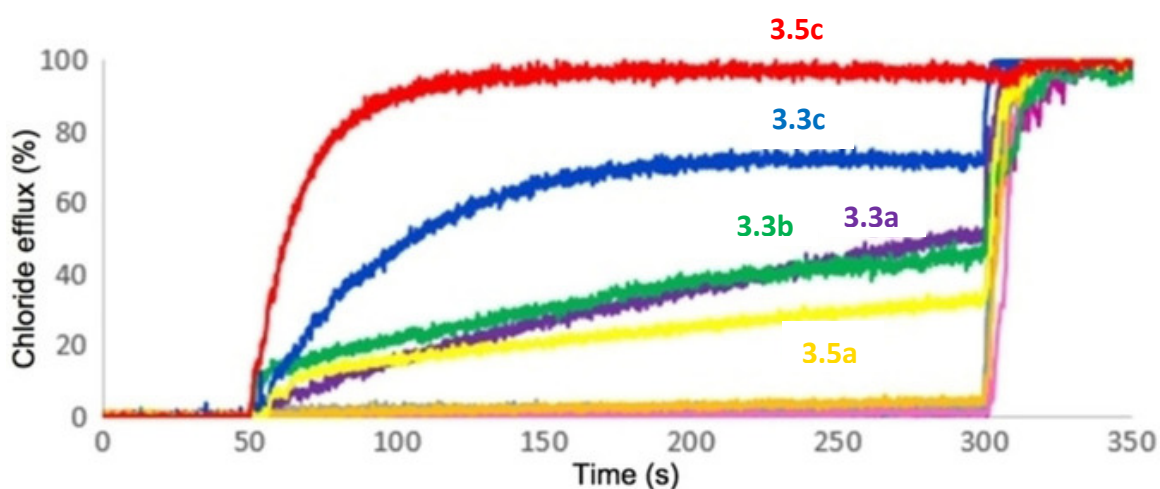


Figure 3.5. Chloride transport induced by compounds **3.3–3.6** at 20 mol % in EYPC liposomes.

As previously reported, compounds **3.3a–c** showed good chloride efflux at 5 μg mL⁻¹ (Figure 3.5). At the same concentration, **3.5c** was the most active compound for chloride transport, where 95 % of chloride was effluxed in the experimental conditions. Compounds **3.4a–c** did not show any chloride transport activity, even compound **3.4a** that showed good antibiotic activity against planktonic bacteria and MRSA biofilms. These results suggest that the antibacterial activity of **3.4a** is not the result of electrolyte imbalance due to ion transport, but mostly through the disruption of bacterial membranes.

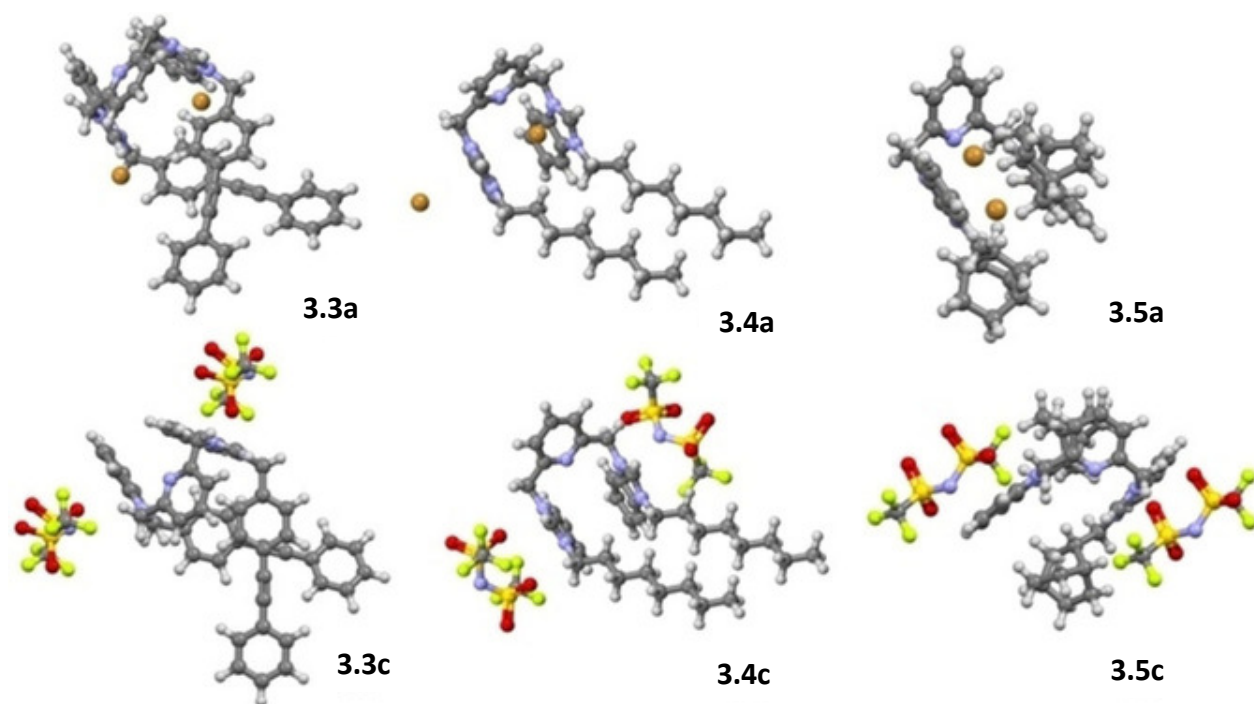


Figure 3.6. Energy-minimized conformations using the PM6 method (MOPAC2009TM; ©Stewart Computational Chemistry).

Molecular modeling performed on the bis-benzimidazolium salts showed that compounds **3.3c** and **3.5c** possess a similar conformation of the benzimidazolium cations around the lutidine core, creating a positive binding pocket where chloride can be complexed (**Figure 3.6**). At the same time, the NTf_2 anions were located outside this binding cavity, as opposed to the bromide and triflate anions that were positioned inside the cavity. The hydrophilic pockets of compounds **3.4a–c** were very different in size and conformation, possibly induced by the alignment of the octyl chains to form van der Waals interactions (**Figure 3.6**).

The inability of compounds **3.4a–c** to transport chloride may be the result of weak binding or a different mechanism of action in the membrane. We previously demonstrated that compounds **3.3a–c** form transmembrane channels in the phospholipid bilayer that ions can use to travel from one side of the membrane to the other.¹⁴ We also showed that compounds **3.5a–c** act as mobile carriers while transporting chloride through phospholipid membranes.²⁶ Compound **3.4a** forms large spherical aggregates in water, which is not surprising as they possess an amphiphilic character and a similar structure to BAC.

Possessing similar hydrophobicity, compounds **3.3–3.5a–c** probably penetrate the phospholipid bilayer with the same efficiency, but their mode of action once in the bilayer is responsible for their antimicrobial and/or antibiofilm properties (Table 2).

Table 3.2. Calculated $\log P$ and proposed mechanism of action (MoA) in the membrane.

Table 2. Calculated $\log P$ and proposed mechanism of action (MoA) in the membrane.		
Compd	$\log P^{[a]}$	MoA
3.3a	-0.62	Transmembrane channel
3.3b	+1.83	
3.3c	+2.51	
3.4a	-1.52	Aggregates
3.4b	+0.82	
3.4c	+1.6	
3.5a	-1.43	Mobile transporter
3.5b	+0.27	
3.5c	+1.88	
3.6a	+9.31	No action
3.6b	+7.1	
3.6c	+11.2	

[a] Calculated with ChemAxon software (<http://www.chemaxon.com/products/calculator-plugins/logp/>).

By forming transmembrane channels in planktonic bacterial membranes, compounds **3.3a–c** possess the capacity to cause electrolyte imbalances due to the induced ion flow. However, once in the biofilm matrix, a channel opening cannot create an ion flow in the solid environment, which may explain the lack of antibiofilm activity of **3.3a–c**, despite their antimicrobial activity in solution. Compounds **3.5a–c** act as mobile carriers²⁶ and may also have a limited diffusion rate in the biofilm matrix, especially in a mature biofilm. The formation of aggregates in the case of compound **3.4a** may result in strong penetration of the EPS, extraction of anionic biopolymers, and destruction of the biofilm.

3.4.6 Toxicity evaluation

When new compounds are identified as antibiofilm agents that will be in contact with the human body, it is important that these compounds are not toxic to human cells at concentrations that are relevant for their antibiofilm activity. The toxicity of compounds **3.3–3.5a–c** was evaluated by monitoring the hemolysis of red blood cells (Annexe, Figures A2.8-A2.10). All tested compounds showed very low hemolytic activity around their MIC value and only compounds **3.3a–c** showed increased hemolytic activity at higher concentrations. Compounds **3.4a–c** showed low to no hemolytic activity even at 10-fold their MIC, while **3.5a–c** showed less than 30 % hemolytic activity at 5-fold their MIC.

3.5 Conclusions

We synthesized and studied different bis-benzimidazolium salts that exhibited different membrane properties. Depending on their mode of action in phospholipid bilayers, these salts can act as antimicrobials and antibiofilm agents. The only compounds that possessed the capacity to inhibit biofilm formation were the octyl and adamantyl derivatives, while only the octyl analogue was able to disrupt mature biofilms. The mechanism of action of the octyl analogue, which acted as a surfactant, was the most active on the biofilm matrix. Our study provides new insight for developing novel strategies of combating bacterial resistance and mature biofilms.

3.6 Experimental Section

See annexe 2

3.7 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

3.8 References

1. S. R. Palumbi, *Science* **2001**, *293*, 1786–1790.
2. R. S. Singer, R. Finch, H. C. Wegener, R. Bywater, J. Walters, M. Lipsitch, *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 47–51.

3. J. L. Martínez, *Science* **2008**, 321, 365–367.
4. L. A. Dever, T. S. Dermody, *Arch. Intern. Med.* **1991**, 151, 886–895.
5. M. Gambino, F. Cappitelli, *Biofouling* **2016**, 32, 167–178.
6. D. Davies, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 114–122.
7. J. N. C. Fong, F. H. Yildiz, *Microbiol. Spectr.* **2015**, 3. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014
8. N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, 35, 322–332.
9. N. K. Archer, M. J. Mazaitis, J. W. Costerton, J. G. Leid, M. E. Powers, M. E. Shirtliff, *Virulence*. **2011**, 2, 445–459.
10. B. N. Green, C. D. Johnson, J. T. Egan, M. Rosenthal, E. A. Griffith, M. W. Evans, *J. Chiropr. Med.* **2012**, 11, 64–76.
11. a) J. G. Hurdle, A. J. O’Neill, I. Chopra, R. E. Lee, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 9, 62–75; b) C. P. Gerba, *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, 81, 464–469.
12. T. Javanbakht, S. Laurent, D. Stanicki, K. J. Wilkinson, *PLoS One* 2016, 11, ne0154445.
13. C. R. Elie, A. Hebert, M. Charbonneau, A. Haiun, A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 923–928.
14. C. R. Elie, G. David, A. R. Schmitzer, *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 2358–2366.
15. a) R. A. Cooper, *J. Supramol. Struct.* **1978**, 8, 413–430; b) C. F. Chew, A. Guy, P. C. Biggin, *Biophys. J.* **2008**, 95, 5627–5636; c) E. Durand, R. F. Jacob, S. Sherratt, J. Lecomte, B. Baréa, P. Villeneuve, R. P. Mason, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2017**, 119, 1600397.
16. J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49, 1049.
17. M. Tandukar, S. Oh, U. Tezel, K. T. Konstantinidis, S. G. Pavlostathis, *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 9730–9738.

18. G. McDonnell, D. Russell, *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 147– 179.
19. V. Prakash, J. S. Lewis, J. H. Jorgensen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 4528.
20. K. H. Dakheel, R. Abdul Rahim, V. K. Neela, J. R. Al-Obaidi, T. G. Hun, K. Yusoff, *BioMed Res. Int.* 2016, **2016**, 1– 14.
21. N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, H. O. Sintim, *Future Med. Chem.* **2015**, 7, 493– 512.
22. L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, P. Stoodley, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 95– 108.
23. W. Kueng, A. E. Silber, U. Eppenberger, *Anal. Biochem.* **1989**, 182, 16– 19.
24. A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, 8, 102– 110.
25. J. T. Davis, O. Okunola, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3843– 3862.
26. J. Gravel, A. R. Schmitzer, *Supramol. Chem.* **2015**, 27, 364– 371.

Chapitre 4 : Propriétés antibactériennes de deux nouvelles générations de sel de benzimidazolium et l'étude de leur effet sur les biofilms bactériens

4.1 Préface

Ici, nous montrons que les sels de benzimidazolium avec diverses chaînes latérales flexibles ou rigides agissent comme des agents antibiotiques et antibiofilm puissants. Nous montrons que leur activité antibiofilm est due à leur capacité à détruire la matrice du biofilm et les membranes cellulaires bactériennes. Ces composés sont capables d'éviter la formation de biofilms et de disperser des biofilms matures montrant une utilisation universelle dans le traitement des infections associées aux biofilms.

Ma contribution pour cet article a été de développer le projet, d'aider à la rédaction de l'article ainsi que de réaliser les synthèses organiques et les expériences de biologie.

Article 3 : Benzimidazolium salts prevent and disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms

Jérémie Tessier and Andreea-Ruxandra Schmitzer*

Département de Chimie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville,
Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

RSC Adv., **2020**, 10, 9420

Adapted with minor corrections, with permissions, from *RSC advances*, Jérémie Tessier and Andreea R. Schmitzer*, “Benzimidazolium salts prevent and disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms”, **2020**, 10, 9420.

© 2020, The Royal Society of Chemistry

4.2 Abstract

Emergence of resistant bacteria encourages us to develop new antibiotics and strategies to compensate the different mechanisms of resistance they acquire. One of the defense mechanisms of resistant bacteria is the formation of biofilms. Herein we show that benzimidazolium salts with various flexible or rigid side chains act as strong antibiotic and antibiofilm agents. We show that their antibiofilm activity is due to their capacity to destroy the biofilm matrix and the bacterial cellular membranes. These compounds are able to avoid the formation of biofilms and disperse mature biofilms showing an universal use in the treatment of biofilm-associated infections.

4.3 Introduction

For several years now, researchers have been studying the increase of bacterial resistance,^{1, 2} which plays an increasingly important role in chronic diseases, namely in lung infection and inflammation.³ Death related infections caused by Gram-positive resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) are now a major concern in hospital environments.^{4, 5} In addition to developing resistance in their planktonic form, this specific strain of bacteria is known to form biofilms.⁶

These biofilms are microbial communities attached to a surface and protected from the external environment by a matrix named extracellular polymeric substance (EPS).⁷ This matrix is composed of polysaccharides, DNA and proteins, surrounded by channels responsible for air, water and nutrients transport into the entire biofilm. This mixture of biopolymers and nutrients provides a viable environment for any microorganism to survive and proliferate. While in the biofilms, bacteria are less sensitive to antibiotics and antimicrobials due to the limited permeation of these compounds into the biofilm and impossibility to reach their site of action. Development of compounds able to destroy the biofilm matrix and possessing bacterial membrane permeation properties and antibacterial properties at the same time seems a good strategy to eradicate these *MRSA* biofilms.

The formation of a biofilm is a multistep process which involves four different stages.⁸ First, the planktonic bacteria attach to an abiotic or biotic surface. In a second stage, the attachment of the planktonic bacteria to a surface becomes irreversible because of the synthesis of surface proteins, and then bacterial proliferation can occur.⁹ Subsequent steps involve biofilm maturation and growth, which results in the formation of a bacterial community embedded in the EPS. The detachment of the microorganisms from the biofilm occurs in the last step where planktonic bacteria are released from the biofilm matrix in order to colonize new sites and enlarge the overall structure of the biofilm. Once a biofilm has reached maturity, the bacteria trapped inside the protective layer are less accessible for antibiotics.

As the negatively charged extracellular DNA is a major component of these biofilms' matrix,^{10, 11} many new cationic amphiphile agents have been designed to interact with the DNA and achieve a biofilm penetration/destruction. Recent synthesis of cationic polymers,¹²⁻¹⁴ cationic peptides,¹⁵ cationic pillararenes,¹⁶ cationic porphyrins,¹⁷ cationic dendrimers,¹⁸ biomimetic biguanidinylated polyamines,¹⁹ and amphiphilic small molecules²⁰ showed interesting results toward the inhibition of biofilm formation and its destruction.

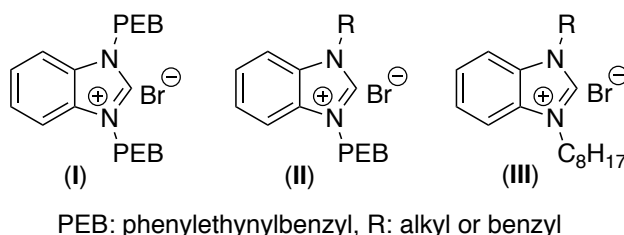


Figure 4.1. Structure of different generation benzimidazolium salts

Commercially available quaternary ammonium salts and benzalkonium chlorides (**BAC**) in particular, disrupt the interactions of the extracellular DNA and other components of the bacterial EPS, induce bacterial death, while showing very low toxicity on eukaryotic cells.²¹ We previously showed that **BAC** has no activity on *MRSA* biofilms, even at concentrations higher than its planktonic MIC (330 $\mu\text{g}/\text{mL}$).²²

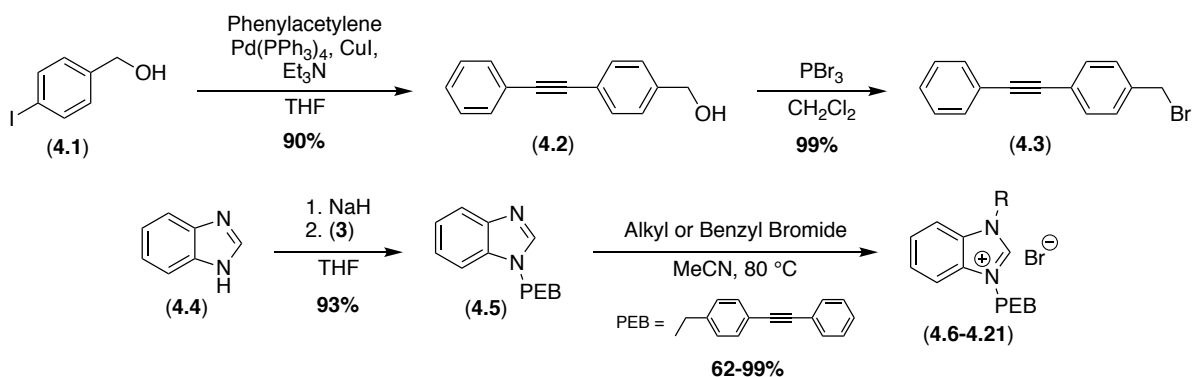
We previously designed and studied amphiphilic benzimidazolium salts with various flexible or rigid side chains that showed better antibiofilm activities than **BAC**.^{21,22} Herein, we modified the previously reported *bis*-phenylethynylbenzyl (*bis*-**PEB**) benzimidazolium motif (**I**) that showed very good planktonic antimicrobial activity, but modest antibiofilm activity,^{21, 22} due to their property to self-assemble in channel-like aggregates. The π -stackable *bis*-**PEB** moiety allows the formation of empty channels inside the bacterial membranes which leads to electrolytic imbalance and causes bacterial death.^{21, 22} Once formed inside the biofilm, these channels have low probability to affect the overall electrolytic potential of the isolated biofilm system, which leads to a low or no antibiofilm activity. Benzimidazolium-based mobile synthetic transporters which have very low mobility inside the well packed and organized biofilm matrix also showed only modest antibiofilm activity.²³

4.4 Results and discussion

We designed and synthesized new amphiphilic analogues in order to decrease their self-assembling properties and increase their biofilm penetration (**Figure 4.1**) while keeping an overall molecular rigidity. The general synthetic routes for these compounds are summarized in **figure 4.2**. With this synthetic method, we were able to synthesize a library of compounds bearing different aromatic and aliphatic groups side chains. We substituted one of the highly π -stackable PEB side chain with various benzyl derivative (**II**) in order to maintain their global hydrophobicity while reducing their channel formation potential.

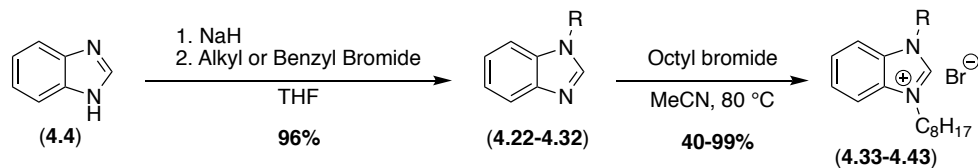
We first investigated the ability of the rigid benzimidazolium salts (**II**) to kill planktonic bacteria (**Table 1**). Most of the newly synthesized compounds showed good antimicrobial activity compared to the previously reported generation (**I**) or commercially available **BAC** on all the studied bacterial stains. Compounds **4.11** and **4.14** possess not only activity on planktonic Gram-positive bacteria (*MRSA* and *VRE*) similar to compound **4.6**, but also a 4-fold increased activity on Gram-negative bacteria. Gram-negative bacteria possess an outer membrane acting as an extra protective layer that usually reduces the antibacterial power of synthetic compounds.²⁵

Generation (II)



4.6 (R = phenylethynylbenzyl), 4.7 (R = benzyl), 4.8 (R = 4-methylbenzyl), 4.9 (R = 4-fluorobenzyl), 4.10 (R = 4-chlorobenzyl), 11 (R = 4-bromobenzyl), 4.12 (R = 4-iodobenzyl), 4.13 (R = 4-(trifluoromethyl)benzyl), 4.14 (4-*tert*-butylbenzyl), 4.15 (R = 4-phenylbenzyl), 4.16 (R = 3,5-(trifluoromethyl)benzyl), 4.17 (R = 4-piperonylbenzyl), 4.18 (R = 3,5-methoxybenzyl), 4.19 (R = 4-(trifluoromethoxy)benzyl), 4.20 (R = 4-(methylester)benzyl), 4.21 (R = C₈H₁₇)

Generation (III)

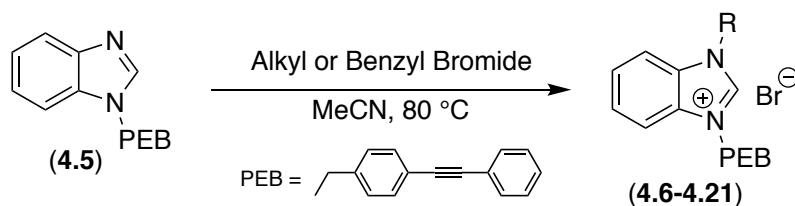


4.33 (R = CH₃), 4.34 (R = C₈H₁₇), 4.35 (R = benzyl), 4.36 (R = 4-methylbenzyl), 4.37 (R = 4-fluorobenzyl), 4.38 (R = 4-chlorobenzyl), 4.39 (R = 4-bromobenzyl), 4.40 (R = 4-iodobenzyl), 4.41 (R = 4-(trifluoromethyl)benzyl), 4.42 (R = 4-*tert*-butylbenzyl), 4.43 (R = 4-phenylbenzyl)

Figure 4.2. Synthesis of second and third generation analogues

Our new analogues may act on the outer cellular membrane inducing its permeabilization. In addition to their interesting antibacterial activity, these new analogues show low toxicity on red blood cells (**Table 4.1**, HC₅₀ values). Indeed, we observed different specificities of these compounds on *MRSA*, versus red blood cells. We recently showed that the addition of an octyl chain to the benzimidazole fragment of miconazole increased the capacity of these drugs to penetrate phospholipid membranes and increased their antimicrobial activities.²⁴ In this regard we synthesized a semi-rigid analogue (**4.21**) bearing one octyl chain and one PEB.

Table 4.1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of semi-flexible benzimidazolium salts
(generation II)



Antimicrobials	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				HC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	(-R)	MRSA	VRE	<i>E. coli</i>	
BAC	-	100	-	100	95
4.6	phenylethynylbenzyl	1.25	1.25	100	70
4.7	benzyl	5	20	50	200
4.8	4-methylbenzyl	4	10	20	200
4.9	4-fluorobenzyl	5	10	25	200
4.10	4-chlorobenzyl	2.5	5	20	200
4.11	4-bromobenzyl	1.25	5	10	120
4.12	4-iodobenzyl	2.5	5	25	145
4.13	4-(trifluoromethyl)benzyl	2.5	5	20	95
4.14	4- <i>tert</i> -butylbenzyl	1.25	2.5	25	60
4.15	4-phenylbenzyl	1.25	1.25	100	70
4.16	3,5-(trifluoromethyl)benzyl	2.5	2.5	20	120
4.17	4-piperonylbenzyl	5	10	50	150
4.18	3,5-methoxybenzyl	5	10	50	200
4.19	4-(trifluoromethoxy)benzyl	5	5	10	140
4.20	4-(methylester)benzyl	5	10	50	200
4.21	octyl	2	2.5	10	50

MRSA = Methicillin-resistant *S. aureus* (ATCC 43300), VRE = vancomycin-resistant *E. faecium* (BAA-2316), *E. coli* (ATCC 25922), HC₅₀: concentration of the antimicrobials at which 50% of human red blood cells get lysed.

This new compound also showed general antibacterial activity, and low toxicity similar to **4.6**, but also a lower selectivity compared to **4.11**. With these results in hand, we studied the ability of the most active compounds **4.11**, **4.14**, and **4.21** to prevent the formation of MRSA biofilms using a commercially available fluorescent assay (*Baclight Live/Dead*).²⁶

Simultaneously, we studied the effect of these analogues on the morphology of the biofilms using scanning electron microscopy (SEM). Using these two techniques, we were able not only to measure the bacterial Live/Dead ratio in the biofilm, but we were also able to observe the effect of those compounds on the spatial organization of the bacterial communities inside the biofilm (**Figure 4.3**).²⁷

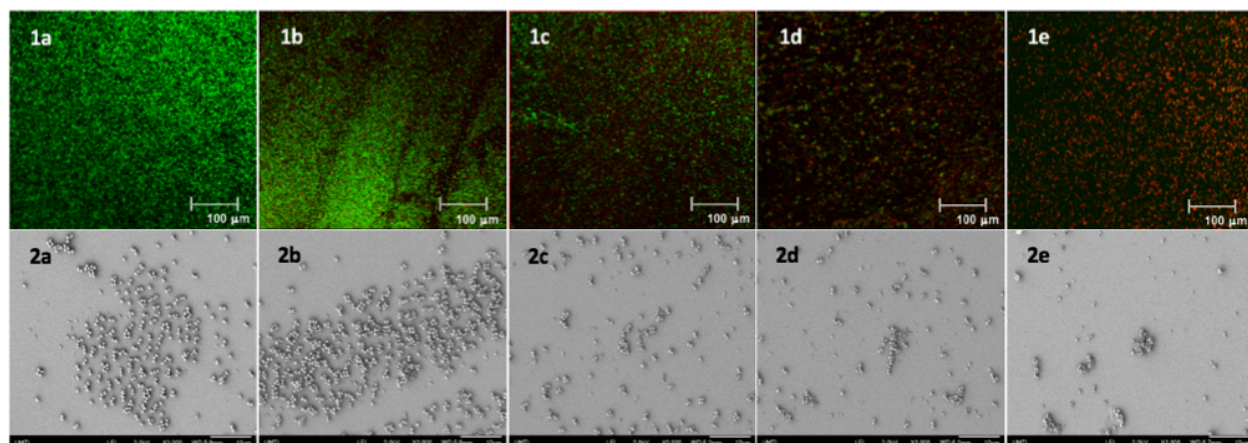


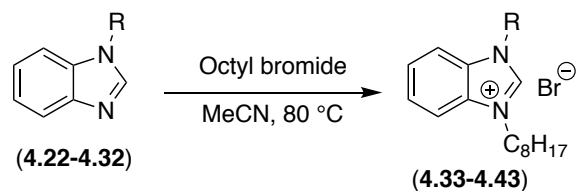
Figure 4.3. (top) *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after a 12 h incubation at the MIC concentration of the generation II antimicrobials. 1a) Negative control (DMSO); 1b) Compound **4.6** (PEB); 1c) Compound **4.11** (4-Bromo); 1d) Compound **4.14** (4-*tert*-butyl); 1e) Compound **4.21** (octyl); (bottom) SEM images of *MRSA* biofilms after a 12h incubation with MIC concentration of the antimicrobials. 2a) Negative control (DMSO); 2b) Compound **4.6**; 2c) Compound **4.11**; 2d) Compound **4.14**; 2e) Compound **4.21**.

Confocal and SEM images of an untreated bacterial biofilms showed the formation of well-defined and homogenous biofilms (**Figure 4.3**, 1a, 2a). Once treated with compound **4.6** at its MIC, a stripe organization is observed (**Figure 4.3**, 1b and 2b). This change of morphology is the consequence of the bacterial stress response inside the biofilm. This change of morphology is the consequence of the bacterial stress response inside the biofilm. When treated with **6**, the bacteria regroup to form a tighter and stronger biofilm, decreasing the ability of the antibiotic to penetrate. As we previously showed, a 20-fold MIC concentration is needed for this type of synthetic transporter to completely inhibit the formation of the biofilm.²³

However, once treated with compounds **4.11** and **4.14** at their MIC, we observed the formation of overall thinner biofilms (**Figure 4.3**, 1c-d,2c-d). These fast-acting anti-biofilm agents may have an increased capacity to penetrate, weaken and disrupt bacterial biofilms and prevent bacterial stress response. Bacterial biofilm disruption was even more pronounced when the biofilm was treated with the semi-rigid compound **4.21**. As shown by both confocal and SEM images (**Figure 4.3**, 1e, 2e), this antibiofilm agent can disrupt and weaken the bacterial biofilm at its MIC concentration. Not only does this compound have an effect on the thickness and the density of the biofilm, but complete death of the bacterial community can be observed inside the biofilm.

These results suggest that the octyl chain can strongly increase the antibiofilm activity and the overall efficiency of those antibacterial agents, acting both on the biofilm matrix and the bacterial membranes. As compound **4.21** showed the most promising activity on *MRSA* biofilms, we designed a new series of analogues bearing octyl chains (**Figure 4.2**, generation III). The decrease of the lipophilic character of an antibiotic often comes with a decrease of its toxicity on red blood cells,²⁸ but these new compounds showed lower specificity for *MRSA* bacteria versus red blood cells (**Table 4.2**).

Table 4.2 Minimal inhibitory concentration (MIC) of flexible benzimidazolium salts
(generation III)



Entry	Antimicrobials (-R)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			HC50 ($\mu\text{g/mL}$)
		<i>MRSA</i>	<i>VRE</i>	<i>E. coli</i>	
4.33	methyl	400	400	400	200
4.34	octyl	5	2.5	50	50
4.35	benzyl	50	100	200	200
4.36	4-methylbenzyl	10	25	200	150
4.37	4-fluorobenzyl	25	50	200	200
4.38	4-chlorobenzyl	6	15	100	100
4.39	4-bromobenzyl	6	15	100	75
4.40	4-iodobenzyl	10	25	100	150
4.41	4-(trifluoromethyl)benzyl	6	25	100	200
4.42	4- <i>tert</i> -butylbenzyl	2.5	2.5	50	25
4.43	4-phenylbenzyl	3	2.5	50	25

MRSA = Methicillin-resistant *S. aureus* (ATCC 43300), *VRE* = vancomycin-resistant *E. faecium* (BAA-2316), *E. coli* (ATCC 25922), HC50: concentration of the antimicrobials at which 50% of human red blood cells get lysed.

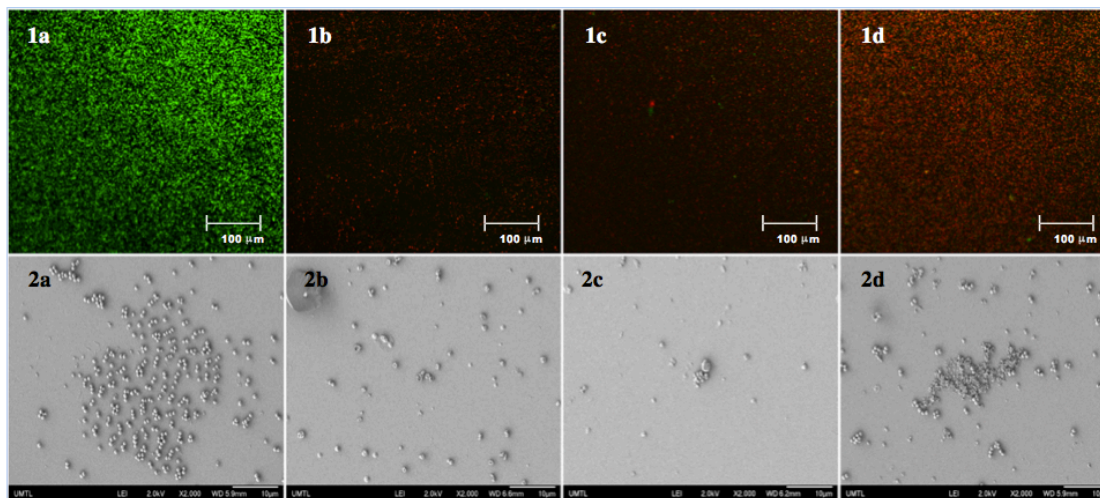


Figure 4.4. (top) *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after a 12 h incubation with MIC concentration of the antimicrobials. 1a) Negative control (DMSO); 1b) Compound **4.34**; 1c) Compound **4.39**; 1d) Compound **4.42**; (bottom) SEM images of *MRSA* biofilms after a 12h incubation with MIC concentration of the antimicrobials. 2a) Negative control (DMSO); 2b) Compound **4.34**; 2c) Compound **4.39**; 2d) Compound **4.42**.

We selected the most active compounds **4.34**, **4.39**, and **4.42** and studied their ability to prevent the formation of *MRSA* biofilms. Once treated with these compounds at their planktonic MICs, we observed a fast and strong inhibition of *MRSA* biofilm compared to the negative control (**Figure 4.4**). Those amphiphilic salts have the capacity not only to kill bacteria, but also to penetrate and disrupt the biofilm and kill the present bacteria. These compounds are also able to interfere with the biofilm formation and disperse mature biofilms having the potential for universal use in the treatment of biofilm-associated infections.

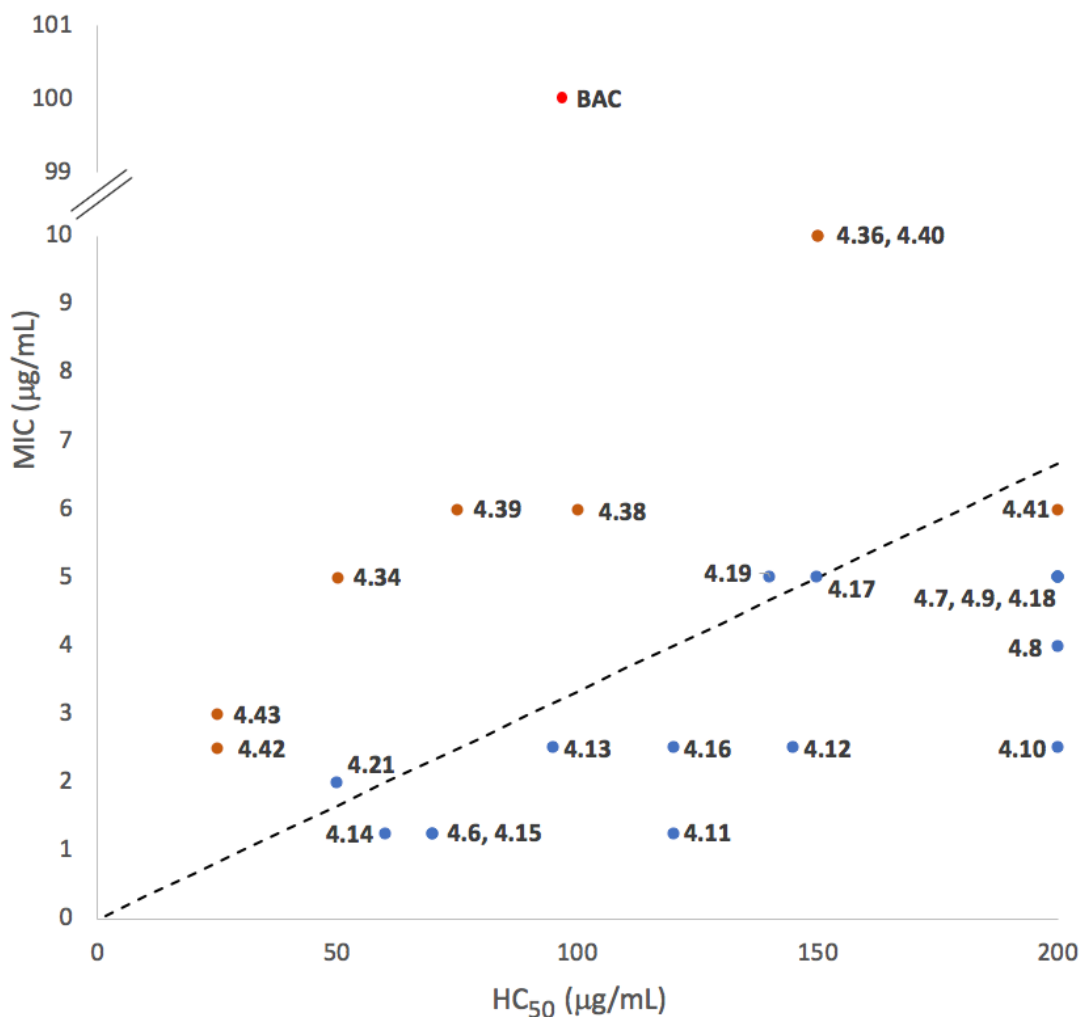


Figure 4.5. Antibiofilm activity of studied compounds. Compared to commercially available BAC, all the benzimidazolium salts possess the ability to prevent the formation and disrupt mature biofilms. The dotted line represents the 25-fold selectivity towards *MRSA* bacteria compared to HC₅₀.

4.5 Conclusions

In regard to the rising *MRSA* related infections around the world and knowing that the primary defence mechanism of these bacteria is the formation of biofilms, we believe that the inhibition and destruction of those biofilms at low antibiotic concentrations is the key to overcome the challenges brought by the appearance of resistant bacteria. For example, compound **4.11** showed a 100-fold selectivity to *MRSA* compared to RBC and a great ability to disrupt mature biofilms. Herein we show that benzimidazolium salts have antibiotic, antibiofilm activities and good selectivity. Our readily available intermediates and relatively simple synthesis of new analogues make them good candidates for diversification and screening for stronger new activities on bacterial resistant strains.

4.6 Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Université de Montréal for financial support. We thank J. N. Pelletier and K. J. Wilkinson from the Département de Chimie-Université de Montréal for access to their laboratories and instruments. We thank A. Fouillen (Ph.D) from the electron microscopy platform of the University of Montreal for the SEM preparation and analysis of the samples.

4.7 Experimental

4.7.1 Synthesis and material

¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded on 400 and 75 MHz spectrometers, respectively, in the indicated solvent. Chemical shifts are reported in ppm with internal reference to TMS, and *J* values are given in Hertz. The purity of final compounds used in biological assays was determined by ESI/LC-MS on Quantum TSQ Ultra instruments (C18 (2.1 x 100 mm) column, water +0.1% formic acid). Benzimidazole (**4.4**) and 1-methylbenzimidazole (**4.22**) were purchase from Sigma-Aldrich and use without further purification.

4.7.2 Bacterial strains, culture conditions, and viability assays.

MICs were determined in 96-well microtiter plates. Assays were conducted in Luria-Bertani Broth (LB) medium at 37 °C in triplicate. Bacterial cell density (OD at 600 nm) was measured using a Fischer Scientific cell density meter model 40. UV-vis and fluorescence spectroscopy experiments were performed on a Tecan Infinite M200 microplate reader.

4.7.3 Hemolytic assay.

Red blood cells in Alserver's solution were centrifuged 10 min. at 300 x g, washed 3 times with PBS buffer and resuspended in PBS at 2% v/v. In a 96 wells plate was added 195 µL of red blood cells solution and 5 µL of compound in DMSO, and the plate was incubated with light agitation for 1 h at 37 °C. The plate was then centrifuged for 10 min. at 300 x g and 50 µL of the supernatant of each well was transferred to another plate. Absorbance was measured at $\lambda = 405$ nm.

4.7.4 Biofilm inhibition assay.

S. aureus cells were incubated in LB medium at 37 °C for 5 h and rediluted in LB medium to the desired final concentration ($OD_{600nm} = 0.1-0.15$). *S. aureus* biofilms were labeled with Live/Dead stain after 12 h incubation with antibiotics in growth medium (LB broth). Negative Control: DMSO (final concentration not exceeding 10 % volume). Positive Control: 70 % ethanol.

4.7.5 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM).

Biofilms stained with FilmTracer™ Live/Dead® Biofilm viability kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd.). Briefly, a working solution of fluorescent stains was prepared by adding 1 µL of SYTO® 9 stain and 1 µL of PI stain to 1 mL of filter-sterilized water. Two hundred µL of staining solution were deposited on each well of a chambered coverglass (8-well), after 15 min at room temperature in the dark, samples were washed with sterile saline (0.9% NaCl) from base of the support material. Then, biofilms were examined with a confocal laser microscope (Leica model TCS SP5; Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) using a 20x dry objective (HC PL FLUOTAR 20.0 x 0.50 DRY). A 488 nm laser line was used to excite SYTO® 9, while the fluorescent

emission was detected from 500 to 540 nm. PI was sequentially excited with 561 nm laser line and its fluorescent emission was detected from 600 to 695 nm.

4.7.6 Scanning electron microscopy.

Bacterial samples were applied to titanium surfaces for 12 hours in order to form biofilms, following by a fixation for 1h at 4 °C in 4% Paraformaldehyde and 0,1% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.3, and subsequently rinsed three times with PB. Following fixation, samples were incubated for 1 hour in 1% osmium tetroxide at RT and then dehydrated through an ethanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 95% and two times 100%) followed by drying using a Critical Point Drier CPD300 (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada). A JEOL JSM-7400F (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) operated at 1.5 kV was used to image the samples.

4.8 References

1. Peterson, E.; Kaur, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 2928.
2. Zaman, S. B.; Hussain, M. A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K. T.; Hossain, N. A Review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus* **2017**, *9*, 1403.
3. Pragman, A. A.; Berger, J. P.; Williams, B. J. Understanding persistent bacterial lung infections: clinical implications informed by the biology of the microbiota and biofilms. *Clin Pulm Med* **2016**, *23*, 57-66.
4. Andie S. Lee, H. d. L., Javier Garau, Jan Kluytmans, Surbhi Malhotra-Kumar, Andreas Peschel & Stephan Harbarth. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers* **2018**, *4*, 18033.
5. Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev* **2018**, *31*, 1-103.

6. Craft, K. M.; Nguyen, J. M.; Berg, L. J.; Townsend, S. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm* **2019**, *10*, 1231-1241.
7. Flemming, H. C.; Neu, T. R.; Wozniak, D. J. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* **2007**, *189*, 7945-7947.
8. Nira Rabin, Y. Z., Clement Opoku-Temeng, Yixuan Du, Eric Bonsu; Sintim, H. O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 493-512.
9. Dakheel, K. H.; Abdul Rahim, R.; Neela, V. K.; Al-Obaidi, J. R.; Hun, T. G.; Yusoff, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms and their influence on bacterial adhesion and cohesion. *Biomed Res Int* **2016**, *1*, 1-14.
10. Archer, N. K. M., M. J.; Costerton, J. W.; Leid, J. G.; Powers, M. E.; Shirtliff, M. E. *Virulence* **2011**, *2*, 445.
11. Sugimoto, S.; Sato, F.; Miyakawa, R.; Chiba, A.; Onodera, S.; Hori, S.; Mizunoe, Y. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* **2018**, *8*, 2254.
12. Borisova, D.; Haladjova, E.; Kyulavska, M.; Petrov, P.; Pispas, S.; Stoitsova, S.; Paunova-Krasteva, T. Application of cationic polymer micelles for the dispersal of bacterial biofilms. *Engineering in Life Sciences* **2018**, *18*, 943-948.
13. Jing, Z.; Xiu, K.; Sun, Y. Amide-based cationic polymeric N-halamines: synthesis, characterization and antimicrobial and biofilm-binding properties. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2019**, *58*, 6218-6225.
14. Zhang, P.; Li, S.; Chen, H.; Wang, X.; Liu, L.; Lv, F.; Wang, S. Biofilm inhibition and elimination regulated by cationic conjugated polymers. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9*, 16933-16938.

15. Koppen, B. C.; Mulder, P. P. G.; de Boer, L.; Riool, M.; Drijfhout, J. W.; Zaat, S. A. J. Synergistic microbicidal effect of cationic antimicrobial peptides and teicoplanin against planktonic and biofilm-encased *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **2019**, *53*, 143-151.
16. Joseph, R.; Naugolny, A.; Feldman, M.; Herzog, I. M.; Fridman, M.; Cohen, Y. Cationic Pillararenes Potently Inhibit Biofilm Formation without Affecting Bacterial Growth and Viability. *J Am Chem Soc* **2016**, *138*, 754-757.
17. Collins, T. L.; Markus, E. A.; Hassett, D. J.; Robinson, J. B. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol* **2010**, *61*, 411-416.
18. Barrios-Gumiel, A.; Sanchez-Nieves, J.; Perez-Serrano, J.; Gomez, R.; de la Mata, F. J. PEGylated AgNP covered with cationic carbosilane dendrons to enhance antibacterial and inhibition of biofilm properties. *Int J Pharm* **2019**, *569*, 118591.
19. Bottcher, T.; Kolodkin-Gal, I.; Kolter, R.; Losick, R.; Clardy, J. Synthesis and activity of biomimetic biofilm disruptors. *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 2927-2930.
20. Hoque, J.; Konai, M. M.; Gonuguntla, S.; Manjunath, G. B.; Samaddar, S.; Yarlagadda, V.; Haldar, J. Membrane Active Small Molecules Show Selective Broad Spectrum Antibacterial Activity with No Detectable Resistance and Eradicate Biofilms. *J Med Chem* **2015**, *58*, 5486-5500.
21. Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R. Strong antibacterial properties of anion transporters: a result of depolarization and weakening of the bacterial membrane. *J Med Chem* **2015**, *58*, 2358-2366.
22. Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R. Benzimidazolium-based synthetic chloride and calcium transporters in bacterial membranes. *Org Biomol Chem* **2013**, *11*, 923-928.
23. Tessier, J.; Lecluse, M.; Gravel, J.; Schmitzer, A. R. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Disubstituted Bis-benzimidazolium Salts. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2567-2572.

24. Tessier, J.; Golmohamadi, M.; Wilkinson, K. J.; Schmitzer, A. R. Anti-staphylococcal biofilm activity of miconazoctylium bromide. *Org Biomol Chem* **2018**, *16*, 4288-4294.
25. Alexander, M. K.; Miu, A.; Oh, A.; Reichelt, M.; Ho, H.; Chalouni, C.; Labadie, S.; Wang, L.; Liang, J.; Nickerson, N. N.; Hu, H.; Yu, L.; Du, M.; Yan, D.; Park, S.; Kim, J.; Xu, M.; Sellers, B. D.; Purkey, H. E.; Skelton, N. J.; Koehler, M. F. T.; Payandeh, J.; Verma, V.; Xu, Y.; Koth, C. M.; Nishiyama, M. Disrupting Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Biosynthesis through Inhibition of the Lipopolysaccharide Transporter MsbA. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, *62*, 1-7.
26. Berney, M.; Hammes, F.; Bosshard, F.; Weilenmann, H. U.; Egli, T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 3283-3290.
27. Gomes, L. C.; Mergulhao, F. J. SEM Analysis of Surface Impact on Biofilm Antibiotic Treatment. *Scanning* **2017**, *2017*, 1-7.
28. Punia, A.; Lee, K.; He, E.; Mukherjee, S.; Mancuso, A.; Banerjee, P.; Yang, N. L. Effect of relative arrangement of cationic and lipophilic moieties on hemolytic and antibacterial activities of PEGylated polyacrylates. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 23867-23880.

Chapitre 5 : Produits phytochimiques et cyclodextrines - Émulsions de Pickering: potentialisateurs naturels de l'activité antibactérienne, antifongique et antibiofilm.

5.1 Préface

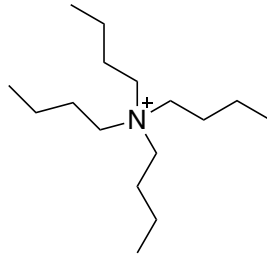
Nous présentons dans cet article des émulsions de Pickering auto-assemblées contenant des huiles phytochimiques biocides (carvacrol et terpinène-4-ol) et de la β -cyclodextrine, capables d'augmenter l'activité antimicrobienne et antibiofilm de plusieurs antimicrobiens. L'émulsion contenant du carvacrol est deux fois plus sensible contre *C. albicans* et *S. aureus* et très active contre *E. coli*, par rapport à la crème commerciale contenant des antibiotiques commerciaux. De plus, cette émulsion présente un effet synergique contre les champignons, contre les bactéries et une induit une éradication remarquable du biofilm staphylococcique.

Ma contribution pour cet article a été la réalisation des synthèses organiques, l'ensemble des expériences de biofilms et leur interprétation et rédaction de ces parties de l'article.

5.1.1 Introduction sur les émulsions de Pickering

Les émulsions sont grandement utilisées dans le domaine pharmaceutique, des cosmétiques et de l'alimentation.^[1] Dans le domaine pharmaceutique, les émulsions servent de moyen d'administration contrôlé des médicaments. Une émulsion est un mélange hétérogène de deux liquides non miscibles où l'un d'entre eux, grâce à une opération mécanique, est dispersé sous forme de gouttelettes dans l'autre. Ce mélange peut être obtenu avec une agitation et des principes actifs y peuvent être incorporés lors de l'obtention de l'émulsion.

Les composés de type ammonium quaternaire tel que le tétra-*n*-butylammonium (TBA, schéma 5.1) ont la capacité de se partager dans les deux phases. On appelle ce genre de composés des agents de transfert de phase.^[2] Ceux-ci sont notamment utilisés dans la synthèse organique qui implique un mélange de solvants non miscibles (eau/toluène par exemple), afin de permettre la diffusion ou le transfert des réactifs ou des produits entre les deux phases.^[3]



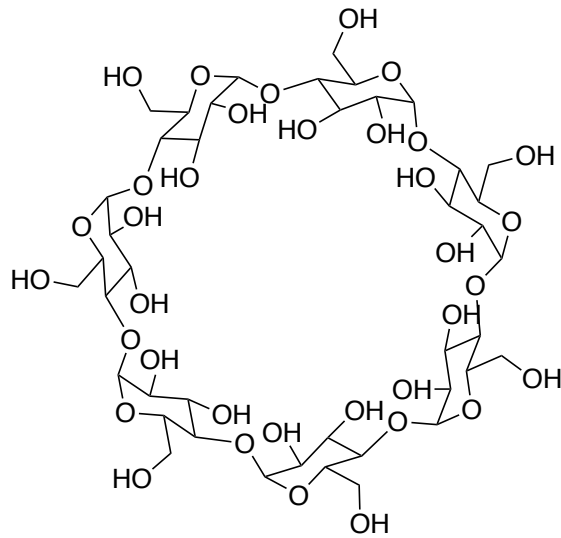
tétra-*n*-butylammonium

Schéma 5.1. Structure du cation TBA utilisé comme agent de transfert de phase

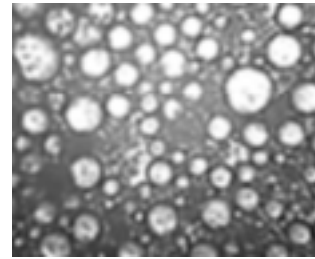
Lorsque l'on parle d'émulsion obtenue par agitation ou par mélange, l'exemple le plus commun est celui de la vinaigrette. En effet, l'agitation des deux phases permet le mélange de l'huile (phase apolaire) au vinaigre (phase aqueuse) pour obtenir la vinaigrette.

Les émulsions de Pickering^[4] se différencient des autres émulsions puisqu'elles utilisent des particules solides comme stabilisants à l'interface des deux liquides non-miscibles (eau/huile). Cette interaction empêche les gouttelettes de fusionner, ce qui procure une stabilisation de l'émulsion. Cette stabilisation résulte de la barrière stérique créée par les particules solides adsorbées à l'interface eau/huile.^[5]

Les émulsions de Pickering sont couramment obtenues en utilisant des particules solides telles que les gels de silice^[6], les argiles^[7] ou le chitosan^[8]. Les travaux présentés dans cet article se penchent sur la possibilité d'utiliser la béta-cyclodextrine (β CD), à la fois comme solide à l'interface des phases non miscibles, mais également comme pro-drogue (Schéma 5.2).^[9] La β CD possède une forme de cône, avec des anneaux hydrophiles formés par les groupes hydroxyle primaires et secondaires des unités glucoses qui se retrouvent aux extrémités de la molécule. Celle-ci possède également une cavité hydrophobe qui lui permet de former des complexes d'inclusion en milieu aqueux avec des molécules organiques hydrophobe, complexes qui une fois formés sont solubles dans l'eau.^[10]



Béta-cyclodextrine



Émulsion de Pickering

Schéma 5.2. Structure de la béta-cyclodextrine et l'image d'une émulsion de Pickering à base d'eau, d'huile de parafilm et de cyclodextrine.

Le mécanisme de formation de l'émulsion de Pickering à base de β CD diffère légèrement des modèles pour d'autre particule solide (Schéma 5.3). Lorsque la β CD est mise en contact avec de l'huile et de l'eau, des complexes d'inclusion entre l'huile et la β CD sont formés qui se placent à l'interface eau/huile.^[11] Toutefois, si la concentration de β CD augmente, on observe la formation de nanoparticules de complexe huile/ β CD, qui vont s'adsorber sur les gouttelettes d'huile et forment l'émulsion de Pickering stabilisée (Schéma 5.3).

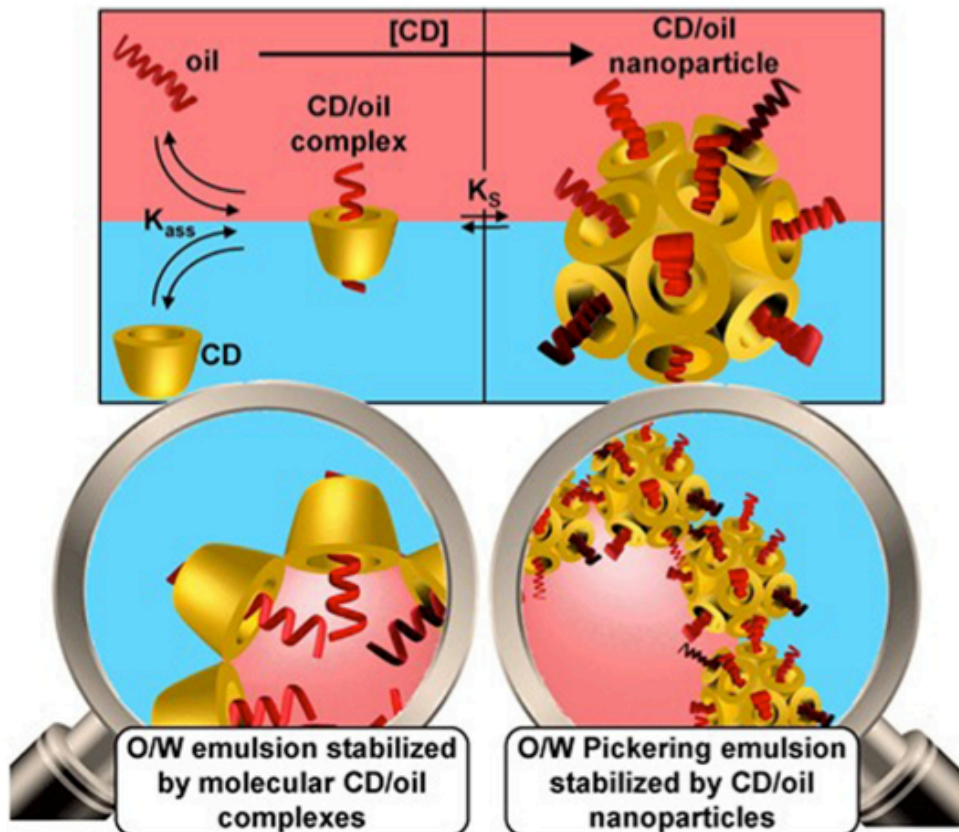


Schéma 5.3. Illustration de la formation du complexe huile/ β CD dans un mélange eau/huile.

Reproduite avec la permission (Leclercq and Nardello-Rataj, 2016^[11]). Copyright 2016,

Elsevier.

Des études précédentes ont également montré que l'ajout d'antibiotiques en solution avec la β CD permet d'obtenir des complexes d'inclusion entre ces deux molécules, ce qui augmente grandement la solubilité aqueuse et l'efficacité de l'antibiotiques.^[11] En plus d'avoir des propriétés d'encapsulation, la β CD est non-toxique et cause très peu d'irritation cutanée, raison pour laquelle la β CD est très utilisée dans la formulation des crèmes topiques. Ci-dessous nous présentons l'utilisation des émulsions de Pickering pour d'augmenter la capacité antibactérienne et antibiofilm de différents antibiotiques.

5.1.2 Références

- [1] F. Goodarzi, S. Zendejboudi, *Can. J. Chem. Eng.* **2019**, *97*, 281-309.
- [2] J. O. Metzger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2975–2978.
- [3] M. Makosza, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1399-1403.
- [4] S. U. Pickering, *J. Chem. Soc. Trans.* **1907**, *91*, 2001-2021.
- [5] Q. Monegier du Sorbier, A. Aimable, C. Pagnoux, *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *448*, 306–314.
- [6] B. Binks, S. Lumsdon, *Langmuir* **200**, *16*, 2539–2547.
- [7] S. Guillot, F. Bergaya, C. de Azevedo, F. Warmont, J. F. Tranchant, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *333*, 563-569.
- [8] Z. Wei, C. Wang, S. Zou, H. Liu, Z. Tong, *Polymer* **2012**, *53*, 1229-1235.
- [9] L. Leclercq, R. Company, A. Mühlbauer, A. Mouret, J.-M. Aubry, V. Nardello-Rataj, *ChemSusChem* **2013**, *6*, 1533-1540.
- [10] L. Leclercq, Q. Lubart, A. Dewilde, J.-M. Aubry, V. Nardello-Rataj, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *46*, 336–345.
- [11] L. Leclercq, V. Nardello-Rataj, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *82*, 126–137.

Article 4 : Phytochemicals and Cyclodextrins-Based Pickering Emulsions: Natural Potentiators of Antibacterial, Antifungal and Antibiofilm Activity

Loïc Leclercq^b, Jérémie Tessier^a, Grégory Douyère^b, Véronique Nardello-Rataj^b, Andreea R. Schmitzer^{a*}

^aDépartement de chimie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

^bUniv. Lille, CNRS, Centrale Lille, Univ. Artois, UMR 8181 - UCCS - Unité de Catalyse et Chimie du Solide, 59000 Lille, France.

Langmuir, in press

© 2020, American Chemistry Society

5.2 Abstract

We present self-assembled Pickering emulsions containing biocidal phytochemical oils (carvacrol and terpinen-4-ol) and β -cyclodextrin able to potentiate the antimicrobial and antibiofilm activity of miconazoylium bromide. Carvacrol-containing emulsion is two-fold more sensitive against *C. albicans* and *S. aureus* and highly active against *E. coli*, compared to the commercial cream containing miconazole nitrate. Moreover, this emulsion shows a synergistic effect against fungi, additive responses against bacteria and remarkable staphylococcal biofilm eradication. These results are associated to membrane permeabilization, enzymes inhibition and accumulation of reactive oxygen species in the microorganisms.

5.3 Introduction

Invasion of an organism by pathogens (bacteria, fungi, *etc.*) can cause health problems and even lead to death. Although hosts can react using their immune system, medications are widely prescribed to fight infectious diseases.¹ However, as the drug/target interaction is very selective and specific, antibiotics are generally active on bacteria but not on fungi and *vice versa*.² Therefore, antifungals and antibiotics are used to fight fungi and bacteria, respectively. Unfortunately, as fungal infections can be superinfected with bacteria, antifungal therapy can lead to bacterial overgrowth.³ Conversely, increased fungal microbiota growth is a common side effect of antibiotic therapy.⁴ This is particularly vivid in immune-compromised patients for whom superficial infections, frequently caused by *Candida albicans*, can lead to esophagus candidiasis or candidemia (the fourth cause of blood infections in the United States).⁵ Moreover, debilitated patients are more at risk to contract hospital-acquired infections: Gram-negative bacteria (*e.g. Escherichia coli*) are estimated to account for two-thirds of the 25,000 hospital deaths per year in Europe.⁶ The repeated exposure to antimicrobials may be an aggravating factor, as increasing selective pressure results in the emergence of resistant microorganisms, *e.g.* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA (Gram-positive).⁷ Furthermore, the formation of biofilms (accretion of microorganisms) results in more resistant infections to antimicrobials leading to chronic diseases.⁸ For example, *S. aureus* form biofilms responsible for over 50,000 deaths annually in the United States.⁹⁻¹⁰

In this context, antimicrobials able to eradicate biofilms with large antibacterial and antifungal spectrum are necessary.¹¹⁻¹⁵ Among the numerous commercially employed antimicrobials, miconazole nitrate, [HMC][NO₃], responds partially to this request.¹⁶ Indeed, it is active against a wide range of fungi and Gram-positive bacteria. Its antifungal activity is due to the inhibition of lanosterol 14- α -demethylase, involved in the ergosterol synthesis.¹⁷ Since ergosterol is a major constituent of the fungal membrane, its depletion and the accumulation of toxic precursors result in growth inhibition. Additionally, [HMC][NO₃] induce generation and accumulation of reactive oxygen species (ROS).¹⁸ These ROS act as nitric oxide dioxygenase inhibitors leading to significant cellular structural damage with lethal effects.¹⁹ Although [HMC][NO₃] was inefficacious against Gram-negative bacteria and biofilms, its *N*-alkylation with *n*-octyl bromide was found to boost its antimicrobial activity.²⁰ Herein, we decided to both formulate and potentiate the activity of miconazoctylium bromide, [C₈MC][Br] using carvacrol²¹⁻²⁴ and terpinen-4-ol, two phytochemicals known to permeabilize microbial membranes (Figure 5.1).²⁵⁻²⁷

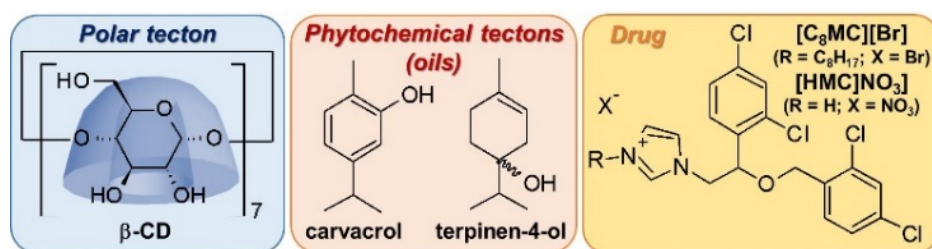


Figure 5.1. Structure and abbreviation of compounds used in this work.

These two liquid compounds, largely insoluble in water and toxic to microbial cells, can be used to obtain aqueous biphasic systems in which the phytochemical oils are used as organic solvents for [C₈MC][Br].²¹⁻²⁷ These water/oil systems in the presence of β -cyclodextrin (β -CD) can be used to build up drug delivery platforms based on Pickering emulsions using the colloidal tectonics concept.²⁸⁻³¹ In these media, host-guest interactions between polar and phytochemical tectons, small building block forming the supramolecular assembly (CD and oil), lead to “amphiphilic” structured particles which adsorb at the water/oil interface leading to Pickering emulsions.²⁸ These drug delivery systems can be charged with azole-based drugs by direct solubilization in the phytochemical oil phase. They are inexpensive and their use presents the

great advantage of avoiding the use of petro-sourced molecular surfactants or modified silica nanoparticles.²⁸ When the phytochemical oils are used in combination with [C₈MC][Br], it is expected to obtain a synergy in terms of antimicrobial and antibiofilm activities, due to cumulative membrane damages. These formulations could then be highly helpful for clinical applications, since a boosted antimicrobial allows: (i) a faster eradication of pathogens, (ii) a shorter treatment time, and (iii) a weaker spread of resistant pathogens *via* a complete and broad-spectrum eradication.³²⁻³³

5.4 Experimental section

5.4.1 General Information

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. NMR spectra were recorded in deuterated solvents at 400 MHz on Bruker spectrometers. The purity of the final compounds used in the biological assays was determined by ESI/LC-MS analysis ($\geq 95\%$). The microbial strains used were methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922 and *C. albicans* SC5314. Sterile water was used in all experiments, all performed in triplicate.

5.4.2 Synthesis of miconazoctylium bromide

Miconazole (100 mg, 0.24 mmol) and *n*-octylbromide (125 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and heated at reflux for 2 h. The volatiles were evaporated and the residue was triturated into EtOAc to remove any trace of octylbromide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt as a white powder (135 mg, 0.22 mmol, 93%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.51 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.46-7.43 (m, 2H), 7.34-7.26 (m, 3H), 7.23-7.19 (m, 2H), 5.21 (dd, *J* = 7.5, 4.3 Hz, 1H), 4.74-4.60 (m, 2H), 4.51 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.42 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.29 (dh, *J* = 20.9, 6.9 Hz, 2H), 1.91-1.80 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 20.4 Hz, 10H), 0.87 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 138.64, 135.93, 135.02, 134.28, 133.77, 132.86, 132.22, 131.49, 130.14, 129.39, 129.30, 128.37, 127.71, 122.57, 121.27, 76.18, 68.46, 53.25, 50.44, 31.80, 30.38, 29.14, 29.05, 26.36, 22.71, 14.19; HRMS : (ESI) calcd. for [M⁺] C₂₆H₃₁Cl₄N₂O: 527.1185, found 527.1194; IR (neat, cm⁻¹) 3007.9, 2927.5, 2926.5, 2854.5, 1646.7, 1587.7, 1561.3, 1467.4, 1379.8, 1338.7, 1298.0, 1222.8, 1191.2, 1145.5, 1095.9; M.P.: 131-134 °C.

5.4.3 Emulsion preparation and phase diagram

Oil and water were weighed before adding the β -CD. Note that, if appropriated, drugs were diluted in oil. The emulsification was performed using Vortex-Genie 2 (3200 rpm, 90 s, 25 °C, Scientific Industries Inc., USA). The type of emulsion was determined by conductivity measurement. The phase diagrams were obtained by visual and microscopic observations.

5.4.4 Microscopy

Optical microphotographs of the samples were obtained using a light microscope (Standard 25 ICS, Zeiss GmbH, Germany) coupled with a CCD camera. The microphotographs were analysed with ImageJ (NIH, USA) and the distribution function was obtained by treatment of at least 250 individual measurements with log-normal function using OriginPro 8[®] software (OriginLab Corp., USA). The morphology of the complexes was investigated by SEM (JSM-7800F LV, JEOL Ltd., Japan) operating at 2 KV for carvacrol and terpinen-4-ol complexes, and 5 KV for the complex formed with paraffin oil. The observations were performed by depositing the samples onto a carbon conductive adhesive tape stuck on a stub after air-drying and chromium coating. WETSEM observations of the emulsion were carried out with QX-102 capsules (Quantomix Ltd., Israel). The sample preparation proceeded as follow: 15 μ L of sample were deposited in the liquid dish of the capsule and sealed with the stub. The beam was focused on the metal support grid with the SE detector before changing to the BSE detector to observe the sample. WETSEM photographs were analyzed with ImageJ to obtain 3D views.

5.4.5 X-ray powder diffraction

The data were collected on a Bruker D8 Advance, Bragg-Brentano diffractometer (Cu K α radiation $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) equipped with a LynxEye detector. Experiments were conducted at room temperature, over the 3-40° 2 θ range with a 0.02° step size and counting time of 5 s. Sample diffracting volume was about 3 cm².

5.4.6 Differential scanning calorimetry

The measurements were performed on a DSC-Q1000 (TA Instruments, USA). About 10 mg of product were sealed in a Tzero Pan with a hermetic lid with pin hole and heated from 25 to 550 °C at a heating rate of 5 °C/min.

5.4.7 Multiple light scattering

The stability of emulsions was evaluated at 25 °C by multiple light scattering using Turbiscan Lab Expert (Formulaction, USA). The samples were placed in cylindrical glass tubes and the analysis was carried out as a variation of backscattering (Δ BS) profiles. Measurements were carried out using a pulsed near-IR light-emitting diode (LED) at 880 nm. Two different synchronous optical sensors received the light transmitted through and backscattered by samples at 180° and 45° with respect to the incident radiation, respectively. The two sensors scanned the entire sample height. Experimental data were correlated in percentage to the light flux of two standards: polystyrene latex suspension (absence of transmission and maximum backscattering) and silicon oil (maximum transmission and absence of backscattering).

5.4.8 Rheological study

Rheological properties of emulsions were evaluated using a Malvern Kinexus (Malvern Instruments, UK) equipped with parallel plate geometry under controlled temperature. The diameter of the plates was 20 mm and the gap was 1 mm. The temperature was controlled using a Peltier temperature control device located below the lower plate with an accuracy of 0.01 °C. Stress-controlled measurements were performed imposing a logarithmic stress ramp increase followed by a reverse stress decrease from 0 to 500 Pa.s.

5.4.9 Antimicrobial activity

Activity was determined using inhibition area on LB-agarose plates at 37 °C. The bacteria or yeast solution (OD = 0.1-0.15 at 600 nm) was spread onto LB-agar plates and incubated for 15 minutes at 37 °C for maximal absorption. One μ L of each emulsion was then plated on the infected agar plate and incubated for 12h at 37 °C for bacteria and 30 °C for yeast. The area of inhibition for each formulation was then measured. The sterility tests used (LB only) were streaked onto LB-

agar plates as an overall negative-control and infected plates without emulsion were streaked onto LB-agar plates as an overall positive-control.

5.4.10 Biofilm disruption

Bacteria were incubated in LB medium at 37 °C for 5 h and diluted in LB medium to the desired final concentration (OD = 0.1-0.15 at 600 nm). After an incubation of 12 h in 8-well chambers, the growth media was removed via pipetting and the resulting biofilms were washed 2 times with a 0.9% NaCl solution to remove the remaining planktonic cells. Biofilms were labelled with *Live/Dead* after 1 h exposition with different emulsions. Negative Control: DMSO (final concentration not exceeding 10% volume). Positive Control: 70% ethanol (20 min exposure). Biofilms stained with FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm viability kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd.). Briefly, a working solution of fluorescent stains was prepared by adding 1 µL of SYTO9® stain and 1 µL of propidium iodide (PI) stain to 1 mL of filter-sterilized water. Two hundred µL of staining solution were deposited on each well of an 8-well chambered cover-glass, after 15 min at room temperature in the dark, samples were washed with sterile saline (0.9% NaCl) from the base of the support material. The biofilms were examined with a confocal laser microscope (Leica model TCS SP5; Leica Microsystems CMS GmbH, Germany) using a 20x dry objective (HC PL FLUOTAR 20.0 × 0.50 DRY). A 488 nm laser line was used to excite SYTO® 9, while the fluorescent emission was detected from 500 to 540 nm. PI was sequentially excited with 561 nm laser line and its fluorescent emission was detected from 600 to 695 nm. The images acquired by confocal laser microscope were processed through a segmentation algorithm using Fiji (NIH, USA).

5.5 Results

It is noteworthy that, in the following discussion, liquid paraffin served as reference because it is a widely used solvent in many commercial medicated creams and it is known to easily produce Pickering emulsions in the presence of β -CD.^{28,34} As expected, all the water/oil/ β -CD (45/45/10 wt.%) systems provided whitish emulsions (Figure 5.2A).

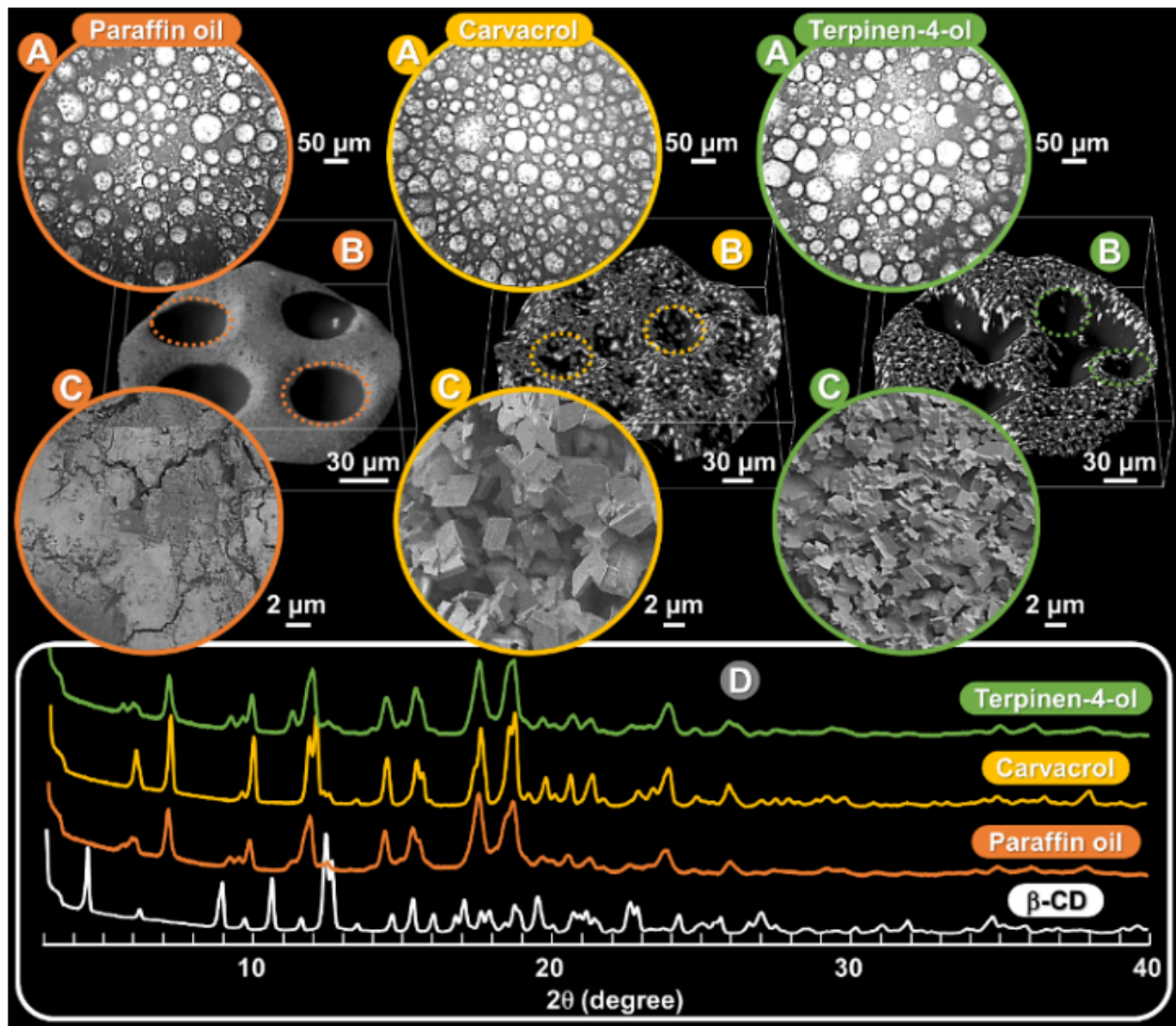


Figure 5.2. Observations of β -CD/water/oil emulsions (10/45/45 wt.%, 3,200 rpm, 90s, 25 $^{\circ}$ C) using optical microscope (A) and WETSEM (B) and of β -CD/oil complexes using dry SEM (C).

The inset shows the X-ray powder diffraction patterns of dry powders (D).

The average droplet size is 35, 39, 36 μm (with a standard deviation, SD = 5%) for paraffin, carvacrol and terpinen-4-ol, respectively (Figure A4.1). The electrical conductivity of the emulsions indicates an aqueous external phase. The morphology of the emulsions, in their native environment, was studied using a wet scanning electron microscopy (WETSEM, Figure 5.2B). The photographs show the presence of particles around the droplets in the continuous aqueous phase forming a 3D compact network (Figure A4.2). However, their centrifugation (4,000 rpm, 20 min) allows a separation of water, oil, and a white powder. The dry powders were studied by SEM (Figure 5.2C). We observed a granular solid with paraffin oil and lamella with carvacrol and terpinen-4-ol. Their sizes follow the order paraffin ($\ll 1 \mu\text{m}$) < terpinen-4-ol ($\approx 1 \mu\text{m}$) < carvacrol ($\approx 4 \mu\text{m}$). The ^1H NMR analysis in DMSO- d_6 of these powders suggests the formation of β -CD/oil complexes in equimolar ratios. The complexation is also supported by X-ray powder diffraction (XRD) as the diffraction patterns of precipitates are entirely different from that of the free β -CD (Figure 5.2D).²⁰ The XRD profiles suggest a well-ordered crystalline structure for all precipitates due to the presence of sharp peaks. Moreover, the differential scanning calorimetry thermogram of free β -CD shows two endothermic peaks around 141 and 303 $^\circ\text{C}$, corresponding to the water release and the melting of the β -CD, respectively, whereas for the precipitates, both peaks are shifted to lower temperatures due to the presence of the oil in the CD cavity instead of water molecules (Figure. A4.3).³⁵ All these results support the idea that β -CD and oil molecules, in the presence of water, allow the stabilization of Pickering emulsions *via* the formation of well-ordered crystalline β -CD/oil complexes.

The ternary phase diagrams of the β -CD/water/oil systems are shown in Figure 5.3. We always observed the formation of stable O/W emulsions (green and orange area), belted between O/W emulsions with excess oil phase (for high oil/water ratios) and O/W emulsions settled in the aqueous phase (for low oil/water ratios).^{28,36} The other compositions provide water and oil phases with a large precipitated fraction.

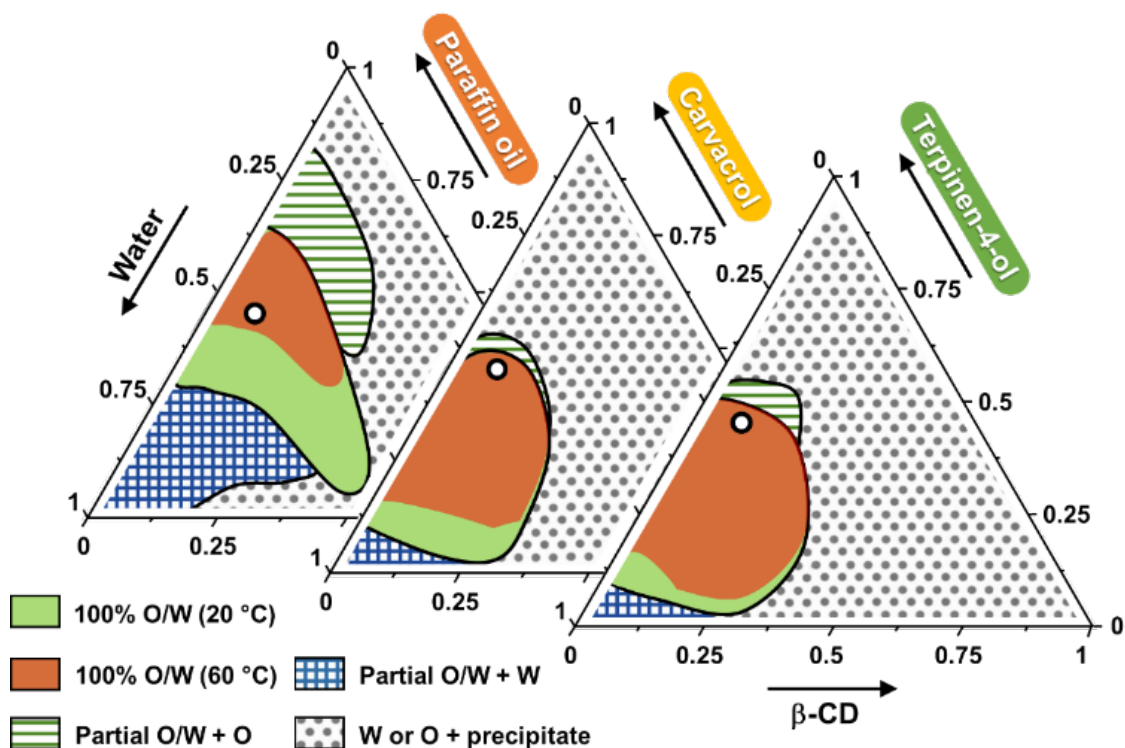


Figure 5.3. Ternary phase diagrams of the oil/water emulsion stabilized by β -CD at 25 °C. The composition is represented in weight fractions (3,200 rpm, 90s, 25 °C).

The location, range and stability of the self-assembled emulsions are clearly influenced by the oil polarity, the oil/water ratio and the β -CD concentration. Depending on the oil polarity, the stable O/W emulsion region moves towards the water corner and the two partial emulsion zones are reduced. These observations can be directly related to the modification of the oil polarity, which leads to the modification of the stabilizing particles since they are obtained from host-guest interactions between the oil and the β -CD. The temperature effect on the stable emulsion area has been evaluated after a thermoregulation up to 60 °C. At 37 °C (normal body temperature), the stable emulsion area is unaffected after two weeks for the three investigated oils. In contrast, at 60 °C, a reduction of the stable emulsion area is observed after 6h (orange area, Figure 5.2). This reduction is more significant for paraffin oil than for carvacrol or terpinen-4-ol due to the formation of a potential O-H...O bond between the carvacrol or terpinen-4-ol and the β -CD leading to a better stabilization of the inclusion complexes and of the resulting crystalline particles as already reported with isopropyl myristate.²⁸ In addition, it is noteworthy that for a given

oil/water ratio the viscosity of the emulsions increases with the amount of β -CD. Moreover, for a given β -CD amount, the viscosity of the emulsions increases when the proportion of oil increases and the water decreases. Therefore, the best compromise between stability and viscosity of the emulsions is obtained for 10 wt.% of CD supplemented with 45% of water and 45% of oil (white circles in Figure 5.3). For these particular compositions, the destabilization of the emulsions can be identified at an early stage by multiple light scattering (MLS) since the backscattered light (Δ BS) is related to droplet migration, droplet size, and phases thickness (Figure 5.4A).²²

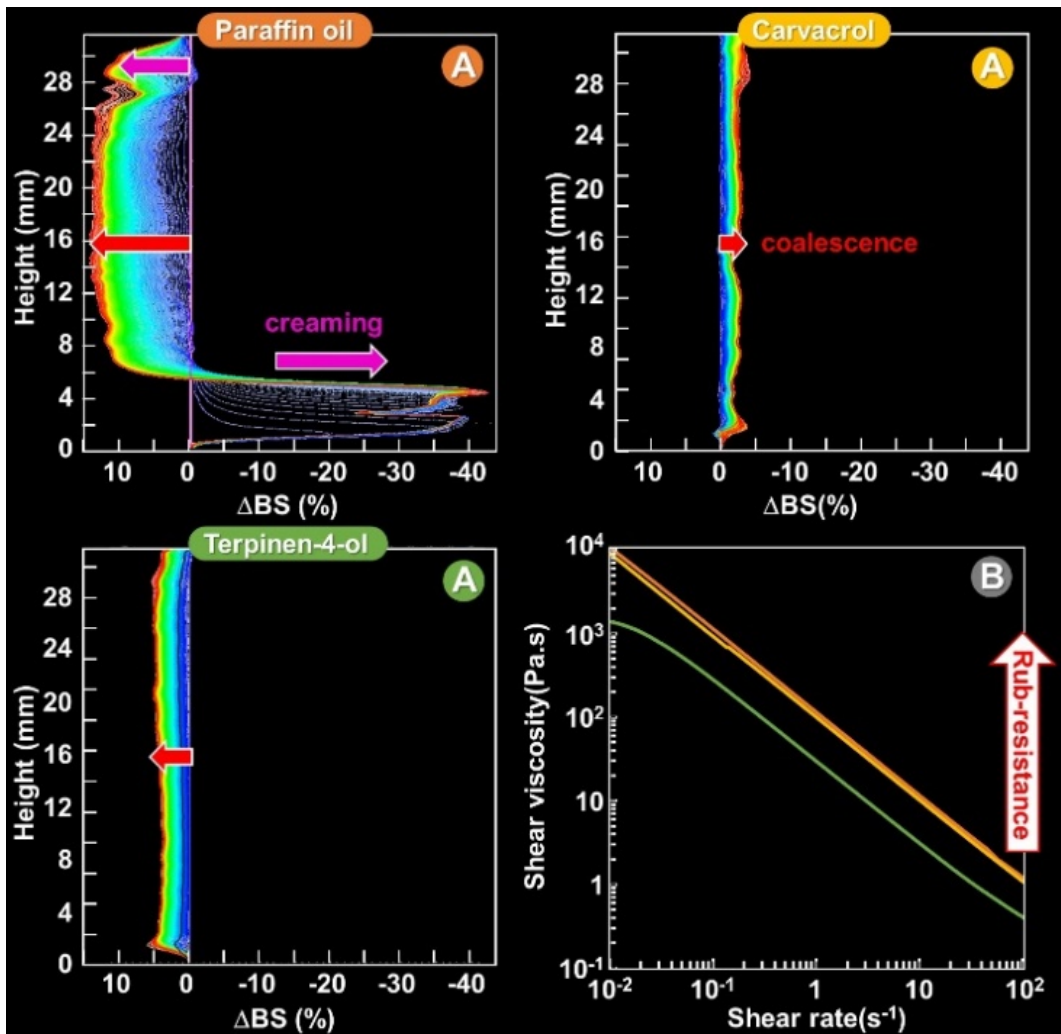


Figure 5.4. Backscattering (Δ BS) versus sample height and time at 25 °C (A) and shear viscosity as a function of shear rate (B) for β -CD/water/oil emulsions (10/45/45 wt.%, 3,200 rpm, 90s).

For paraffin, a creaming process was detected as the Δ BS over time decreases at the sample's bottom and increases at the top. An increase of Δ BS at midheight also indicates a coalescence phenomenon (droplet size variation).³⁶ For terpinen-4-ol and carvacrol, only coalescence was observed. However, as all these destabilization mechanisms have an impact on Δ BS over time, the sample with the highest variation is the least stable: the qualitative stability follows the order paraffin \ll terpinen-4-ol < carvacrol. This phenomenon is dependent on the particle sizes since the larger ones offer a better stabilization, probably due to the 3D compact network of particles observed around the droplets in the continuous aqueous phase, leading to more or less frozen media and forming an excellent protection against coalescence. No macroscopic phase separation was noticeable after 4 months for the three emulsions. This is characteristic of Pickering emulsions as the coalescence frequency depends on time, particle concentration, and mixing intensity. Indeed, if the particle amount is initially insufficient to fully cover the interfaces, then the droplets coalesce. Fortunately, as the total interfacial area between oil and water is progressively reduced during this process and the particles are irreversibly adsorbed, the degree of surface coverage increases until coalescence is stopped.²⁹⁻³¹ Unlike surfactant-stabilized emulsions, this process is limited and cannot be considered to be a true instability.²⁹⁻³¹ However, for paraffin, the creaming is undesirable because it causes difficulties in storage and handling. We performed a rheological study (Figure 5.4B). The prepared formulations are highly viscous under storage conditions, but exhibit low viscosity under the shear rate and are suitable for topical applications, since their viscosity is inferior to 2 Pa.s at 100 s⁻¹.²⁸ Also, the rub resistance of the creams follows the order: terpinen-4-ol \ll carvacrol < paraffin.

The emulsion oil phase was charged with liposoluble [HMC][NO₃] or [C₈MC][Br] (final composition: 45% in weight of water, 44% of oil, 10% of β -CD and 1% of drug). All of the emulsions behave similarly, giving monomodal but slightly polydisperse emulsions. However, some discrepancies between the emulsions can be observed: the emulsions loaded with [C₈MC][Br] provide the smallest droplets (17 to 26 μ m; SD = 5%), whereas the droplet sizes when charged with [HMC][NO₃] remain the same as those without drug (35 to 39 μ m; SD = 5%).

These results indicate that the amphiphilic $[C_8MC][Br]$ may interact with the O/W interface stabilized by the β -CD/oil particles. Indeed, $[C_8MC][Br]$ alone provides unstable emulsions which coalesce in a few minutes, leading to phase separation. However, the shear viscosity as a function of the shear rate remains identical with or without drugs.

As all emulsions are suitable for topical applications, diffusion tests were performed to evaluate their efficiency against *MRSA*, *E. coli* and *C. albicans* (Figure 5.5). Uncharged paraffin and commercial emulsion (Monistat Derm™) were used for comparison.

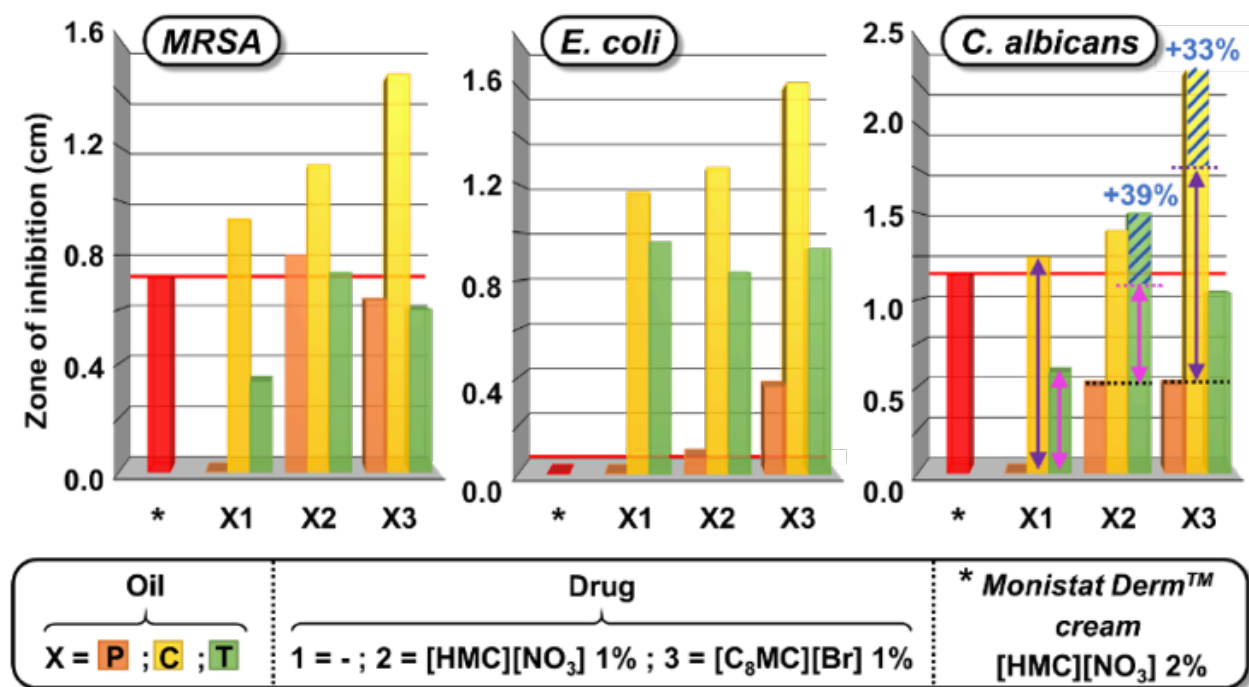


Figure 5.5. Zone of inhibition obtained by the diffusion method against *MRSA*, *E. coli* and *C. albicans* of the β -CD/water/oil emulsions compared to the commercial cream (Monistat Derm™; see the experimental section for more information).

As expected, the commercial cream is active against *MRSA* and *C. albicans*, but inactive against *E. coli*. The uncharged β -CD/water/paraffin oil (negative control, **P1**) is totally inactive against the three strains. In contrast, the two emulsions based on biocidal phytochemical oils (carvacrol, **C1**, and terpinen-4-ol, **T1**) are active against all the pathogens. It is noteworthy that **C1** is the most active oil.

Based on these observations, the emulsions formulated with paraffin were used to evaluate the antimicrobial action of [HMC][NO₃] or [C₈MC][Br] alone (**P2** and **P3**, respectively). Indeed, the pathogen susceptibility to [HMC][NO₃] and [C₈MC][Br] (**P2** and **P3**) was in order: *E. coli* < *C. albicans* < *MRSA*. As the addition of [HMC][NO₃] or [C₈MC][Br] to carvacrol or terpinen-4-ol oil can provides a route to potentiate the effect of the drug. The normalized biocidal factor (BF), expressed in %, was calculated as the ratio between the activity of drug/oil combination to the additive activities of each compound alone. Due to the standard deviations, a value of BF > 10% indicates a synergistic effect while a value BF < -10% means an antagonist effect. Finally, when -10% < BF < 10%, simple additivity is observed between the two components (Figure 5.6). According to these data, only the combination of [HMC][NO₃] to terpinen-4-ol (**T2**) and [C₈MC][Br] to carvacrol (**C3**) are synergetic against *C. albicans*. The other combinations result in antagonistic or additive effects against the three strains. Despite the fact that the normalized BF is quite superior for **T2** than **C3**, **T2** is not suitable to obtain broad-spectrum antimicrobial formulation due to the antagonistic effects observed against *MRSA* and *E. coli*. In contrast, the [C₈MC][Br]/carvacrol-based emulsion (**C3**) provides synergistic effect against *C. albicans* and additive responses against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Moreover, this emulsion is two-fold more active against *C. albicans* and *S. aureus* than the commercial cream, with a high activity against *E. coli* compared to the completely inefficient commercial one. These antibacterial and antifungal activities may be the result of membrane permeabilization, enzymes inhibition and accumulation of ROS in the microorganisms (see above).

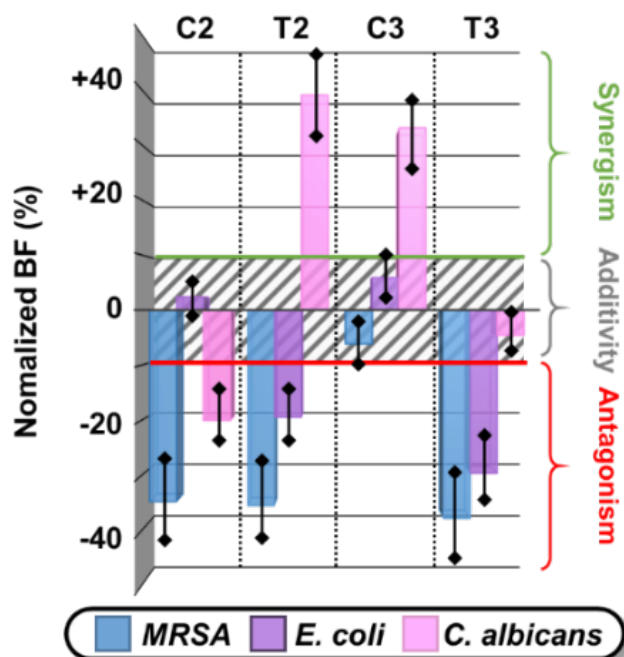


Figure 5.6. Normalized biocidal factor (BF) against *MRSA*, *E. coli* and *C. albicans* for β -CD/water/oil emulsions (oil = carvacrol, C, or terpinen-4-ol, T) combined with [HMC][NO₃] (2) or [C₈MC][Br] (3).

With these results in hand, we investigated the ability of the formulations to disrupt the *MRSA* biofilms. For this purpose, the pre-formed *MRSA* biofilms were treated with each formulation (1 μ L) after one hour of incubation. The bacterial viability tests were performed using the commercially available fluorescence assay (*BacLight Live/Dead*), composed of two fluorophores SYTO9[®] and propidium iodide, leading to the detection of alive intact cells (green) and permeabilized dead cells (red) (Figure 7).³⁷ [C₈MC][Br] aqueous solution (1 wt.%) shows a strong capacity to disrupt pre-formed *MRSA* biofilms, being able to kill bacteria more rapidly than ethanol (70%), probably due to its lipophilic character and ability to permeate cellular membranes.²⁰ As the viability of the biofilm can be perturbed by the viscosity of the Pickering emulsions, the paraffin-based formulations were used as control experiments. β -CD/water/paraffin emulsions uncharged or charged with [HMC][NO₃] (**P1** and **P2**, respectively) only show a local inhibition/destruction of the biofilm, but the majority of the bacteria are still alive in the biofilm.

For paraffin-based formulations loaded with $[C_8MC][Br]$ (**P3**), the formation of thicker stripes of colonies indicates an increased stress on bacteria and increased ROS production.³⁸ As indicated by the orange/yellow colour, about 75% of the bacteria in the biofilm were dead after 1h exposure with **P3**. Similar behaviours were observed with terpinen-4-ol-based formulations charged or not (**T1**, **T2** and **T3**). Moreover, bacterial mortality close to 100% was observed for all carvacrol-based emulsions. Therefore, the carvacrol emulsions act as very efficient biofilm-eradicating agents regardless of the drug used. However, more complete biofilm disruption was observed for the carvacrol-based emulsion charged with $[C_8MC][Br]$ (**C3**).

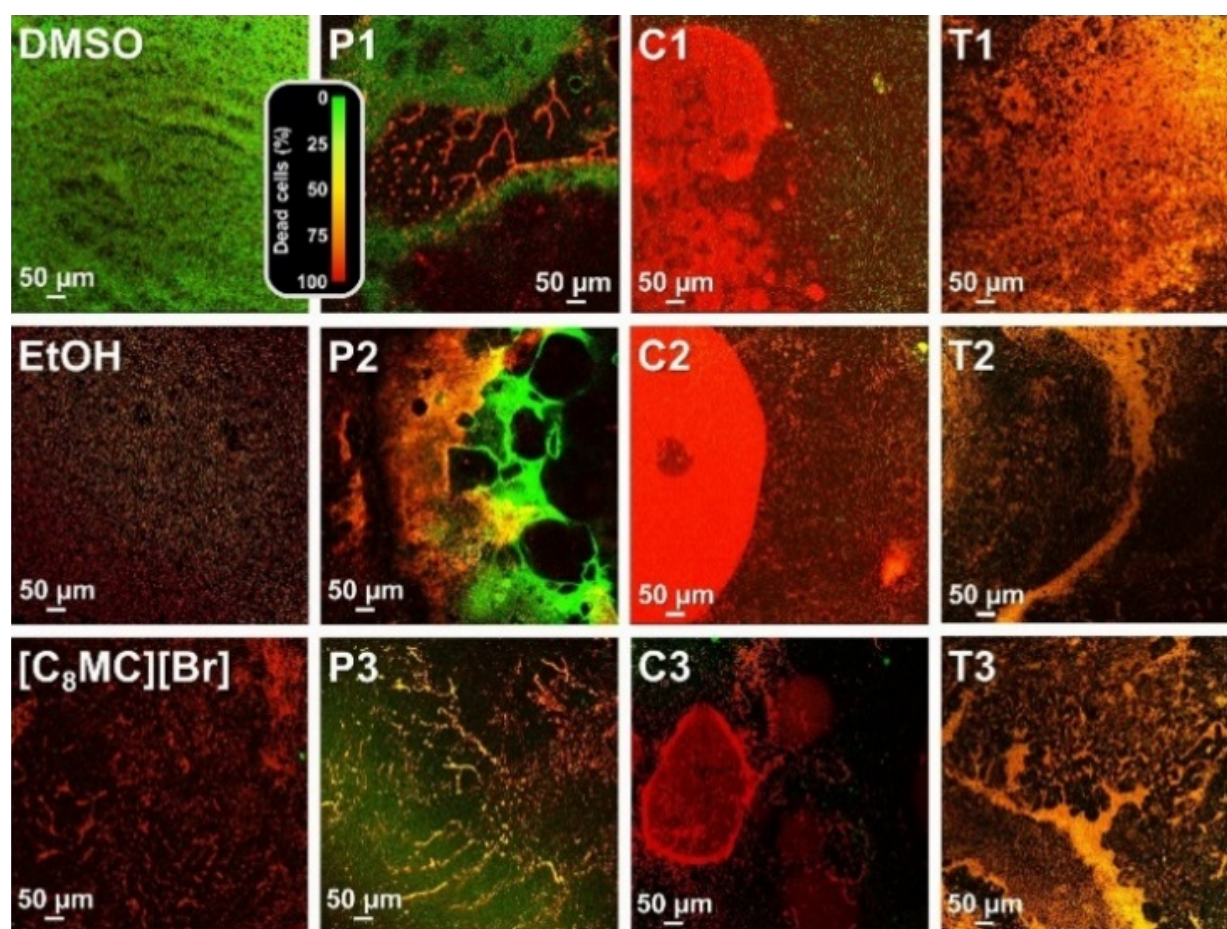


Figure 5.7. Pre-formed *MRSA* biofilms (*Live/Dead* stains) treated with 1 μ L of β -CD/water/oil emulsions (oil = paraffin, P, carvacrol, C, or terpinen-4-ol, T) without (1) or with $[HMC][NO_3]$ (2) or with $[C_8MC][Br]$ (3) after incubation. Negative control (DMSO only). Positive controls (EtOH 70% and aqueous solution of $[C_8MC][Br]$ 1 wt.%; see the experimental section for more information).

5.6 Conclusion

Self-assembled Pickering emulsion, obtained according to the so-called colloidal tectonics concept from commercially available and non-toxic raw materials (carvacrol and β -CD both approved by the Food and Drug Administration), can be used to improve the biocidal activity of miconazoctylium bromide. This very stable emulsion, in line with the current trend of simplifying formulas (without petro-sourced surfactants or modified silica nanoparticles), was shown to be two-fold more effective on *C. albicans* and *MRSA* than the commercial cream containing miconazole nitrate and showed high activity against *E. coli*, where the commercial one is completely inactive.³⁹⁻⁴¹ In addition, this emulsion was found to provide synergistic effect against *C. albicans* (30% more efficient than the additive effect). Finally, this system disrupted preformed *MRSA* biofilms. Work is underway in our group to further develop these Pickering emulsions for clinical applications due to their broad-spectrum and fast action against bacteria and fungi, resistant strains and biofilms.

5.7 Associated content

5.7.1 Supporting Information.

Microphotographs of oil/water emulsion (weight ratio: 1/1) stabilized with β -CD (10 wt. %). Microphotographs of terpinen-4-ol/water emulsion (weight ratio: 1/1) stabilized with β -CD (10 wt. %). DSC of the dry powders compared to the free β -CD. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

5.7.2 Acknowledgment

We gratefully acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Chevreul Institute (FR 2638), the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Région Hauts-de-France, the Université de Montréal and the Université de Lille for their financial support. We thank L. Burylo, J.-F. Dechézelles, A. Addad and A. Fadel for XRD, TEM and SEM measurements.

5.8 References

- (1) Taubes, G. The Bacteria Fight Back. *Science*, **2008**, *321*, 356-361.
- (2) Wright, G. D. Antibiotics: A New Hope. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 3-10.
- (3) Weidner, T.; Tittelbach, J.; Illing, T.; Elsner, P. Gram-Negative Bacterial Toe Web Infection: A Systematic Review. *Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2018**, *32*, 39-47.
- (4) Noverr, M. C.; Noggle, R. M.; Toews, G. B.; Huffnagle, G. B. Role of Antibiotics and Fungal Microbiota in Driving Pulmonary Allergic Responses. *Infect Immun.* **2004** *72*, 4996-5003.
- (5) Pulimood, S.; Ganesan, L.; Alangaden, G.; Chandrasekar, P. Polymicrobial Candidemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**, *44*, 353-357.
- (6) Pollack, A. Rising Threat of Infections Unfazed by Antibiotics. *The New York Times*, Feb. 27, 2010.
- (7) Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417-433.
- (8) Donlan, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 881-890.
- (9) Worthington, R. J.; Richards, J. J.; Melander, C. Small Molecule Control of Bacterial Biofilms. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7457-7474.
- (10) Böttcher, T.; Kolodkin-Gal, I.; Kolter, R.; Losick, R.; Clardy, J. Synthesis and Activity of Biomimetic Biofilm Disruptors. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2927-2930.
- (11) Jiao, Y.; Tay, F. R.; Niu, L.; Chen, J. Advancing Antimicrobial Strategies for Managing Oral Biofilm Infections. *Int. J. Oral. Sci.* **2019**, *11*, 28.
- (12) Lu, J.; Cokcetin, N. N.; Burke, C. M.; Turnbull, L.; Liu, M.; Carter, D. A.; Whitchurch, C. B.; Harry, E. J. Honey Can Inhibit and Eliminate Biofilms Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18160.
- (13) Godefroi, E. F.; Heeres, J.; Van Cutsem, J.; Janssen, P. A. J. Preparation and Antimycotic Properties of Derivatives of 1-Phenethylimidazole. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 784-791.

- (14) Sung, J. P.; Jan, M.; Grendahl, G.; Fresno, M.; Levine, H. B. Intravenous and Intrathecal Miconazole Therapy for Systemic Mycoses. *West. J. Med.* **1977**, *126*, 5-13.
- (15) Nenoff, P.; Koch, D.; Kruger, C.; Drechsel, C.; Mayser, P. New Insights on the Antibacterial Efficacy of Miconazole in vitro. *Mycoses*, **2017**, *60*, 552-557.
- (16) Allen, D.; Wilson, D.; Drew, R.; Perfect, J. Azole Antifungals: 35 Years of Invasive Fungal Infection Management. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13*, 787-798.
- (17) Becher, R.; Wirsal, S.G. Fungal Cytochrome P450 Sterol 14 α -demethylase (CYP51) and Azole Resistance in Plant and Human Pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 825-840.
- (18) Kobayashi, D.; Kondo, K.; Uehara, N.; Otokozawa, S.; Tsuji, N.; Yagihashi, A.; Watanabe, N. Endogenous Reactive Oxygen Species is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3113-3117.
- (19) El Hammi, E.; Warkentin, E.; Demmer, U.; Limam, F.; Marzouki, N. M.; Ermler, U.; Baciou, L. Structure of *Ralstonia eutropha* Flavohemoglobin in Complex with Three Antibiotic Azole Compounds. *Biochemistry*, **2011**, *50*, 1255-1264.
- (20) Tessier, J.; Schmitzer, A. R. Anti-staphylococcal Biofilm Activity of Miconazoctylium Bromide. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4288-4294.
- (21) Xu, J.; Zhou, F.; Ji, B. P.; Pei, R. S.; Xu, N. The Antibacterial Mechanism of Carvacrol and Thymol Against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, *47*, 174-179.
- (22) Sharifi-Rad, M.; Varoni, E.M.; Iriti, M.; Martorell, M.; Setzer, W. N.; Del Mar Contreras, M.; Salehi, B.; Soltani-Nejad, A.; Rajabi, S.; Tajbakhsh, M.; Sharifi-Rad, J. Carvacrol and Human Health: A Comprehensive Review. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 1675-1687.
- (23) Memar, M. Y.; Raei, P.; Alizadeh, N.; Akbari, A.; Masoud, K.; Hossein, S. Carvacrol and Thymol: Strong Antimicrobial Agents Against Resistant Isolates. *Rev. Med. Microbiol.* **2017**, *28*, 63-68.
- (24) Khan, I.; Bahuguna, A.; Kumar, P.; Bajpai, V. K.; Kang, S. C. Antimicrobial Potential of Carvacrol against Uropathogenic *Escherichia coli* via Membrane Disruption, Depolarization, and Reactive Oxygen Species Generation. *Front Microbiol.* **2017**, *8*, 2421.

- (25) Carson, C. F.; Riley, T. V. Antimicrobial Activity of the Major Components of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* **1995**, *78*, 264-269.
- (26) Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 50-62.
- (27) Zhang, Y.; Feng, R.; Li, L.; Zhou, X.; Li, Z.; Jia, R.; Song, X.; Zou, Y.; Yin, L.; He, C.; Liang, X.; Zhou, W.; Wei, Q.; Du, Y.; Yan, K.; Wu, Z.; Yin, Z. The Antibacterial Mechanism of Terpinen-4-ol Against *Streptococcus agalactiae*. *Curr. Microbiol.* **2018**, *75*, 1214-1220.
- (28) Leclercq, L.; Nardello-Rataj, V. Pickering Emulsions Based on Cyclodextrins: A Smart Solution for Antifungal Azole Derivatives Topical Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *82*, 126-137.
- (29) Leclercq, L. Get Beyond Limits: From Colloidal Tectonics Concept to the Engineering of Eco-Friendly Catalytic Systems. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 168.
- (30) Yang, B.; Leclercq, L.; Schmitt, V.; Pera-Titus, M.; Nardello-Rataj, V. Colloidal Tectonics for Tandem Synergistic Pickering Interfacial Catalysis: Oxidative Cleavage of Cyclohexene Oxide into Adipic Acid. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 501-507.
- (31) Leclercq, L.; Douyère, G.; Nardello-Rataj, V. Supramolecular Chemistry and Self-Organization: A Veritable Playground for Catalysis. *Catalysts*, **2019**, *9*, 163.
- (32) Acar, J. F. Antibiotic Synergy and Antagonism. *Med. Clin. North Am.* **2000**, *84*, 1391-1406.
- (33) Leekha, S.; Terrell, C. L.; Edson, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, *86*, 156-167.
- (34) Hashizaki, K.; Kageyama, T.; Inoue, M.; Taguchi, H.; Ueda, H.; Saito, Y. Study on Preparation and Formation Mechanism of n-Alkanol/Water Emulsion Using α -Cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1620-1625.
- (35) Mohandoss, S.; Stalin, T. Photochemical and Computational Studies of Inclusion Complexes Between β -Cyclodextrin and 1,2-Dihydroxyanthraquinones. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16*, 476-488.

- (36) Leclercq, L.; Company, R.; Mühlbauer, A.; Mouret, A.; Aubry, J.-M.; Nardello-Rataj, V. Versatile Eco-Friendly Pickering Emulsions Based on Substrate/Native Cyclodextrin Complexes: a Winning Approach for Solvent-Free Oxidations. *ChemSusChem*, **2013**, *6*, 1533-1540.
- (37) Berney, M.; Hammes, F.; Bosshard, F.; Weilenmann, H. U.; Egli, T. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BaLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 3283-3290.
- (38) Giuliadori, A. M.; Gualerzi, C. O.; Soto, S.; Vila, J.; Tavio, M. M. Review on Bacterial Stress Topics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1113*, 95-104.
- (39) Doost, A. S.; Stevens, C. V.; Claeys, M.; Van Der Meeren, P. Fundamental Study on the Salt Tolerance of Oregano Essential Oil-in-Water Nanoemulsions Containing Tween 80. *Langmuir* **2019**, *35*, 10572-81.
- (40) Kaliamurthi, S.; Selvaraj, G.; Hou, H.; Li, Z.; Wei, Y.; Gu, K.; Wei, D. Synergism of essential oils with lipid based nanocarriers: emerging trends in preservation of grains and related food products. *Grain Oil Sci. Technol.* **2019**, *2*, 21-26.
- (41) Doost, A. S.; Nikbakht Nasrabadi, M. N.; Kassozi, V.; Nakisozi, H.; Van der Meeren, P. Recent advances in food colloidal delivery systems for essential oils and their main components. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *In Press*.

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

6.1 Vers la modification ciblée des antibiotiques commerciaux

En premier lieu, les travaux présentés dans l'article 1 de cette thèse avaient pour buts de modifier le mécanisme d'action d'un antifongique commercial, en lui rajoutant des capacités de perméabilisation membranaire.¹ Avec une série d'analogues du miconazole (**Figure 6.1**) nous avons démontré que les chaînes alkyle très courte (C1) ou très longues (C12 à C16) conduisent à l'obtention de composés peu amphiphiles, avec une faible activité antibactérienne.

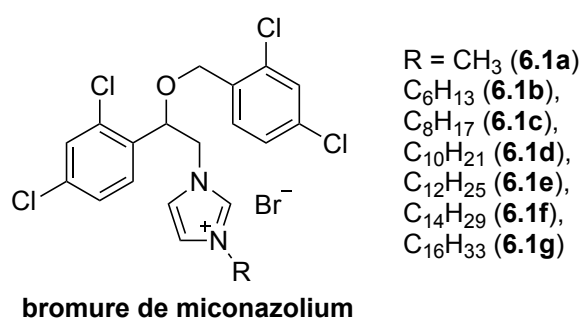


Figure 6.1 Structure des différents bromures de miconazolium.

La balance hydrophile/hydrophobe des agents anticatériens est très importante afin qu'ils puissent pénétrer les membranes phospholipidiques des bactéries. Nous avons démontré que les sels d'imidazolium portant des chaînes alkyles de tailles moyennes (C6 à C10) étaient les composés les plus actifs contre les bactéries Gram positives et Gram négatives, ainsi que sur certaines souches de champignons. De cette série, le composé possédant la chaîne octyle (Figure 6.1, **6.1c**) a démontré une habilité remarquable pour inhiber la formation de biofilms bactériens ainsi que celle de détruire les biofilms matures. De plus, ce sel antibactérien est spécifique aux membranes bactériennes, possédant une toxicité relativement basse pour les cellules eucaryotes.

En utilisant cette stratégie, nous proposons de modifier plusieurs antifongiques de la famille des imidazoles en leur procurant un caractère ionique amphiphile additionnel. Des composés tels que le clotrimazole, couramment utilisé dans des crèmes contre le pied d'athlète, ainsi que le kétoconazole, un antifongique qui inhibe la synthèse de l'ergostérol de la membrane, seraient de très bons candidats (**Figure 6.2**).^{2,3}

D'un point de vue synthétique, cette stratégie est très simple puisqu'elle implique une seule réaction d'alkylation sur des antibiotiques commercialement disponibles.

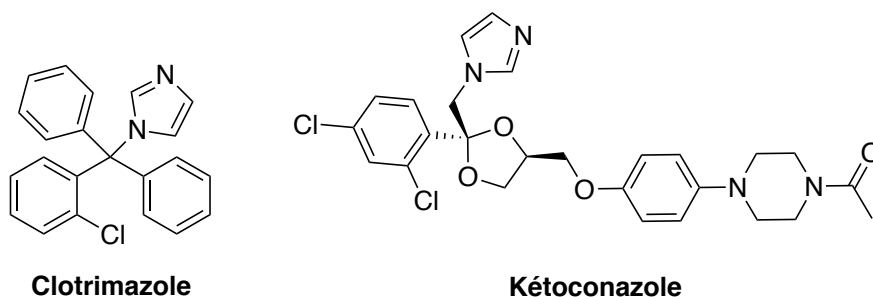


Figure 6.2. Structure des antibiotiques commerciaux le clotrimazole et le kétoconazole

D'une autre part, d'un point de vue de diversité chimique, cette stratégie nous donne accès à une grande librairie de perméabilisateurs membranaires. Avec l'émergence de bactéries multi-résistantes, nous croyons qu'une perturbation membranaire est nécessaire afin de ralentir le développement celles-ci. En effet, cette stratégie a démontré une efficacité importante afin de contrer l'apparition de nouvelles résistances dans une grande variété de souches bactériennes.^{4,5}

6.2 Vers la synthèse de nouveaux analogues antibactériens à base de sels de benzimidazolium

Deuxièmement, les travaux présentés dans l'article 2 de cette thèse avaient pour but de concevoir des sels organique contenant un noyau de lutidine-bis-benzimidazolium et des chaînes latérales octyle, adamantyle et cholestéryle lipophiles (**Figure 6.3**).⁶ Ces sels ont été testés pour leur activité antimicrobienne, leur capacité à inhiber la croissance bactérienne et fongique planctoniques, ainsi que pour leur capacité à inhiber la formation/perturbation des biofilms de *S. aureus* résistants à la méthicilline.

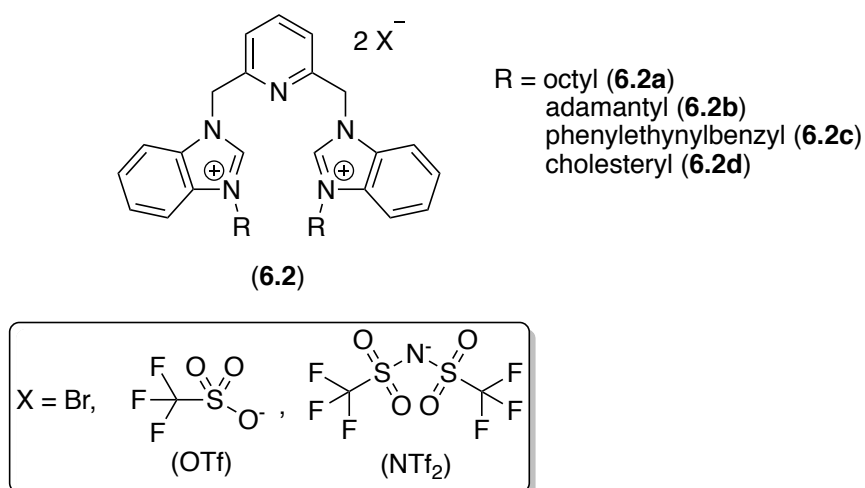


Figure 6.3 Structure des différents analogues de sel de lutidine-bis-benzimidazolium

Des études actuellement en cours dans notre groupe portent sur l'étude de la relation structure-activité (SAR) en variant la nature de l'espaceur utilisé afin de relier les deux unités benzimidazolium. Dans cette thèse, nous avons rapporté l'efficacité des composés contenant le motif lutidine (**Figure 6.3**) contre différentes souches de bactéries. Toutefois, ces composés contiennent également un noyau pyridine qui selon nous, joue un rôle négatif au niveau de la toxicité du composé.⁷ Afin de palier à ce problème et dans un effort d'augmenter la taille de notre librairie de composés antibactériens, nous avons synthétisé plusieurs séries d'analogues avec différent espaceurs entre les cations benzimidazolium (**Figure 6.4**).

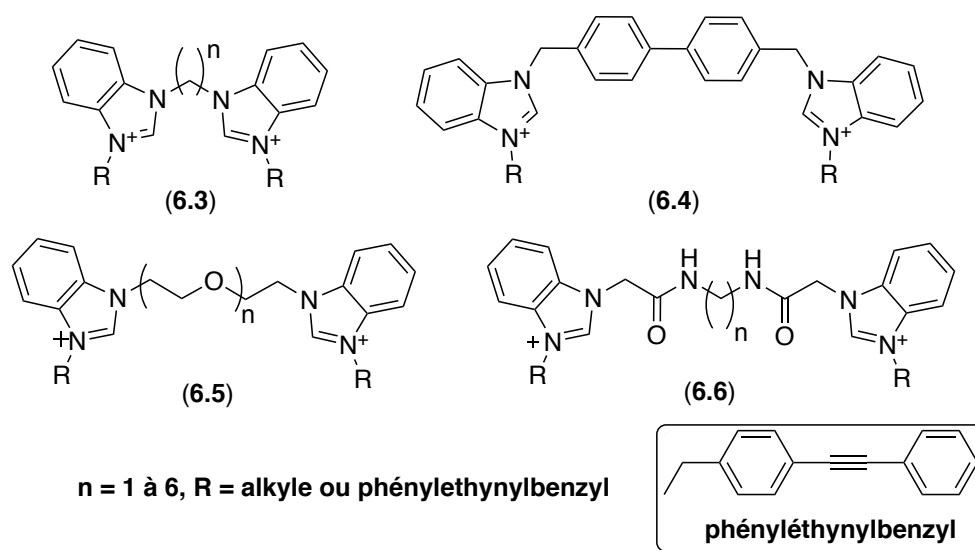


Figure 6.4. Structures des différents analogues de la nouvelle librairie d'antibiotique

Ces nouveaux composés nous permettront de mieux comprendre la relation structure-activité sur la capacité de ces composés à inhiber ou à détruire des biofilms, puisque chacune d'entre-elles aura un caractère amphiphile différent. Par exemple, la série **6.3** contient un espaceur flexible et apolaire entre les cations benzimidazolium ce qui nous permettra d'évaluer, en comparaison avec la série **6.4**, l'importance de la rigidité de l'espaceur. Les séries **6.5** et **6.6** tant qu'à elles nous apporteront des connaissances sur l'importance de la solubilité aqueuse des composés. En effet, l'ajout de groupement polyéthylèneglycol (PEG) ou du groupement amide polaire apportera une meilleure solubilité aqueuse, tout en gardant leur caractère amphiphile. D'un point de vue synthétique, la plupart de ces composés sont obtenus en trois étapes ou moins, nous donnant accès facilement à une librairie de composés. La synthèse de ces différents composés sont en cours dans le groupe, mais nous avons bon espoir que plusieurs posséderont une activité sur les biofilms de *MRSA*.

6.3 Vers une administration contrôlée des composés antibactériens

Lorsque l'on parle d'agents antibactériens, il est crucial de parler du développement et de l'optimisation du mode d'administration de ces médicaments. La formulation des antibiotiques a un impact direct sur l'absorption, ainsi que sur la biodisponibilité de ceux-ci. Tel que vu dans l'article 4 de cette thèse, nous avons récemment démontré l'utilité et l'efficacité des émulsions de Pickering à base de cyclodextrines.^{8,9}

Dans cet article, nous avons également démontré que nous pouvons introduire différents antibiotiques dans la composition de la formulation. Cette stratégie apporte des propriétés de synergie très intéressantes à la formulation pour l'éradication des bactéries multi-résistantes.¹⁰ Les émulsions de Pickering se sont montrées efficaces dans la formulation des crèmes topiques à faible cout. Des travaux sont en cours dans notre groupe pour développer davantage ces émulsions de Pickering pour des applications cliniques en raison de leur large spectre et de leur action rapide contre les bactéries et les biofilms.

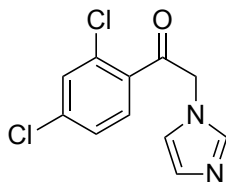
Finalement, les travaux présentés dans cette thèse ne représentent qu'une infime partie du travail accompli par notre groupe sur la conception, la synthèse et les applications biologiques de différents perturbateurs membranaires. Nous sommes très optimistes que les différents projets entamés durant mon doctorat permettront d'enrichir notre compréhension sur l'efficacité antibactérienne et sur la toxicité des agents perturbateurs de membranes. Ultiment, nous espérons que ces travaux apporteront un impact direct dans le domaine de la recherche sur la résistance bactérienne.

6.4 Références

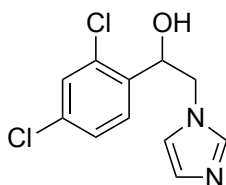
- [1] J. Tessier, M. Golmohamadi, K. J. Wilkinson, A. R. Schmitzer, *Org Biomol Chem* **2018**, *16*, 4288-4294.
- [2] a) P. R. Sawyer, R. N. Brogden, R. M. Pinder, T. M. Speight, a. C. S. Avery, *Drugs* **1975**, *9*, 424-447; b) N. Scheinfeld, *Drugs today* **2008**, *44*, 369-380.
- [3] a) S. B. Zaman, M. A. Hussain, R. Nye, V. Mehta, K. T. Mamun, N. Hossain, *Cureus* **2017**, *9*, 1-9; b) J. G. Hurdle, A. J. O'Neill, I. Chopra, R. E. Lee, *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9*, 62-75.
- [4] J. Tessier, M. Lecluse, J. Gravel, A. R. Schmitzer, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2567-2572.
- [5] C. R. Elie, G. David, A. R. Schmitzer, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2358-2366.
- [6] H. T. Hiroyuki Taguchi, Kaname Hashizaki, Yoshihiro Saito, and Makiko Fujii, *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 116-122.
- [7] Del Valle, E. M. Martin, *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 1033-1046.
- [8] X. Xu, L. Xu, G. Yuan, Y. Wang, Y. Qu, M. Zhou, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7237.

Annexes

A1.1 Synthesis and characterization.

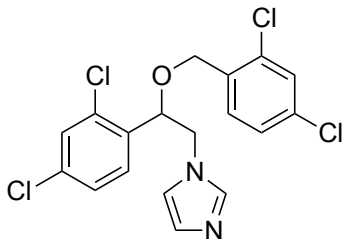


1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethan-1-one (2.2). 2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethan-1-one (**1**) (1 g, 4.48 mmol) was added portion wise to a suspension of **1H-imidazole** (1 g, 13.45 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) at 0 °C. This mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 12 h before water was added. The aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂, the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and purified using silica gel chromatography (5/95 MeOH/CH₂Cl₂) to afford the title compound (**2.2**) as a slightly brown solid (0.8 g, 3.22 mmol, 72%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.57 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.38 (dd, J = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 5.34 (s, 2H); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 58.31, 122.62, 125.97, 126.96, 129.22, 130.06, 131.48, 135.32, 139.64, 139.83, 194.77; (ESI) calcd. for [M⁺] C₁₁H₈Cl₂N₂O: 254.0014, found 254.0028; IR (neat, cm⁻¹) 2929, 1715, 1584; Melting point: 169-171 °C. All data match the previous reported literature.^{1,2}



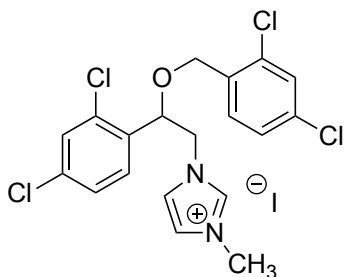
1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethan-1-ol (2.3). To a solution of (**2.2**) (200 mg, 0.79 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was slowly added a suspension of NaBH₄ (45 mg, 1.19 mmol) in MeOH (1 mL). The mixture was stirred 2 h at room temperature before water (1 mL) was added. The aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂, the combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and purified using silica gel chromatography (5/95 MeOH/CH₂Cl₂) to afford compound (**2.3**) as a slightly yellow solid (155 mg, 0.6 mmol, 77%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.54 (bs, 1H), 5.22 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 13.8, 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ

57.62, 67.63, 120.35, 127.87, 128.84, 130.01, 130.12, 131.64, 133.56, 138.74, 139.87; (ESI) calcd. for [M+] C₁₁H₁₀Cl₂N₂O: 556.0170, found 556.0184; IR (neat, cm⁻¹) 3318, 2927, 1588; Melting point: 131-134 °C. All data match the previous reported literature.^{1,2}

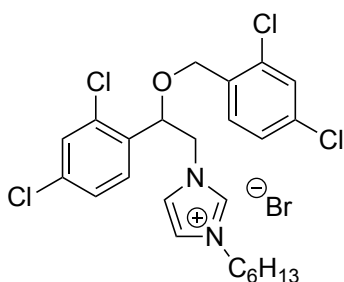


Miconazole, 1-(2-((2,4-dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl)-1H-imidazole (2.4).

Commercially available **2,4-dichlorophenylmethanol** (1 g, 5.65 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (30 mL) and cooled to 0 °C. Et₃N (0.78 mL, 5.65 mmol) was added to this solution, followed by a dropwise addition of methanesulfonyl chloride (MsCl) (0.44 mL, 5.65 mmol). After the addition was complete, stirring was continued at 0 °C for 2 h and the solvent was removed *in vacuo* to afford crude **2,4-dichlorobenzyl methanesulfonate**. A suspension of sodium hydride (15 mg, 0.36 mmol) in DMF (0.5 mL) was treated with a solution of alcohol **2.3** (100 g, 0.33 mmol) in DMF (0.5 mL) at 0 °C and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 2 h before a solution of the crude **2,4-dichlorobenzyl methanesulfonate** (125 mg, 0.36 mmol) in DMF (0.5 mL) was added dropwise. The resulting mixture was stirred for 12 hours at room temperature before water (1 mL) was added. The aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂, dried over Na₂SO₄ and purified using silica gel chromatography (6/4 EtOAc/hexanes) to afford miconazole (**2.4**) as a white solid (118 mg, 0.29 mmol, 87%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.48 (s, 2H), 7.40–7.28 (m, 4H), 7.23 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.05 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 4.38 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 4.20–4.04 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 57.6, 62.1, 67.6, 120.3, 127.2, 127.8, 128.8, 129.1, 129.3, 130.0, 130.1, 131.6, 133.1, 133.5, 133.6, 136.6, 138.7, 139.8; (ESI) calcd. for [M+] C₁₈H₁₄Cl₄N₂O: 413.9860, found 413.9849; IR (neat, cm⁻¹) 2968, 1590; Melting point: 183-184 °C. All data match the previous reported literature.^{1,2}

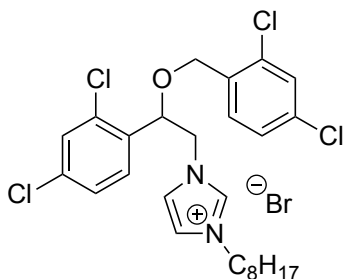


1-((2,4-Dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl-3-methyl-1H-imidazol-3-ium iodide (2.5a). A solution of **(2.4)** (100 mg, 0.24 mmol) and methyl iodide (45 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and refluxed 12 h. The volatiles were evaporated and the residue was suspended into EtOAc to remove any trace of methyl iodide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt **(2.5a)** as a white powder (95 mg, 0.17 mmol, 71%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.96 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 7.28–7.15 (m, 3H), 7.05 (s, 1H), 5.15–5.03 (m, 1H), 4.59–4.31 (m, 4H), 3.64 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 138.64, 135.94, 135.02, 134.29, 133.77, 132.85, 132.22, 131.50, 130.15, 129.39, 129.30, 128.37, 127.72, 122.57, 121.28, 75.91, 68.45, 53.07, 50.47; HRMS: (ESI) calcd for $[\text{M}^+]$ $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}$: 429.0081, found 429.0095; IR (neat, cm^{-1}) 3170.6, 3105.7, 1585.9, 1474.3; Melting point: 165–168 $^\circ\text{C}$.

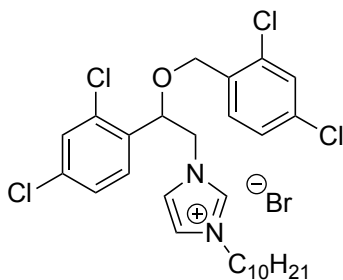


1-((2,4-Dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl-3-hexyl-1H-imidazol-3-ium bromide (2.5b). A solution of **(2.4)** (100 mg, 0.24 mmol) and hexyl bromide (101 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and refluxed 12 h. The volatiles were evaporated and the residue was triturated with EtOAc to remove any trace of hexyl iodide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt **(2.5b)** as a white powder (124 mg, 0.216 mmol, 90%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10.53 (s, 1H), 7.63–7.39 (m, 3H), 7.39–7.27 (m, 3H), 7.24 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 5.24 (dd, $J = 6.9, 4.3$ Hz, 1H), 4.80–4.61 (m, 2H), 4.54 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 4.33 (dh, $J = 20.9, 6.9$ Hz, 2H), 1.95–1.84 (m, 2H), 1.32 (s, 6H), 0.91 (t, $J = 6.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ

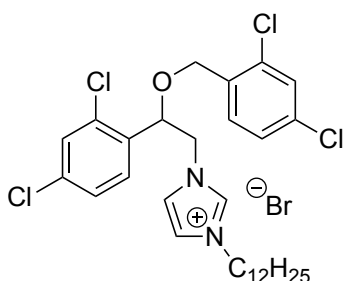
138.64, 135.94, 135.02, 134.29, 133.77, 132.85, 132.22, 131.50, 130.15, 129.39, 129.30, 128.37, 127.72, 122.57, 121.28, 76.18, 68.46, 53.24, 50.43, 31.18, 30.33, 26.00, 22.50, 14.06; HRMS: (ESI) calcd for [M⁺] C₂₄H₂₇Cl₄N₂O: 499.0876, found 499.0877; IR (neat, cm⁻¹) 3146.9, 3051.6, 2943.9, 2864.9, 1650.4, 1587.3, 1468.8, 1379.4; melting point: 106–109 °C.



Miconazoctylium bromide, 1-(2-((2,4-dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl)-3-octyl-1H-imidazol-3-ium bromide (2.5c). A solution of (2.4) (100 mg, 0.24 mmol) and octylbromide (125 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and refluxed 12 hours. The volatiles were evaporated and the residue was triturated with EtOAc to remove any trace of octylbromide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt (2.5c) as a white powder (135 mg, 0.22 mmol, 93%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.51 (s, 1H), 7.49 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.46–7.43 (m, 2H), 7.34–7.26 (m, 3H), 7.23–7.19 (m, 2H), 5.21 (dd, J = 7.5, 4.3 Hz, 1H), 4.74–4.60 (m, 2H), 4.51 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.42 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.29 (dh, J = 20.9, 6.9 Hz, 2H), 1.91–1.80 (m, 2H), 1.26 (d, J = 20.4 Hz, 10H), 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 138.64, 135.93, 135.02, 134.28, 133.77, 132.86, 132.22, 131.49, 130.14, 129.39, 129.30, 128.37, 127.71, 122.57, 121.27, 76.18, 68.46, 53.25, 50.44, 31.80, 30.38, 29.14, 29.05, 26.36, 22.71, 14.19; HRMS: (ESI) calcd for [M⁺] C₂₆H₃₁Cl₄N₂O: 527.1185, found 527.1194; IR (neat, cm⁻¹) 3007.9, 2927.5, 2926.5, 2854.5, 1646.7, 1587.7, 1561.3, 1467.4, 1379.8, 1338.7; melting point: 131–134 °C.

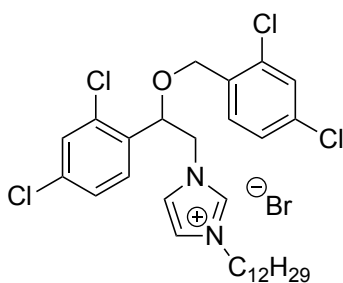


3-Decyl-1-(2-((2,4-dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl) ethyl)-1H-imidazol-3-ium bromide (2.5d). A solution of (**2.4**) (100 mg, 0.24 mmol) and decylbromide (150 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and refluxed 12 hours. The volatiles were evaporated and the residue was triturated with EtOAc to remove any trace of decylbromide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt (**2.5d**) as a white powder (130 mg, 0.2 mmol, 85%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10.59 (s, 1H), 7.53–7.41 (m, 3H), 7.36–7.27 (m, 3H), 7.18–7.09 (m, 2H), 5.21 (dd, $J = 7.3, 4.2$ Hz, 1H), 4.77–4.58 (m, 2H), 4.52 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.31 (dh, $J = 20.9, 7.4$ Hz, 2H), 1.87 (t, 2H), 1.28 (d, $J = 21.3$ Hz, 14H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 138.76, 135.96, 135.05, 134.30, 133.77, 132.85, 132.20, 131.52, 130.17, 129.41, 129.32, 128.39, 127.73, 122.52, 121.16, 76.19, 68.47, 53.26, 50.46, 31.98, 30.39, 29.59, 29.50, 29.38, 29.11, 26.38, 22.80, 14.25; HRMS: (ESI) calcd for $[\text{M}^+]$ $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}$: 555.1498, found 555.1503; IR (neat, cm^{-1}) 3055.12, 3009.9, 2926.8, 2854.1, 1640.9, 1589.3, 1466.5, 1379.8, 1338.8; Melting point: 81–84 $^\circ\text{C}$.

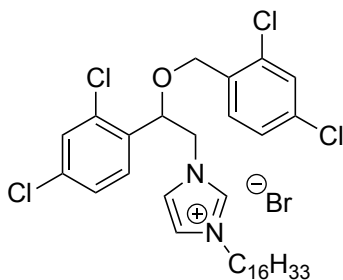


1-(2-((2,4-Dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl)-3-dodecyl-1H-imidazol-3-ium bromide (2.5e). A solution of (**2.4**) (100 mg, 0.24 mmol) and dodecylbromide (173 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and refluxed 12 h. The volatiles were evaporated and the residue was triturated with EtOAc to remove any trace of dodecylbromide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt (**2.5e**) as a white powder (144 mg, 0.22 mmol, 90%). ^1H NMR

(CDCl₃, 400 MHz) δ 10.45 (s, 1H), 7.51–7.41 (m, 3H), 7.34–7.28 (m, 3H), 7.25–7.20 (m, 2H), 5.42–5.10 (m, 1H), 4.70–4.62 (m, 2H), 4.50 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.30 (dh, J = 16.8, 6.4 Hz, 2H), 2.03–1.73 (m, 2H), 1.25 (d, J = 17.6 Hz, 18H), 0.86 (t, J = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 138.52, 135.90, 134.98, 134.23, 133.77, 132.85, 132.22, 131.44, 130.12, 129.37, 129.28, 128.35, 127.70, 122.61, 121.35, 77.16, 68.43, 53.21, 50.42, 32.02, 30.39, 29.71, 29.63, 29.49, 29.45, 29.10, 26.36, 22.80, 14.24. HRMS: (ESI) calcd for [M⁺] C₃₀H₃₉Cl₄N₂O: 583.1823, found 583.1816; IR (neat, cm⁻¹) 3148.6, 3106.1, 3052.7, 2920.4, 2852.1, 1649.8, 1589.0, 1468.5, 1380.9, 1342.6; Melting point: 71–74 °C.



1-(2-((2,4-Dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl)-3-tetradecyl-1H-imidazol-3-ium bromide (2.5f). A solution of (2.4) (100 mg, 0.24 mmol) and tetradecylbromide (214 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and refluxed 12 hours. The volatiles were evaporated and the residue was triturated with EtOAc to remove any trace of tetradecylbromide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt (2.5f) as a white powder (140 mg, 0.20 mmol, 85%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 10.63 (s, 1H), 7.57–7.47 (m, 3H), 7.39–7.30 (m, 3H), 7.20–7.08 (m, 2H), 5.24 (dd, J = 7.3, 4.3 Hz, 1H), 4.75–4.64 (m, 2H), 4.55 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.34 (ddt, J = 26.9, 13.9, 7.5 Hz, 2H), 1.90 (s, 2H), 1.31 (d, J = 20.1 Hz, 22H), 0.91 (t, J = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 138.89, 135.99, 135.08, 134.34, 133.77, 132.84, 132.19, 131.56, 130.19, 129.42, 129.33, 128.40, 127.74, 122.46, 121.06, 76.20, 68.49, 53.27, 50.48, 32.07, 30.39, 29.83, 29.79, 29.74, 29.65, 29.51, 29.12, 26.39, 22.84, 14.27. HRMS: (ESI) calcd for [M⁺] C₃₂H₄₃Cl₄N₂O: 611.2128, found 611.2129; IR (neat, cm⁻¹) 3149.2, 3054.9, 2922.5, 2852.5, 1589.7, 1561.5, 1467.7, 1378.8, 1340.6; Melting point: 100–104 °C.



1-((2,4-Dichlorobenzyl)oxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl-3-hexadecyl-1H-imidazol-3-ium bromide (2.5g). A solution of (**2.4**) (100 mg, 0.24 mmol) and hexadecylbromide (220 μ L, 0.72 mmol) was dissolved in MeCN (1 mL) and refluxed 12 h. The volatiles were evaporated and the residue was triturated with EtOAc to remove any trace of hexadecylbromide. Evaporation of the residual solvent afforded the salt (**2.5g**) as a white powder (166 mg, 0.23 mmol, 95%). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10.41 (s, 1H), 7.62–7.41 (m, 3H), 7.37–7.23 (m, 5H), 5.23 (s, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.52 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 4.38–4.23 (m, 2H), 1.86 (s, 2H), 1.26 (s, 26H), 0.89 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 138.22, 135.75, 134.82, 134.07, 133.66, 132.75, 132.13, 131.27, 129.97, 129.23, 129.15, 128.21, 127.58, 122.59, 121.42, 76.04, 68.29, 53.08, 50.27, 31.92, 30.28, 29.69, 29.66, 29.61, 29.53, 29.39, 29.36, 29.00, 26.24, 22.69, 14.13. HRMS: (ESI) calcd for $[\text{M}^+]$ $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}$: 639.2447, found 639.2442; IR (neat, cm^{-1}) 3148.1, 3051.6, 3010.2, 2921.3, 2851.4, 1590.4, 1561.4, 1467.2, 1380.5, 1341.6; Melting point: 106–110 $^\circ\text{C}$.

A1.2 Concepts and methods used

A1.2.1 Cellular reactive oxygen species (ROS) detection.

Cells were incubated in LB medium at 37 $^\circ\text{C}$ for 12 h, rediluted in LB medium and incubated until a $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$ (early-log) was observed (2 h). Growth media was removed using centrifugation (1000 g; 10 min). The resulting cells were washed twice with an equal volume of phosphate buffer saline (PBS, pH = 7.4), resuspended in PBS containing 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) to provide a final working concentration of 25–50 μM in dye depending on the cell line and incubated at 37 $^\circ\text{C}$ (30–60 min.) with occasional shaking. At this point, the solution must be kept in the dark. The resulting cells were washed twice with PBS and diluted back to the desired concentration in PBS ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.05$ –0.5). ROS detection assays were performed using fluorimetric

assay (ex/em: 485/535 nm) in 96-well plates (150 μ L) or quartz cuvette (3 mL). ROS detection assay were performed using fluorimetric assay (ex/em: 485/535 nm) in 96-well plates (150 μ L) or quartz cuvette (3 mL). Negative-control: a) DMSO (final concentration not exceeding 10 % volume) b) Unstained cells for autofluorescence in the green emission range. Positive-control: *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) to a final concentration of 100-250 μ M.

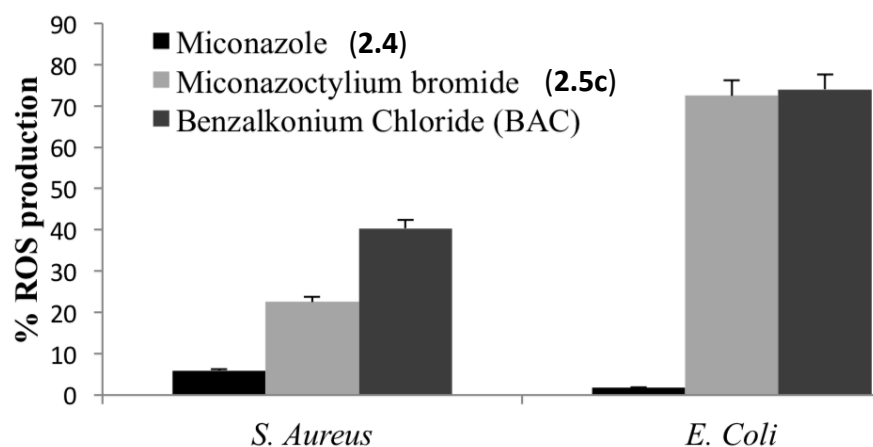


Figure A1.1. Fluorescence intensity of compound (2.5c), miconazole (2.4), and BAC relative to *tert*-butyl hydroperoxide (100%) and DMSO (0%) in different cell lines ($OD_{600nm} = 0.1$). Note: ROS production was not calculated for *E. coli* (MG1655) since a very low intensity was observed with positive-control. All cell lines were tested with unstained cells for autofluorescence. *S. aureus* ATCC 43300 and *E. coli* SK037.

A1.1.2 Ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) hydrolysis.

E. coli (MG1655) cells were incubated in LB medium at 37 $^{\circ}$ C with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 10 μ g/mL for 12 h. Cells were diluted in LB medium and incubated until a $OD_{600nm} = 0.6$ (early-log) was observed (2 h). Growth medium was removed using centrifugation (1000 g; 10 min), the resulting cells were washed twice with an equal volume of phosphate buffer saline (PBS, pH= 7.4) and diluted back in PBS to the desired working concentration ($OD_{600nm} = 0.1-0.5$). Hydrolysis assay were performed using spectrometric assay ($\lambda = 420$ nm) in 96-well chambers (110 μ L PBS, 15 μ L ONPG (12.5 mM), 10 μ L analogues in DMSO (1-100 mM), and 15 μ L cells ($OD_{600nm} = 0.1$). Negative-control: DMSO (final concentration not exceeding 10% volume). Positive-control: 5 mL cells ($OD_{600nm} = 0.1$) were sonicated until a lysate

($OD_{600nm} = 0$) was obtained (10 x 1 min., 35 % amplitude). Hydrolysis assay were performed using spectrometric assay ($\lambda = 420$ nm) in 96-well chambers (110 μ L PBS, 15 μ L ONPG (12.5 mM), 10 μ L analogues in DMSO (1-100 mM), and 15 μ L cells ($OD_{600nm} = 0.1$). Negative-control: DMSO (final concentration not exceeding 10% volume). Positive-control: 5 mL cells ($OD_{600nm} = 0.1$) were sonicated until a lysate ($OD_{600nm} = 0$) was obtained (10 x 1 min., 35 % amplitude).³

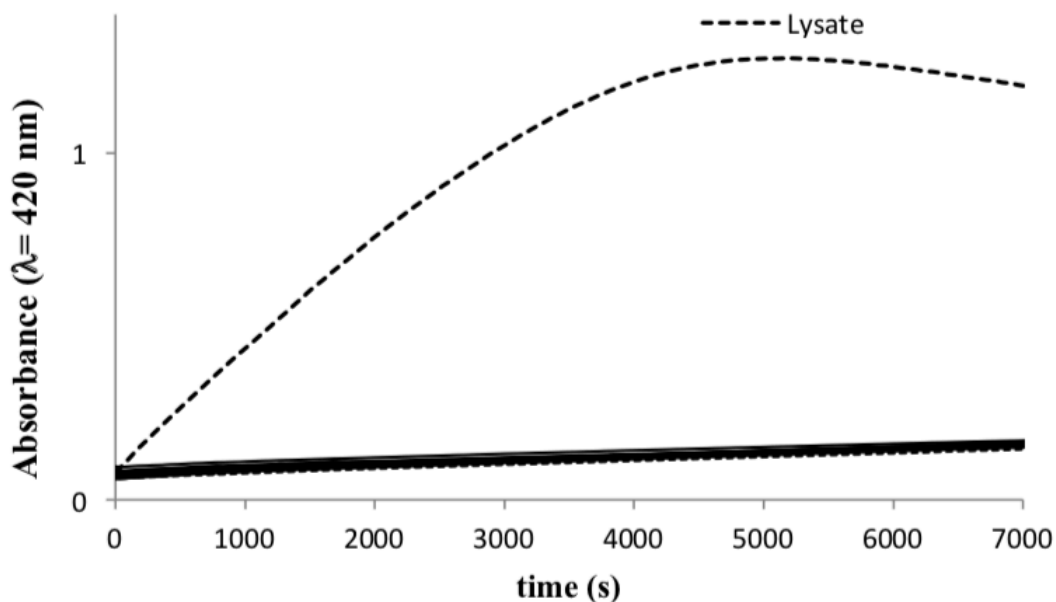


Figure A1.2. Membrane permeabilization induced by miconazole (**2.4**) at different concentrations. Assay performed with a bacterial population of 2.2×10^7 CFU mL^{-1} ($OD_{600nm} = 0.1$).

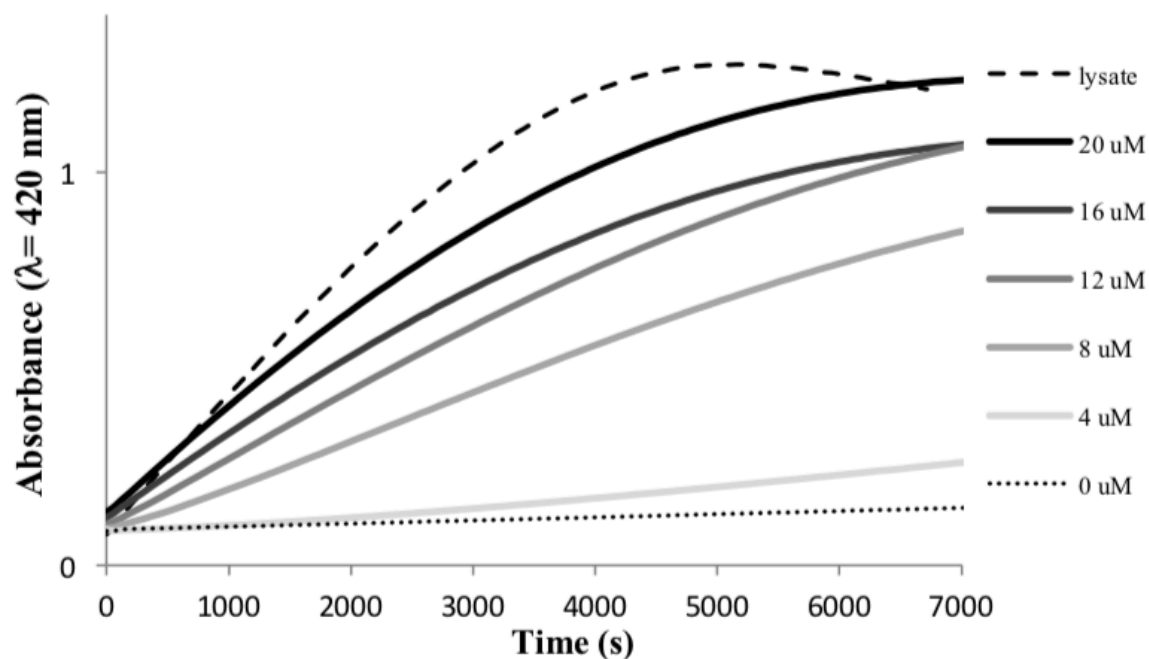


Figure A1.3. Membrane permeabilization induced by miconazoctylium bromide (**2.5c**) at different concentrations close to the MIC value. Assay performed with a bacterial population of 2.2×10^7 CFU mL⁻¹ (OD_{600nm} = 0.1).

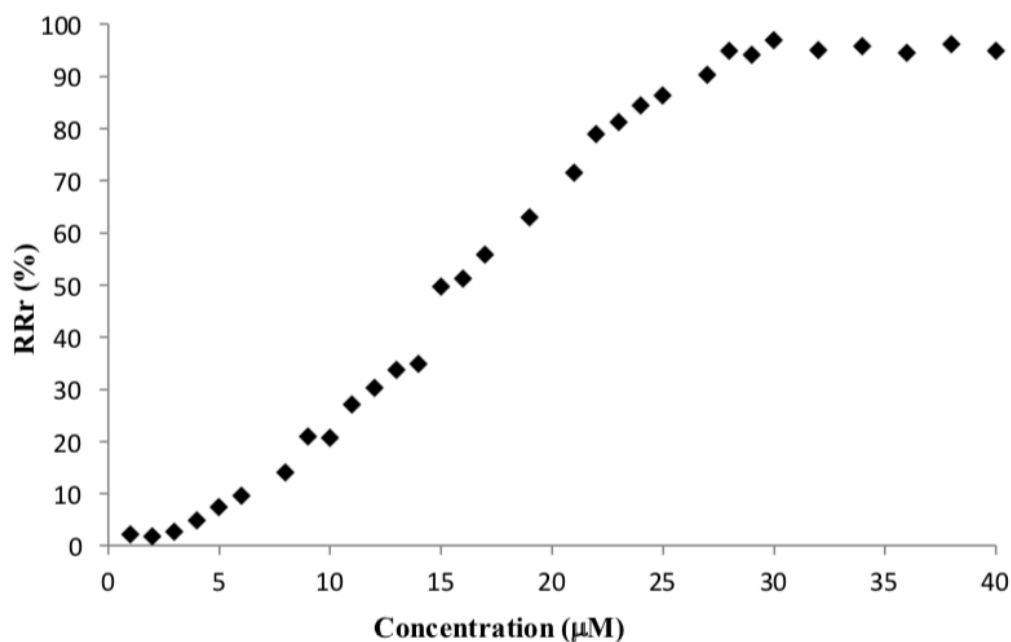


Figure A1.4. Dose–response relationship between the concentration of (**2.5c**) and the ONPG hydrolysis rate for a bacterial population of 2.2×10^7 CFU mL⁻¹ (OD_{600nm} = 0.1).

A1.1.3 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) Analysis.

The images acquired by confocal laser microscope were processed through a segmentation algorithm (Fiji, ImageJ, Wayne Rasband National Institutes of Health) capable of separating the signals between the background and the foreground (sample). More precisely, the algorithm only considers the signals recorded in each pixel with value exceeding a threshold on the scale of gray tones that was established to distinguish a sample signal from the background noise. A variation (%) on the threshold value calculated by Fiji software was applied to better reflect the distinction of biofilm from background. The software calculated the surface area occupied by biofilm, by measuring the surface area occupied by the fluorescence foreground signal in both green and red channels. The mortality, then, calculated by dividing the surface area occupied in red channel to total surface area occupied by both green and red channels together.

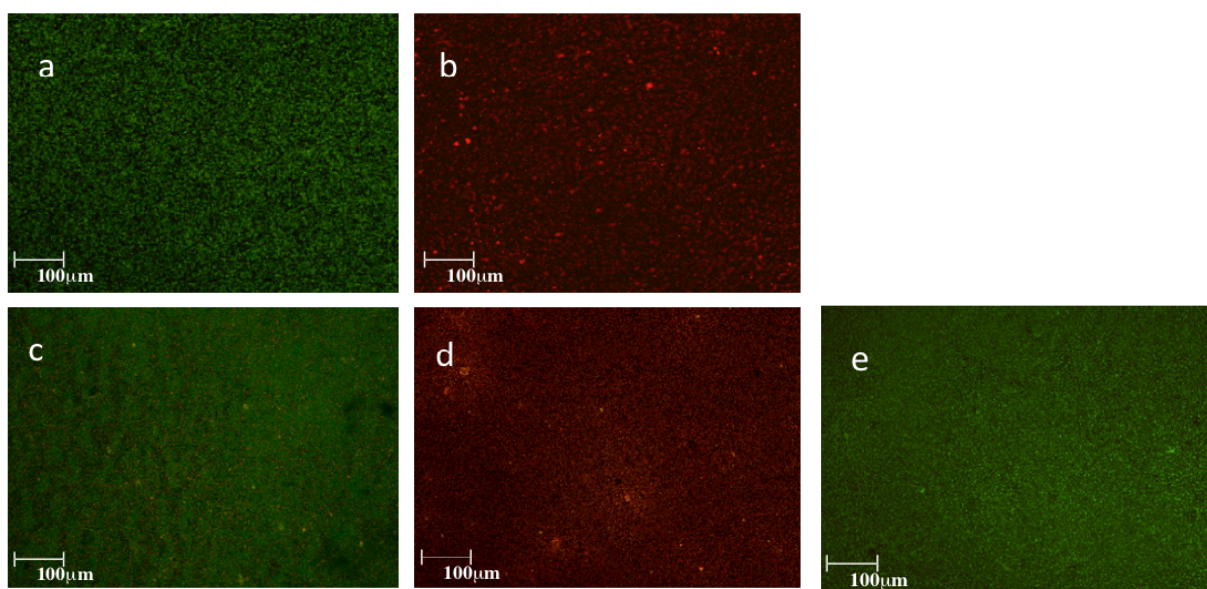


Figure A1.5. *S. aureus* biofilms were labeled with Live/Dead stains after 12 h incubation in growth medium (LB broth) with a solution at 50 μ M antimicrobials. (a) Negative control (LB only). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) Miconazole (**2.4**). (d) Miconazoctylum bromide (**2.5c**) e) 50 μ M **BAC**.

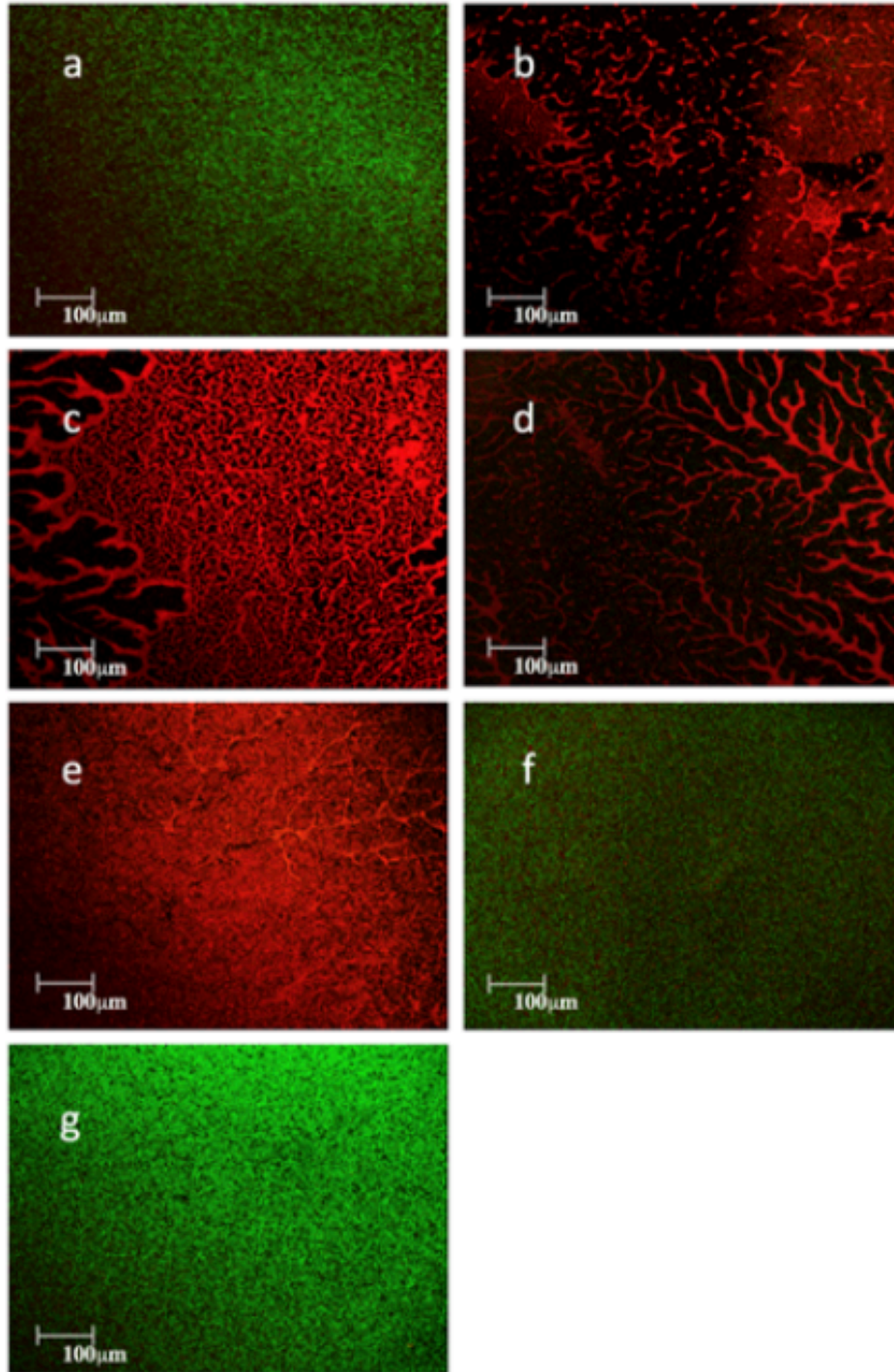
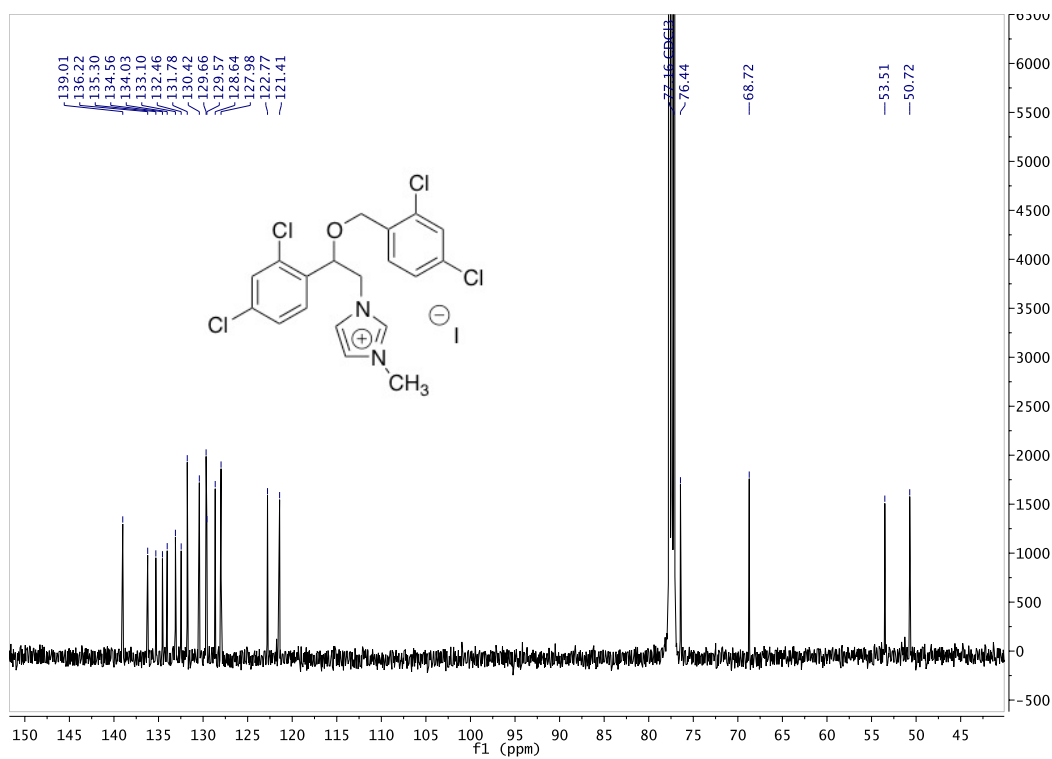
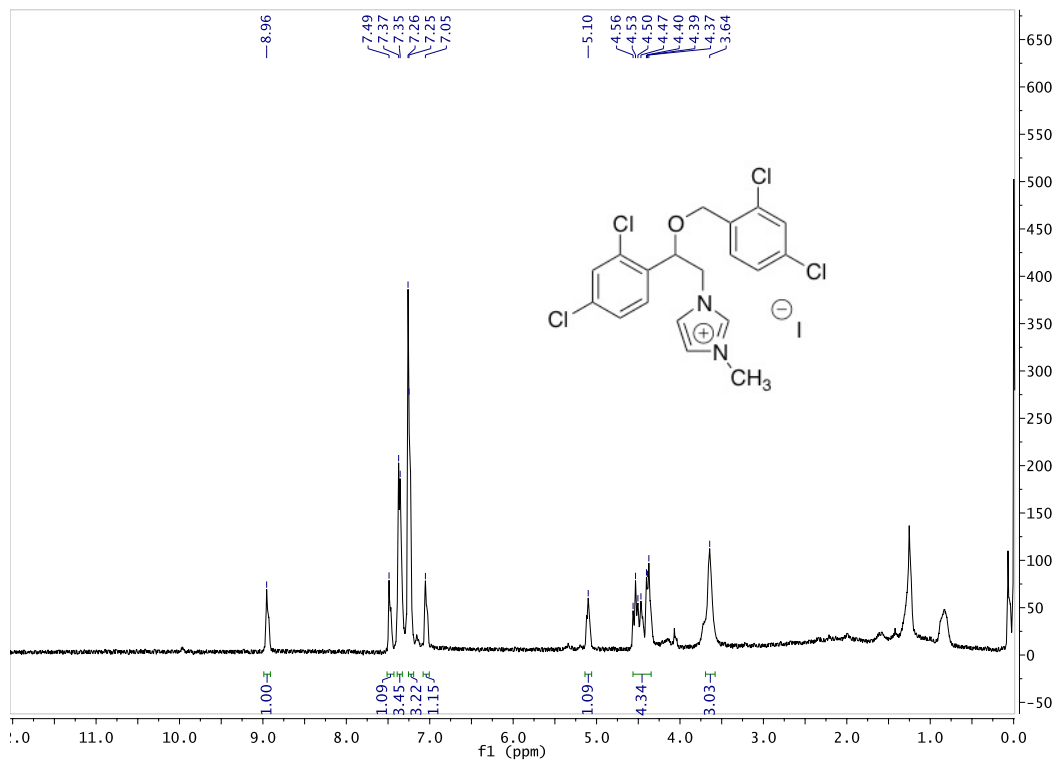


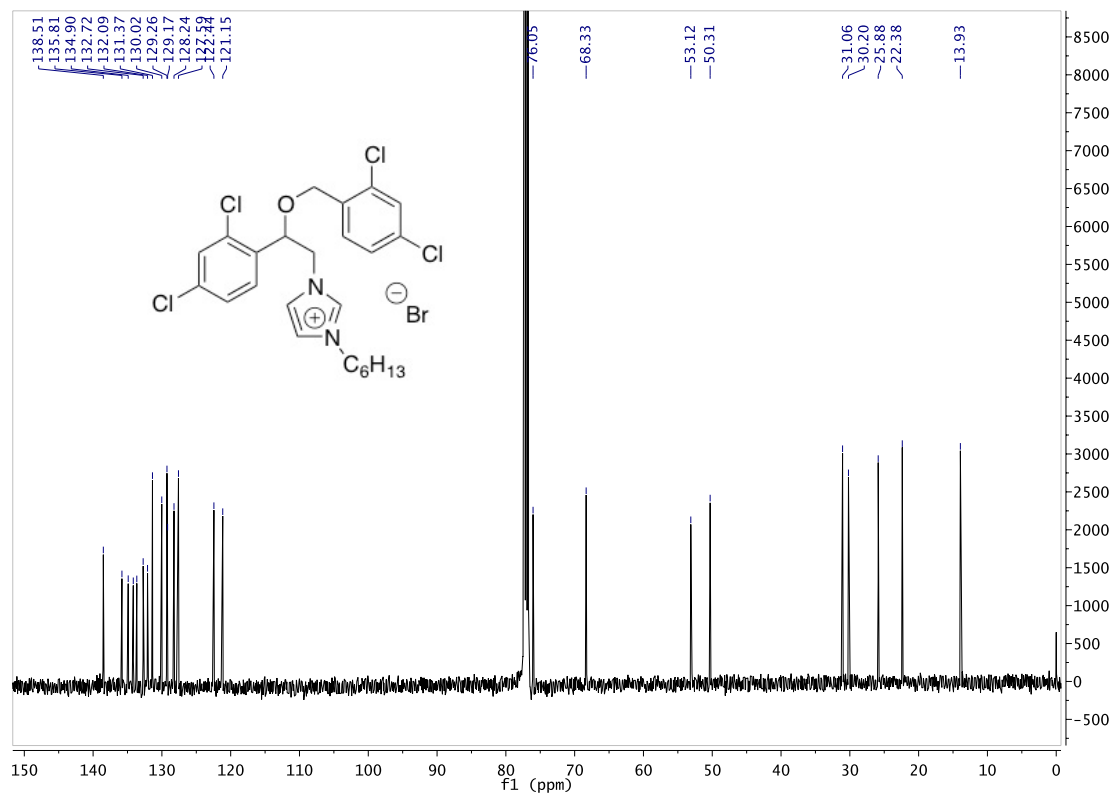
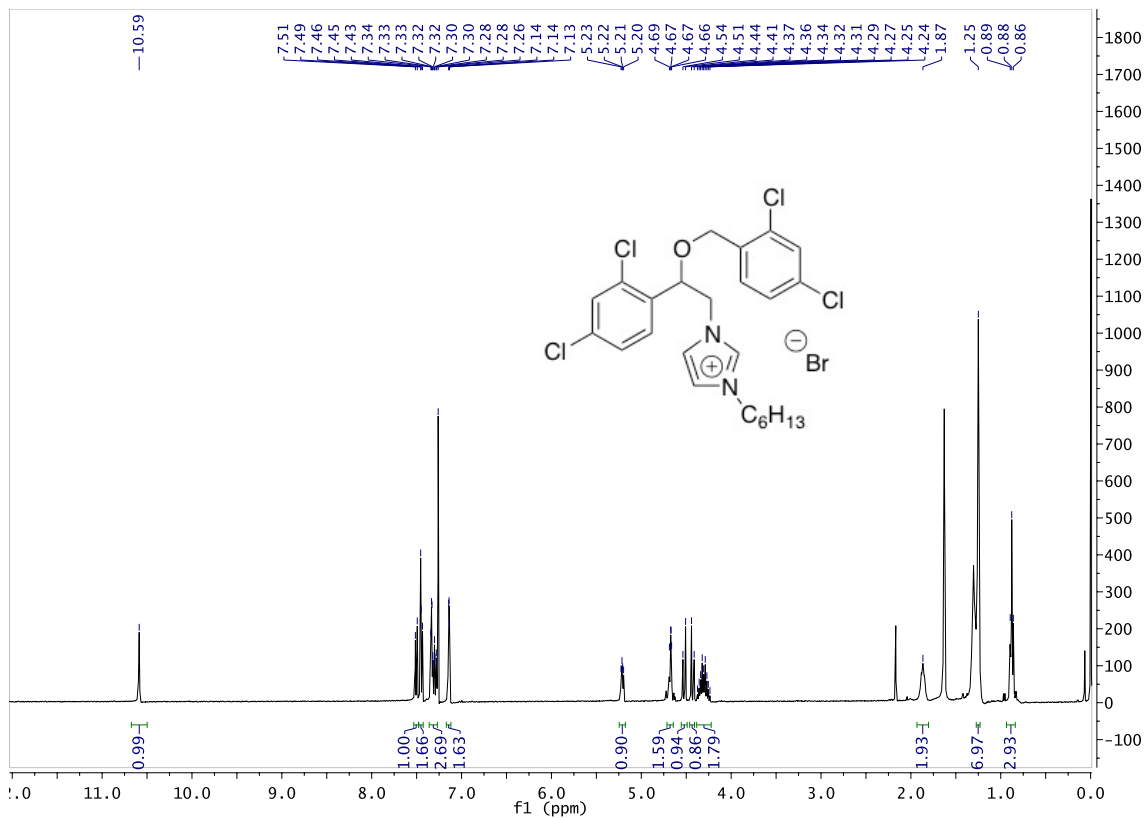
Figure A1.6. Preformed *S. aureus* biofilms treated with different concentration of **BAC** over 24 h monitored in 0.9 % NaCl solution. (a) Negative control (DMSO only, after 24 h). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) 330 μM (MIC after 5 min). (d) 165 μM (1/2 x MIC after 5 min). (e) 83 μM (1/4x MIC after 1 h). (f) 41 μM (1/8x MIC after 24 h). (g) 20 μM (1/8x MIC after 24 h).

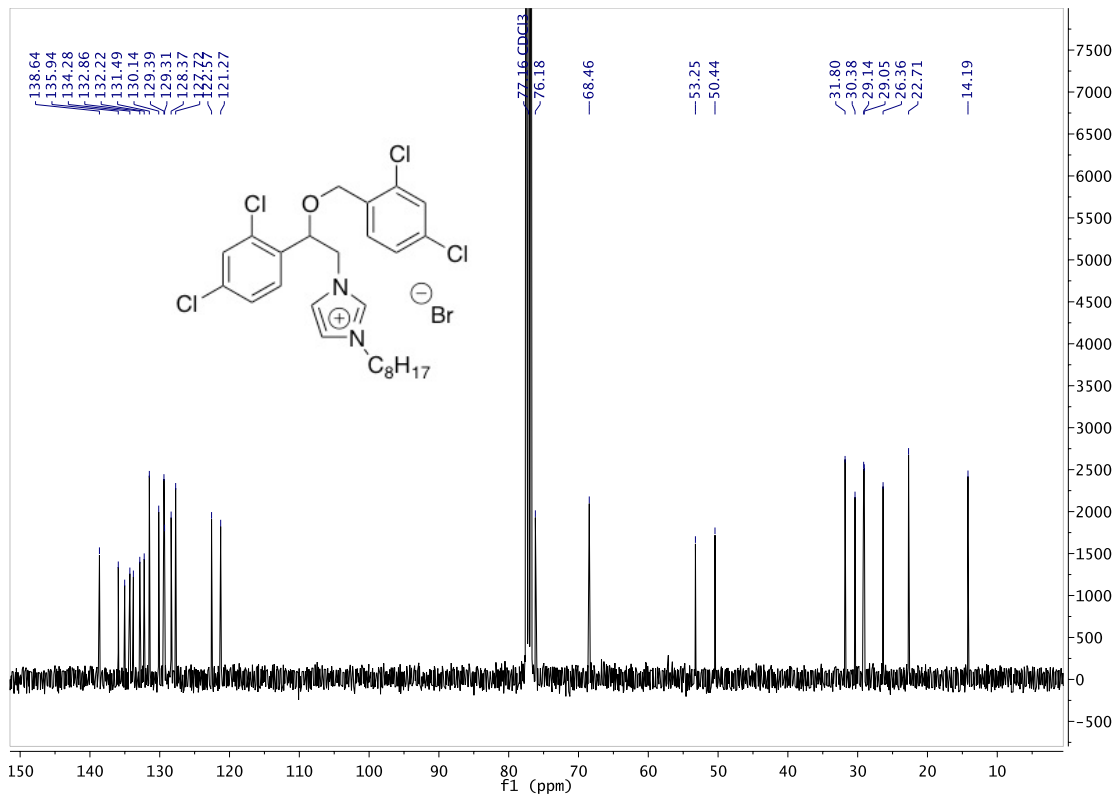
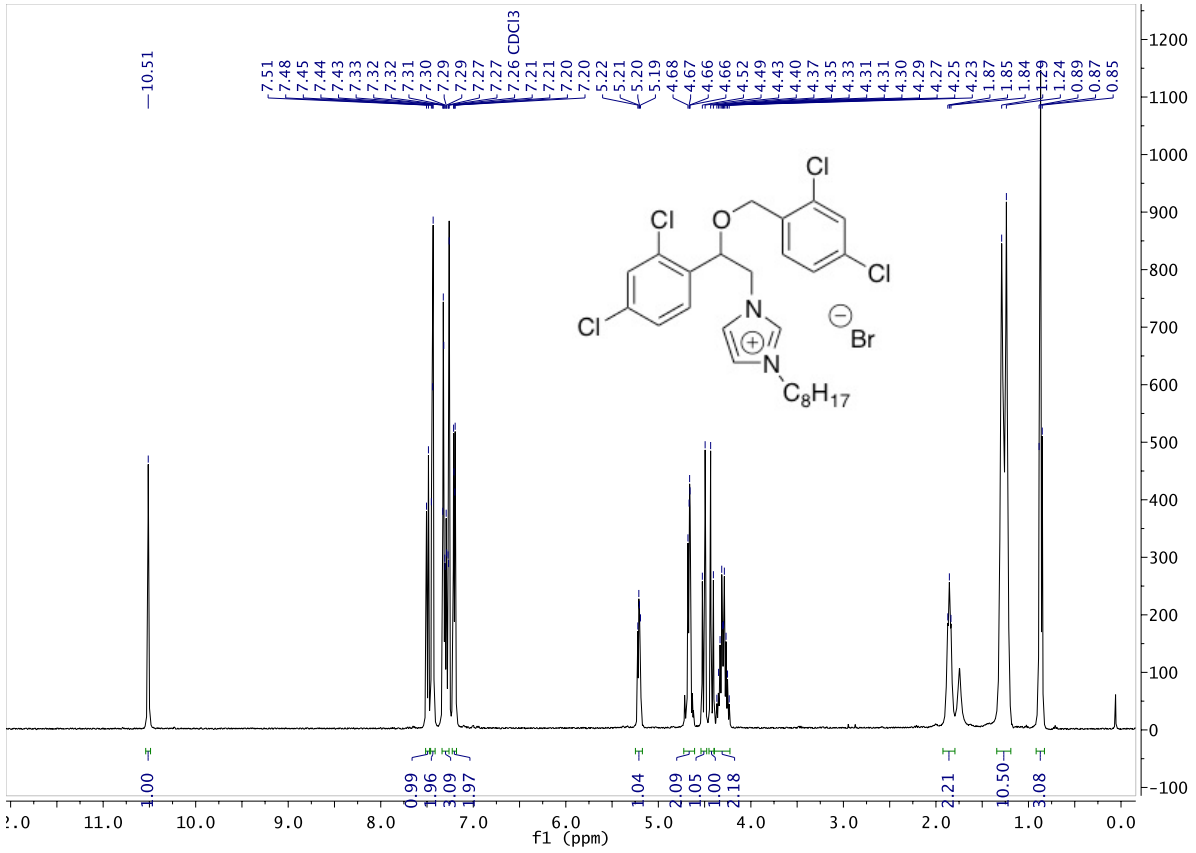
A1.3 References

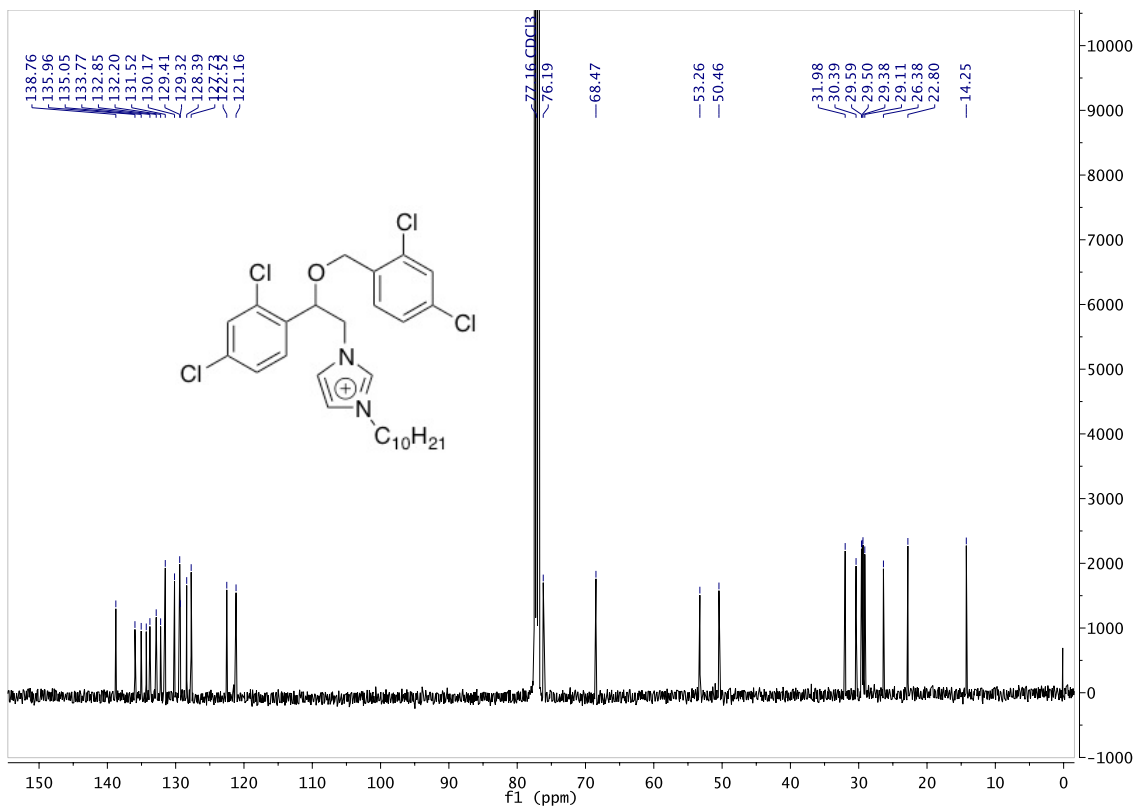
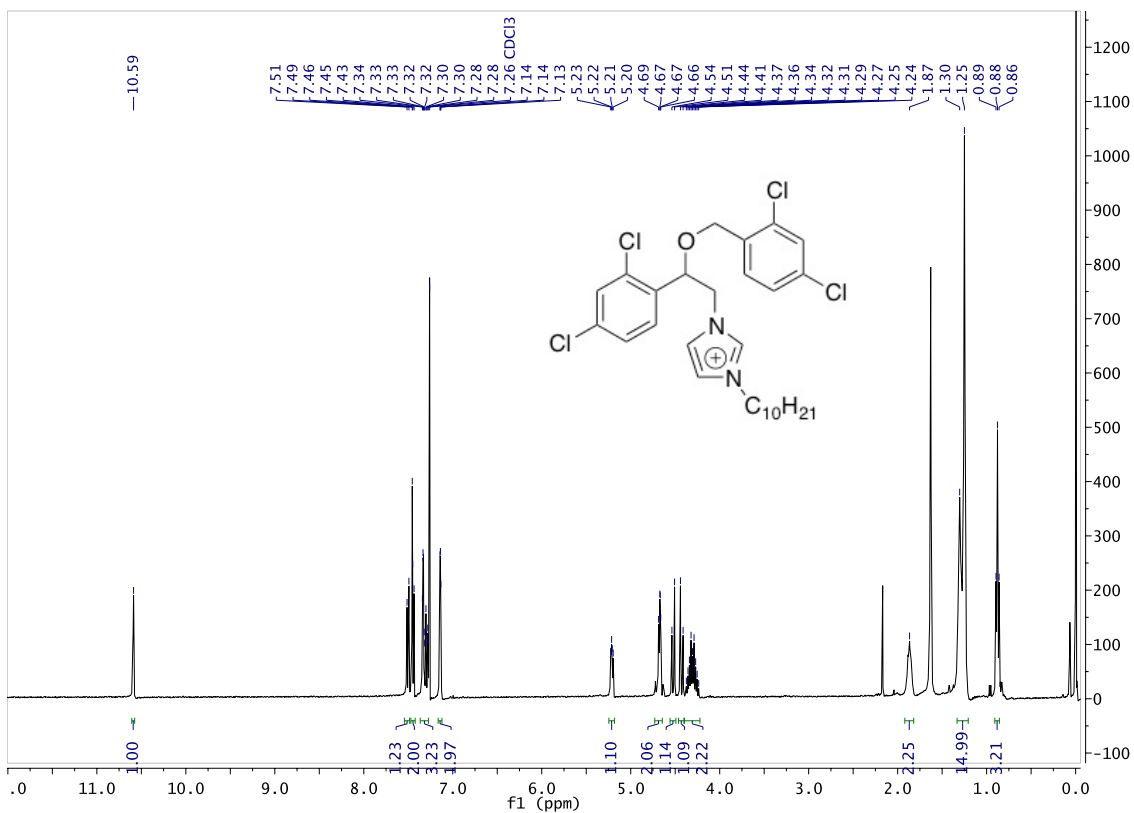
1. Yañez, E. C.; Sánchez, A. C.; Becerra, J. M. S.; Muchowski, J. M.; Almanza, R. C. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2004**, *48*, 49-52.
2. Mangas-Sanchez, J.; Busto, E.; Gotor-Fernandez, V.; Malpartida, F.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (7), 2115- 22.
3. Gravel, J.; Paradis-Bleau, C.; Schmitzer, A. R. *Med. Chem. Commun.* **2017**, *8* (7), 1408-1413.

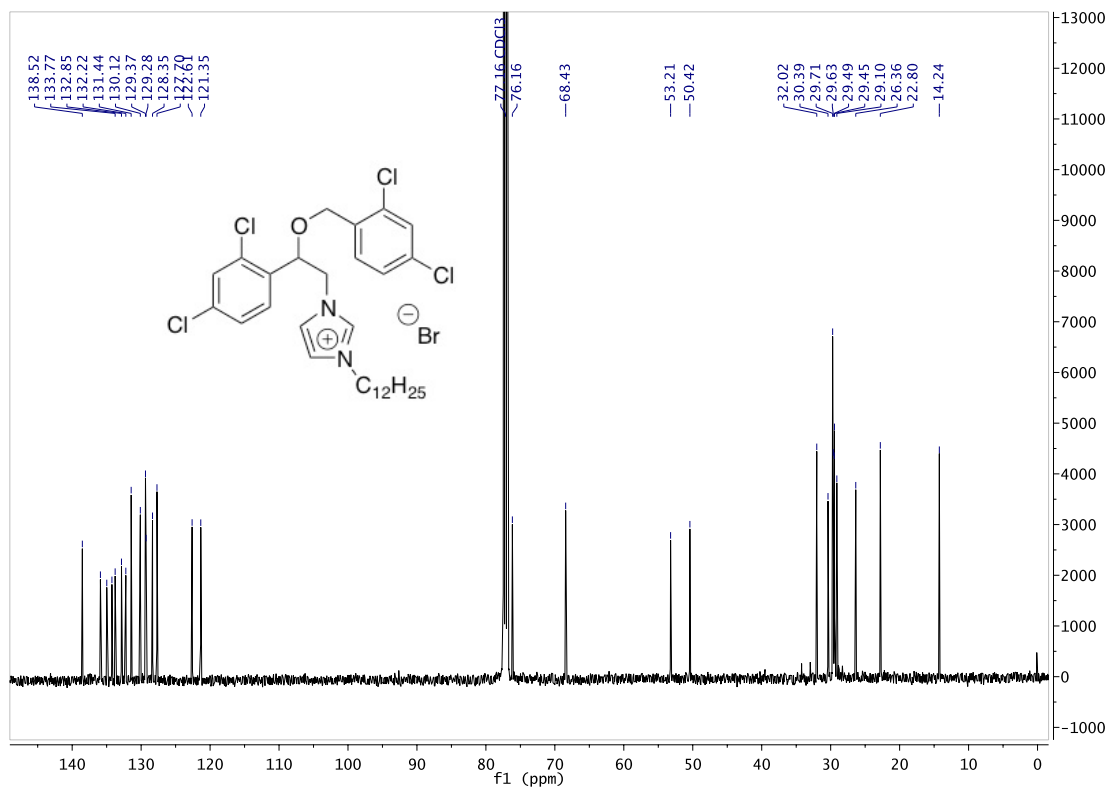
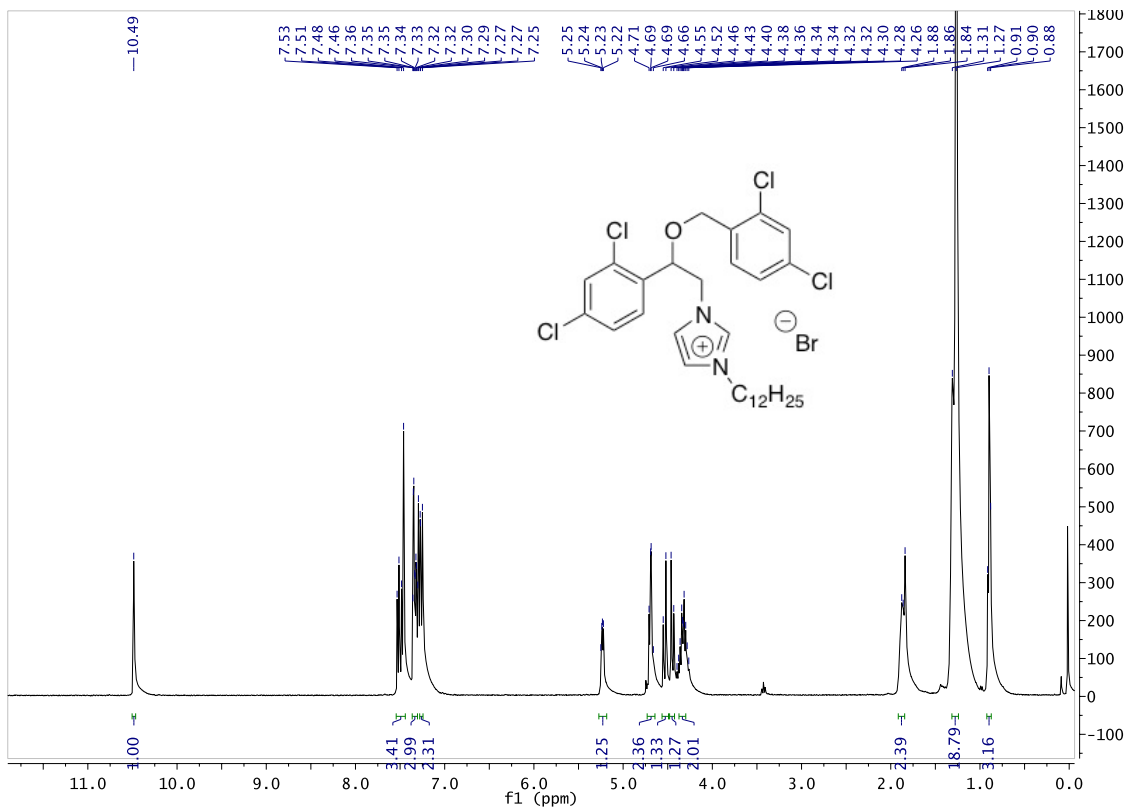
A1.4 NMR spectra of newly synthesized compounds

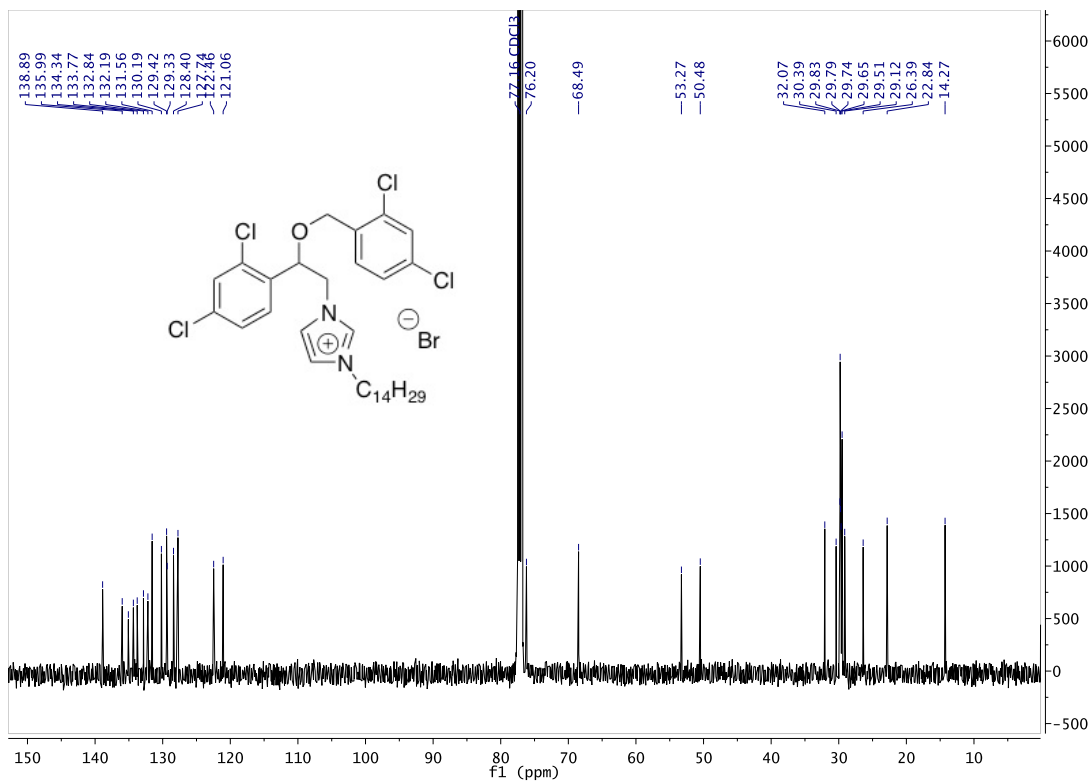
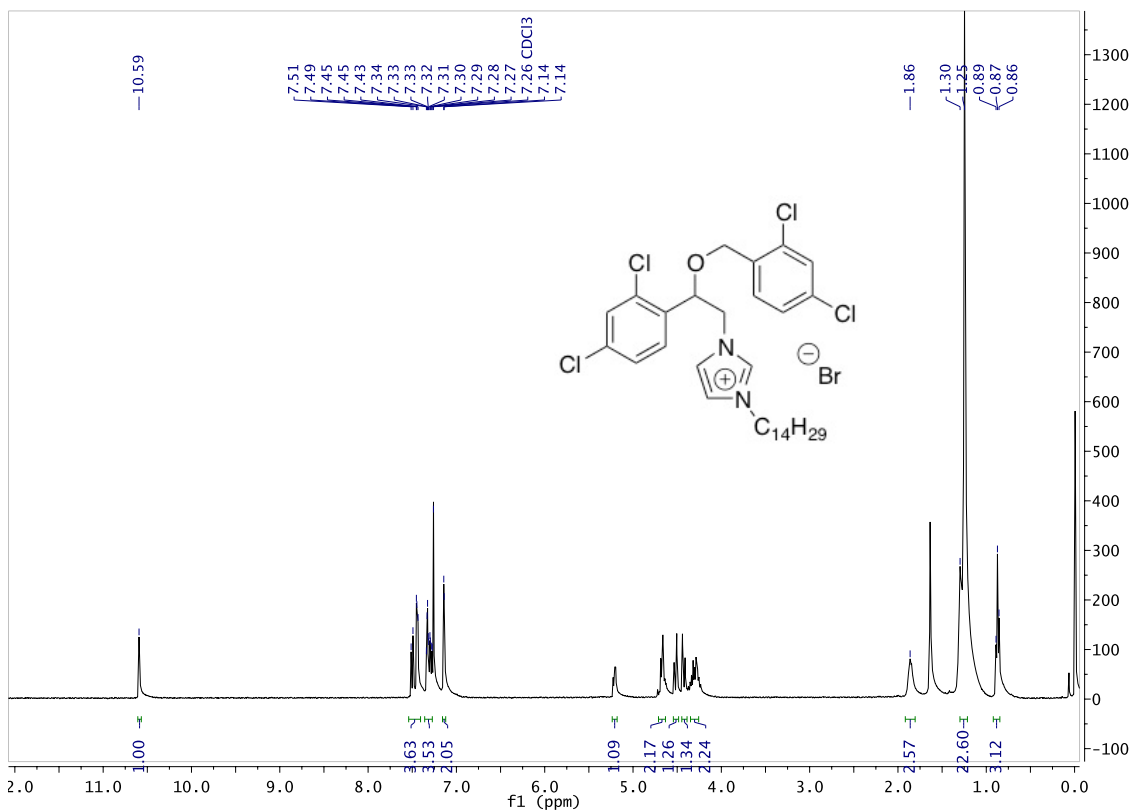


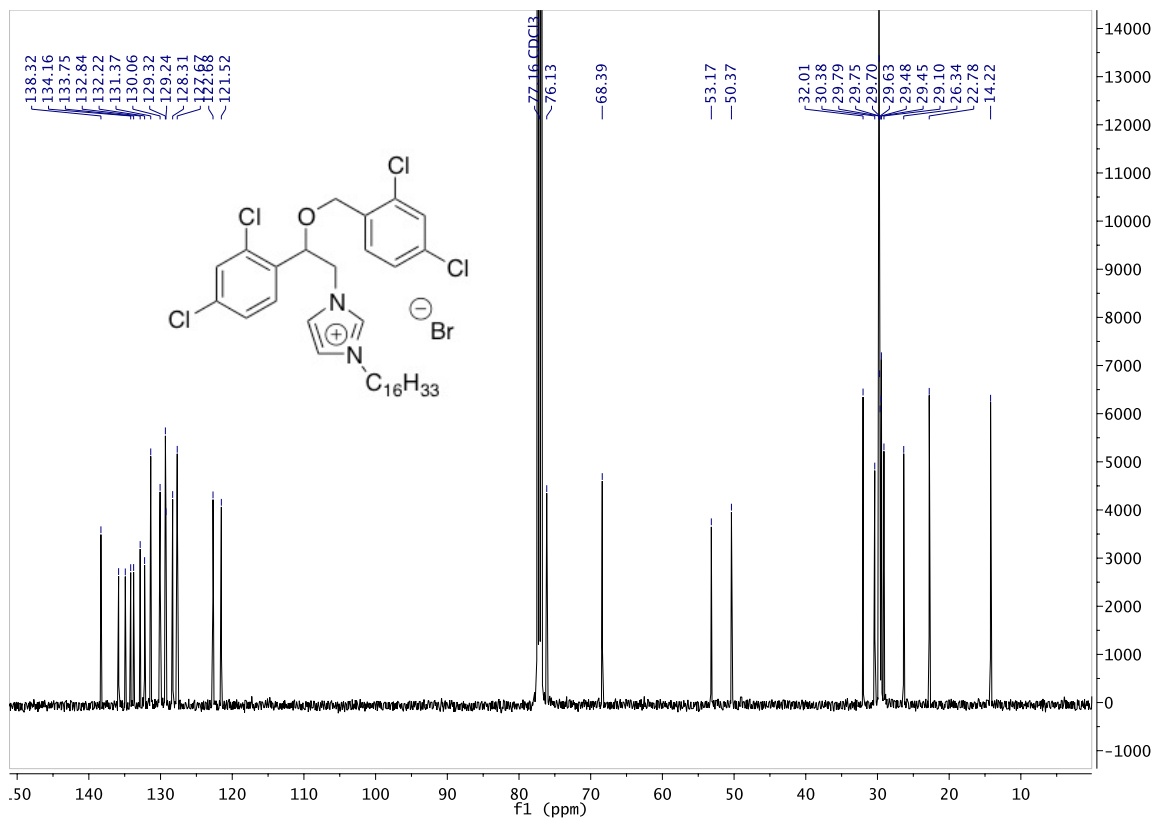
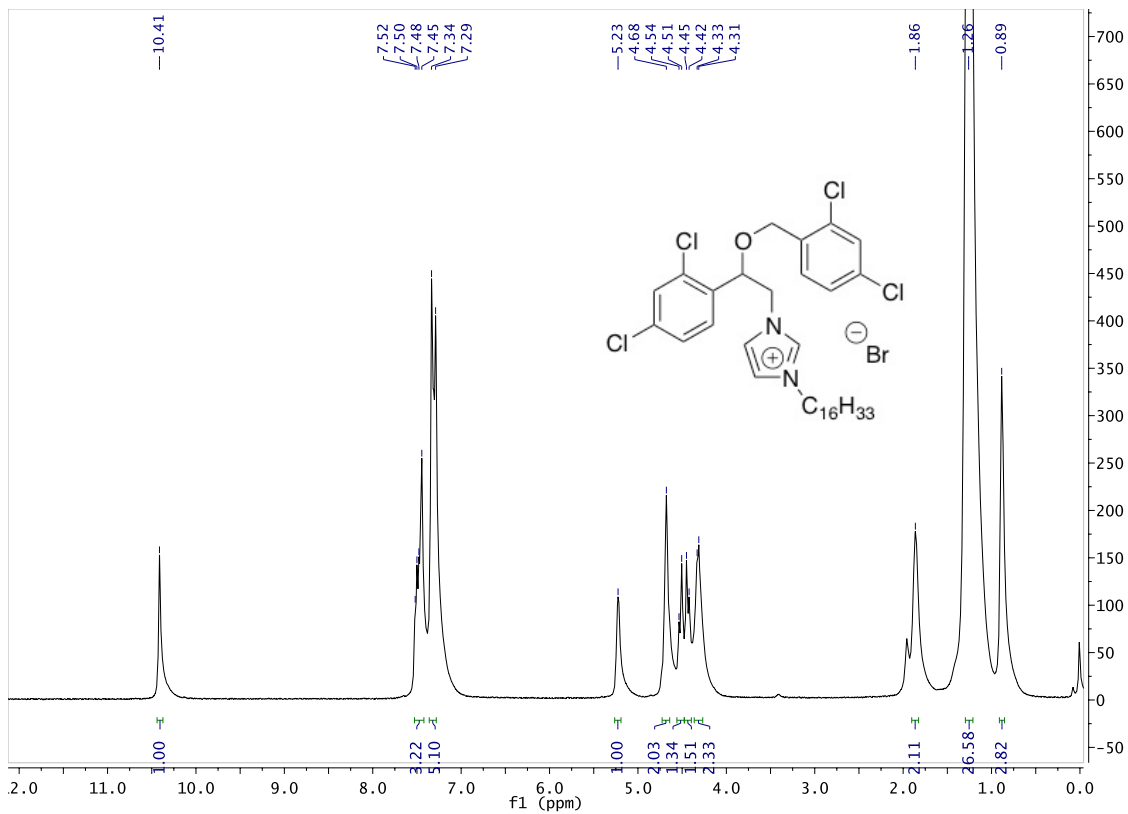












Annexe 2 : informations supplémentaires de l'article 2 « Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Disubstituted Bis-benzimidazolium Salts »

A2.1 Materials and methods.

All starting material were purchased from Sigma-Aldrich. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers. The purity of final compounds used in biological assays was determined by ESI/ LC- MS analysis ($\geq 95\%$).

A2.2 Synthesis and characterization.

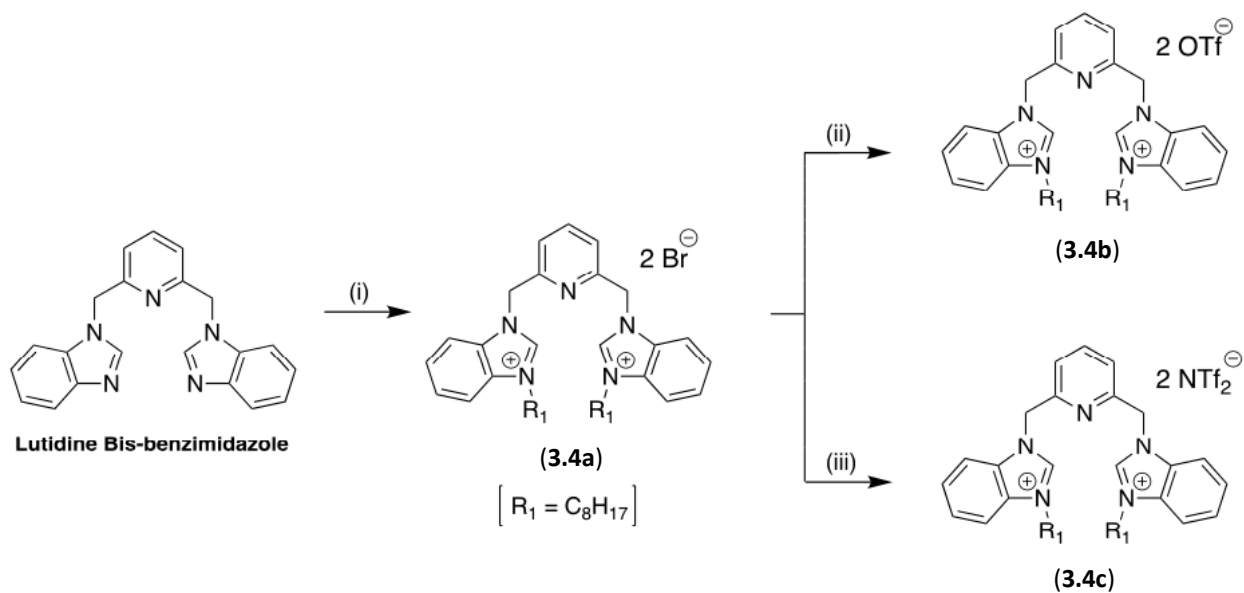


Figure A2.1. Synthesis of **3.4a-c**. Reagents and conditions: (i) Octylbromide, MeCN, 110 °C, MW, 82%; (ii) LiOTf, MeOH, 95%; (iii) LiNTf₂, MeOH, 95%.

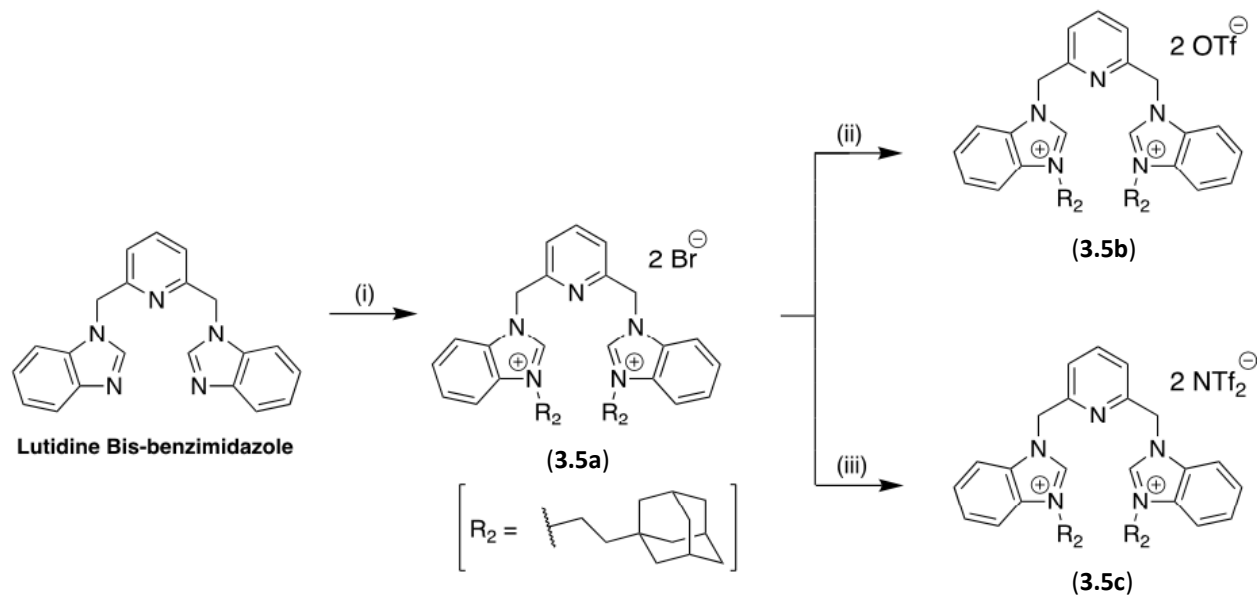


Figure A2.2. Synthesis of **3.5a-c**. Reagents and conditions: (i) Bromoadamantane, MeCN, 70 °C, 86% (ii) LiOTf, MeOH, 95%; (iii) LiNTf₂, MeOH, 95%.

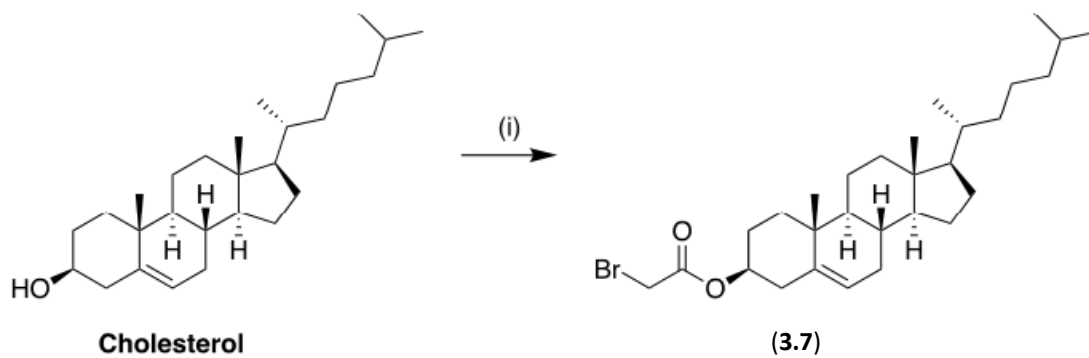


Figure A2.3. Synthesis of **(3.7)**. Reagents and conditions: (i) Bromoacetyl bromide, K₂CO₃, CH₂Cl₂, 88%.

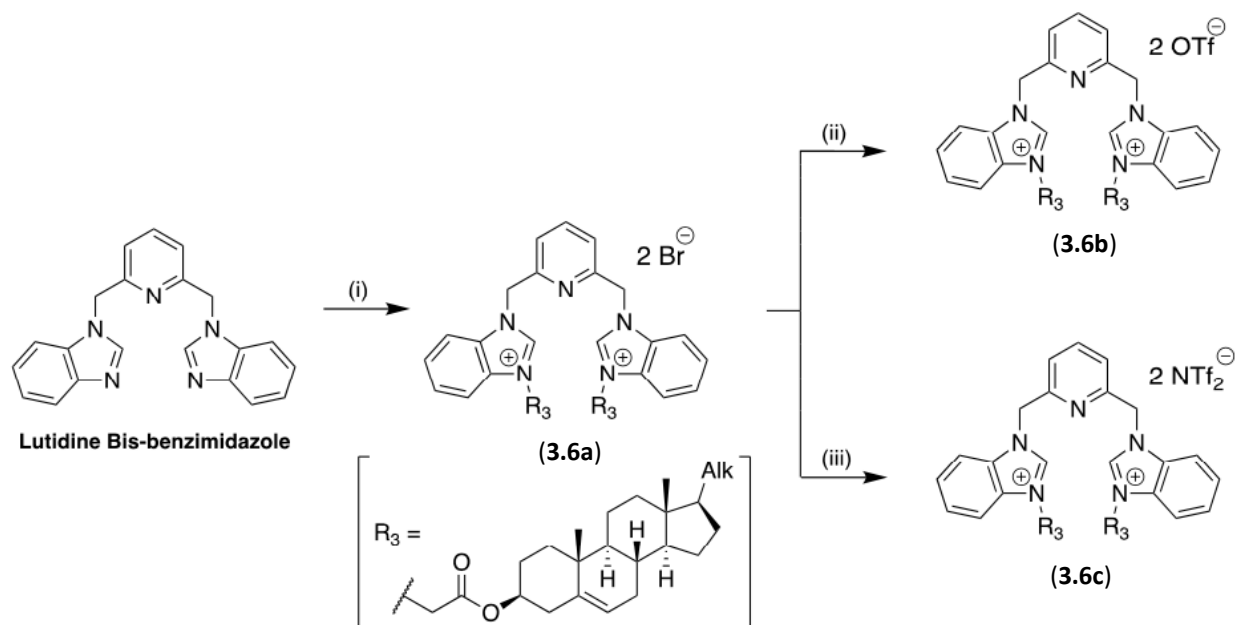
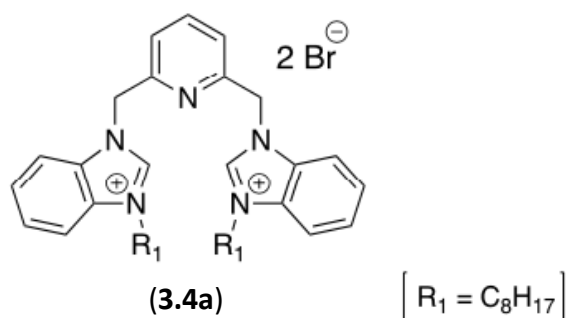
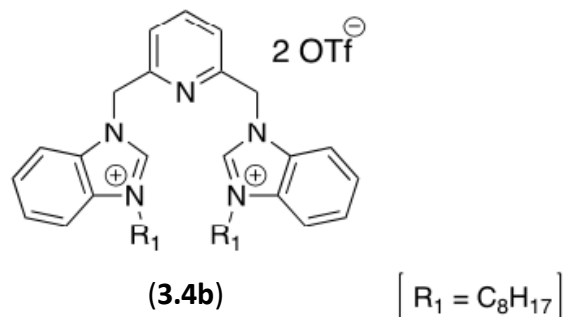


Figure A2.4. Synthesis of **3.6a-c**. Reagents and conditions: (i) (7), pyridine, acetone, reflux, 53%. (ii) LiOTf, MeOH, 95%; (iii) LiNTf₂, MeOH, 95%.



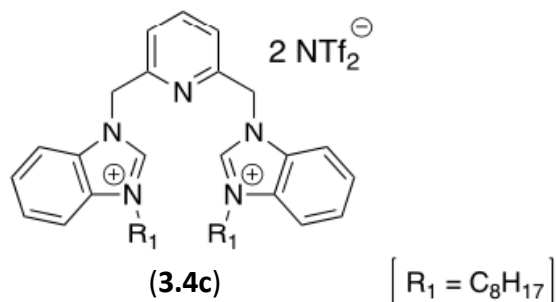
1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-octyl-1H-benzimidazol-3-ium) dibromide (3.4a): Lutidine bisbenzimidazole (100 mg, 0.3 mmol) and 1-bromooctane (250 μ L, 0.9 mmol) were dissolved in 2.5 mL of MeCN. The mixture was heated in a microwave apparatus at 110 $^{\circ}$ C for 1 hour. The reaction was washed with 15 mL of distilled water, then extracted 3 times with CH₂Cl₂ and dried with Na₂SO₄. The solvent was removed under pressure and the resulting slurry was triturated 3 times with EtOAc to obtain product **3.4a** as a white powder in 82% yield. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.89 (s, 2H), 8.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.01 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.69–7.59 (m, 4H), 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.46–7.39 (m, 2H), 5.82 (s, 4H), 4.45 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 1.85 (q, J = 7.6

Hz, 4H), 1.49–1.15 (m, 20H), 0.82 (t, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 153.19, 142.61, 138.90, 131.06, 130.72, 126.46, 126.42, 122.54, 113.71, 113.48, 50.63, 46.75, 39.52, 31.18, 28.62, 28.53, 28.44, 25.77, 22.07, 13.95. ESI-MS: m/z $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_5$) $^+$ *calc.* 565.41, *found* $[\text{M}_2+2]$ 282.71, 283.21, 283.71. IR (neat, cm^{-1}) 2933, 2866, 1746, 1559, 1464, 1405, 1379, 1282, 1173, 1135, 1026.



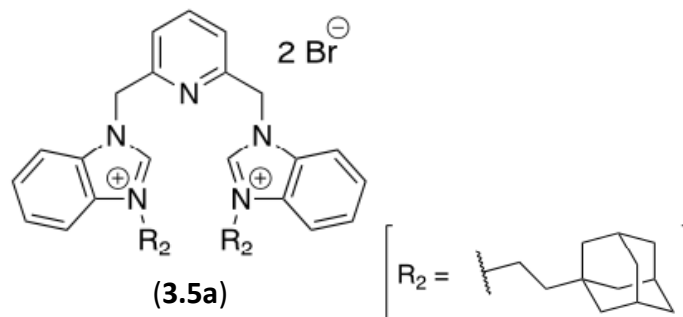
1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-octyl-1H-benzimidazol-3-

ium)bis(trifluoromethane)sulfonate (3.4b): Compound **3.4a** (50 mg, 0.07 mmoles) was dissolved in 5 mL of methanol. LiOTf (24 mg, 0.15 mmol) was added to the mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. After evaporation of the residual solvent under reduced pressure, 3 mL of distilled water were added and the suspension was stirred to remove any traces of unwanted salt. This process was repeated 3 times then the raw product was lyophilized overnight to obtain the product as a white solid in 95% yield. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.89 (s, 2H), 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.06 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.69–7.59 (m, 4H), 7.57 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.46–7.39 (m, 2H), 5.82 (s, 4H), 4.45 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 1.85 (q, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.49 – 1.17 (m, 20H), 0.82 (t, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 153.19, 142.61, 138.90, 131.07, 130.72, 126.45, 126.42, 122.54, 113.71, 113.48, 50.62, 46.75, 39.52, 31.18, 28.62, 28.53, 28.44, 25.77, 22.07, 13.95. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO) : -78.42. ESI-MS: m/z $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_5$) $^+$ *calc.* 565.41, *found* $[\text{M}_2+2]^+$ 282.71, 283.21, 283.74. IR (neat, cm^{-1}) 2930, 2862, 1746, 1602, 1564, 1486, 1464, 1441, 1405, 1379, 1272, 1252, 1222, 1166, 1025.

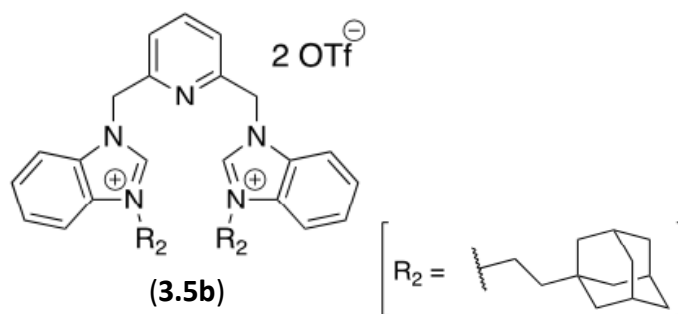


1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-octyl)-1H-benzimidazol-3-ium)

bis(trifluoromethane)sulfonimide (3.4c): Compound **3.4a** (50 mg, 0.07 mmol) was dissolved in 5 mL of methanol. LiNTf₂ (44.2 mg, 0.15 mmol) was added to the mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. After evaporation of the residual solvent under reduced pressure, 3 mL of distilled water were added and the suspension was stirred to remove any traces of unwanted salt. This process was repeated 3 times then the raw product was lyophilized to obtain the product as a white solid in 95% yield. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.89 (s, 2H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.03 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.69–7.60 (m, 4H), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.46–7.39 (m, 2H), 5.82 (s, 4H), 4.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.85 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.49–1.15 (m, 20H), 0.82 (t, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 153.20, 142.61, 138.90, 131.06, 130.72, 126.46, 126.48, 122.54, 113.71, 113.48, 50.64, 46.75, 39.52, 31.19, 28.62, 28.53, 28.44, 25.77, 22.07, 13.95. ¹⁹F NMR (471 MHz, DMSO): -79.98. ESI-MS: *m/z* [M-H]⁺ (C₃₇H₅₁N₅)⁺ *calc.* 565.41, *found* [M₂+/2] 282.71, 283.21, 283.71. IR (neat, cm⁻¹) 2930, 2862, 1746, 1602, 1564, 1486, 1464, 1441, 1405, 1379, 1272, 1252, 1222, 1166, 1025.

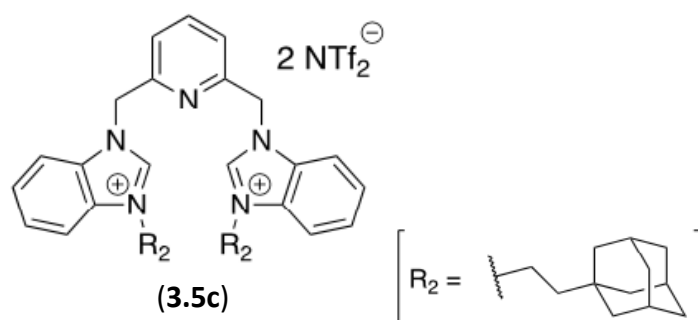


1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)ethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ium)dibromide (3.5a): Lutidine bisbenzimidazole (100 mg, 0.3 mmol) and (2-bromoethyl)adamantane (219 mg, 0.9 mmol) were dissolved in 2.5 mL of MeCN. The mixture was stirred under reflux overnight. The reaction was washed with 15 mL of distilled water, then extracted 3 times with CH₂Cl₂ and dried with Na₂SO₄. The solvent was removed under pressure and the resulting slurry was triturated three times with EtOAc to give product **3.5a** as a white powder (203 mg, 0.246 mmol) in 82% yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.86 (s, 2H), 8.10–7.88 (m, 3H), 7.63 (dd, *J* = 17.1, 8.0 Hz, 4H), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 5.80 (s, 2H), 4.58–4.26 (m, 4H), 1.99 (s, 6H), 1.76–1.60 (m, 30H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153.1, 153.1, 142.5, 142.5, 138.9, 138.2, 131.1, 131.0, 130.6, 130.4, 126.4, 126.3, 122.5, 121.5, 117.5, 113.6, 113.4, 107.2, 50.6, 42.3, 41.4, 39.5, 36.4, 31.7, 27.9. IR (neat, cm⁻¹) 2932, 2866, 1746, 1561, 1463, 1405, 1379, 1282, 1174, 1134, 1026.

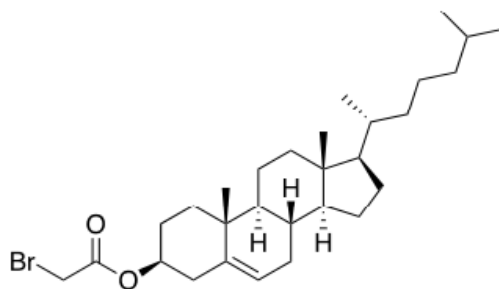


1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)ethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ium) bis(trifluoromethane)sulfonate (3.5b): Compound **3.5a** (50 mg, 0.07 mmoles) was dissolved in 5 mL of methanol. LiOTf (24 mg, 0.15 mmol) was added to the mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. After evaporation of the

residual solvent under reduced pressure, 3 mL of distilled water were added and the suspension was stirred to remove any traces of unwanted salt. This process was repeated 3 times then the raw product was lyophilized overnight to give the product as a white solid in 97% yield. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.88 (s, 2H), 8.10–7.88 (m, 3H), 7.63 (dd, J = 17.1, 8.0 Hz, 4H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 5.82 (s, 2H), 4.58–4.26 (m, 4H), 1.99 (s, 6H), 1.76–1.60 (m, 30H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 153.2, 153.1, 142.6, 142.5, 138.9, 138.3, 131.2, 131.0, 130.6, 130.4, 126.5, 126.4, 122.5, 121.6, 117.51, 113.7, 113.5, 107.3, 50.6, 42.3, 41.5, 39.5, 36.4, 31.8, 27.9. IR (neat, cm^{-1}) 2933, 2866, 1746, 1564, 1464, 1404, 1379, 1282, 1173, 1026.

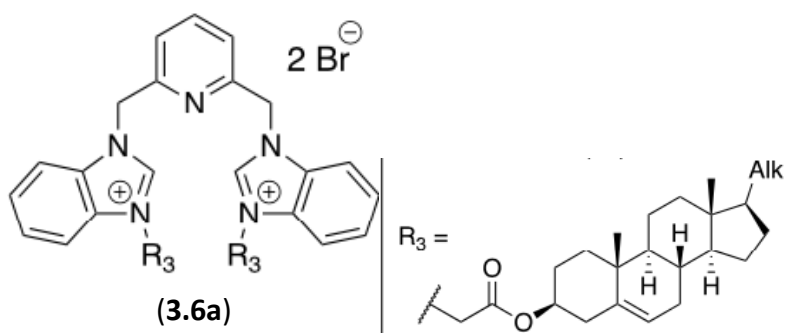


1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1-yl)ethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ium) bis(trifluoromethane)sulfonamide (3.5c): Compound **3.5a** (50 mg, 0.07 mmol) was dissolved in 5 mL of methanol. LiNTf₂ (44.2 mg, 0.15 mmol) was added to the mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. After evaporation of the residual solvent under reduced pressure, 3 mL of distilled water were added and the suspension was stirred to remove any traces of unwanted salt. This process was repeated 3 times then the raw product was lyophilized to obtain the product as a white solid in 92% yield. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.73 (s, 2H), 8.00 (dd, J = 19.1, 8.0 Hz, 3H), 7.62 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 7.51 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 5.77 (s, 2H), 4.64–4.22 (m, 4H), 1.99 (s, 6H), 1.85–1.50 (m, 30H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 153.2, 153.1, 142.5, 142.4, 138.9, 131.1, 130.6, 126.4, 126.4, 122.5, 120.7, 118.2, 113.6, 113.4, 86.1, 54.9, 50.6, 42.3, 41.4, 39.5, 36.4, 31.7, 27.9. IR (neat, cm^{-1}) 2933, 2867, 1746, 1464, 1404, 1379, 1282, 1173, 1135, 1026.



(3.7)

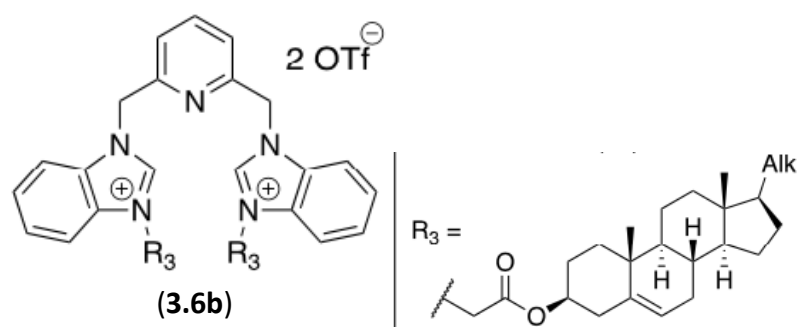
(3β)-cholest-5-en-3-ester bromide (3.7): Cholesterol (1 g, 2.59 mmol) and K₂CO₃ (536 mg, 3.88 mmol) were dissolved in dry CH₂Cl₂ (25 mL). This mixture was stirred at 0 °C for 30 minutes before bromoacetyl bromide (252 μL, 2.88 mmol) was added dropwise at 0 °C. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for 12 h. The reaction was quenched with 25 mL of water and extracted 3x with 10 ml CH₂Cl₂ then dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under pressure to give **3.7** as a white solid in 88% yield. ESI-MS: *m/z* [M-H]⁺ 506.2, *found* 507.2 (C₂₉H₄₇BrO₂)⁺ *calc.* 506.3, *found* 507.3. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 5.27 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.26 (s, 1H), 2.31-0.91 (m, 2H), 2.19-1.94 (m, 40H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm = 166.6, 140.8, 121.8, 73.1, 56.5, 56.2, 50.8, 42.7, 39.9, 38.5, 37.4, 35.8, 32.0, 31.8, 28.4, 28.1, 26.3, 25.9, 24.6, 23.2, 21.1, 19.4, 19.3, 12.0. IR (neat, cm⁻¹) 2933, 2866, 1746, 1464, 1404, 1379, 1282, 1173, 1135, 1026.



(3.6a)

1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-(4-(cholesteryl)-1H-benzimidazol-3-ium) dibromide: Lutidine bisbenzimidazole (**3.6a**) (0.78 g, 1.5 mmoles) and (**3.7**) (0.23 g, 0.68 mmoles) were dissolved in 10 mL of dry acetone. The mixture was stirred under reflux overnight. The precipitated obtained was filtered and washed with CH₂Cl₂ and ethyl acetate. The pure product

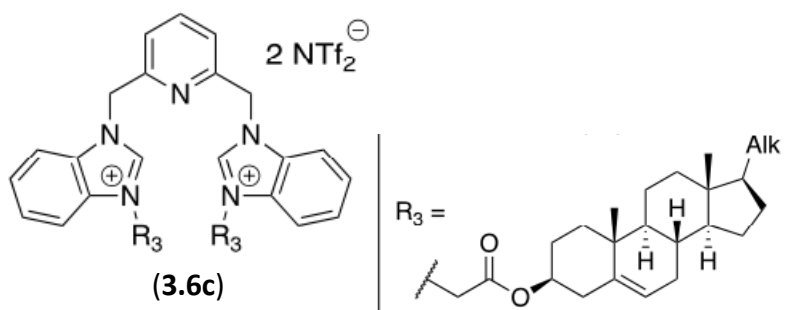
was dried in an oven to obtain a white solid in 53% yield. ESI-MS: m/z $[M-H]^+$ (C₇₉H₁₁₁N₅O₄) 1193.86 *found* $[M-2H/2]^+$ 593.96, 597.43, 597.96. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 8.92 (s, 2H), 8.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.72 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 6.99 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.99 (s, 4H), 5.32 (s, 4H), 5.27 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 4.60 (m, 2H), 2.31-0.88 (m, 84H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm = 171.0, 157.2, 140.8, 137.0, 136.4, 131.7, 131.6, 126.5, 126.2, 121.8, 119.2, 113.4, 73.8, 60.5, 59.2, 56.5, 56.2, 50.8, 42.7, 39.9, 39.8, 38.5, 37.4, 36.1, 35.8, 32.0, 31.8, 28.4, 28.1, 26.3, 25.9, 24.6, 21.1, 19.4, 19.3, 12.0. IR (neat, cm⁻¹) 2933, 2865, 1746, 1561, 1464, 1404, 1379, 1282, 1173, 1135.



1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-cholesteryl-1H-benzimidazol-3-ium)

bis(trifluoromethane)sulfonate (3.6b): Compound (3.6a) (0.05 g, 0.07 mmoles) was dissolved in 5 mL of MeOH. LiOTf (24 mg, 0.15 mmol) was added to the mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. After evaporation of the residual solvent under reduced pressure, 3 mL of distilled water were added and the suspension was stirred to remove any traces of unwanted salt. This process was repeated 3x then the raw product was lyophilized overnight to obtain the product as a white solid in 95% yield. ESI-MS: m/z $[M-H]^+$ (C₇₉H₁₁₁N₅O₄) *calc.* 1193.86 *found* $[M-2H/2]^+$ 593.96, 597.43, 597.96. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 8.92 (s, 2H), 8.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.72 (m, 2H), 7.39 (d, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.99 (s, 4H), 5.32 (s, 4H), 5.27 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 4.60 (m, 2H), 2.31-0.88 (m, 84H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm = 171.0, 157.2, 140.8, 137.0, 136.4, 134.1, 131.7, 131.6, 126.5, 126.2, 121.8, 119.2, 113.4, 73.8, 60.5, 59.2, 56.5, 56.2, 50.8, 42.7, 39.9, 39.8, 38.5, 37.4, 36.1,

35.8, 32.0, 31.8, 28.4, 28.1, 26.3, 25.9, 24.6, 21.1, 19.4, 19.3, 12.0. IR (neat, cm^{-1}) 2933, 2865, 1746, 1561, 1464, 1404, 1379, 1282, 1173, 1135.



1,1'-(pyridine-2,6-diylbis(methylene))bis(3-cholesteryl)-1H-benzimidazol-3-ium

bis(trifluoromethane)sulfonimide (3.6c): Compound (3.6a) (0.05 g, 0.07 mmol) was dissolved in 5 mL of MeOH. LiNTf_2 (44.2 mg, 0.15 mmol) was added to the mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 12h. After evaporation of the residual solvent under reduced pressure, 3 mL of distilled water were added and the suspension was stirred to remove any traces of unwanted salt. This process was repeated 3x then the raw product was lyophilized and the product was obtained as a white solid in 92% yield. ESI-MS: m/z $[\text{M}-\text{H}]^+$ ($\text{C}_{79}\text{H}_{111}\text{N}_5\text{O}_4$) *calc.* 1193.86 *found* $[\text{M}-2\text{H}/2]^+$ 593.96, 597.43, 597.96 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8.92 (s, 2H), 8.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.72 (m, 2H), 7.39 (d, 7.7 Hz, 2H), 6.99 (d, 8.3 Hz, 2H), 5.99 (s, 4H), 5.32 (s, 4H), 5.27 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.60 (m, 2H), 2.31-0.88 (m, 84H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 171.0, 157.2, 149.0, 140.8, 137.0, 136.4, 131.7, 131.6, 126.5, 126.2, 121.8, 119.2, 113.4, 73.8, 60.5, 59.2, 56.5, 56.2, 50.8, 42.7, 39.9, 39.8, 38.5, 37.4, 36.1, 35.8, 32.0, 31.8, 28.4, 28.1, 26.3, 25.9, 24.6, 21.1, 19.4, 19.3, 12.0. IR (neat, cm^{-1}) 2933, 2865, 1746, 1561, 1464, 1404, 1379, 1282, 1173, 1135.

A2.3 Concepts and methods used

A2.3.1 Bacterial strains, culture conditions, and viability assays.

MICs were determined in 96-well microtiter plates. Assays were conducted in Lauria Broth (LB) medium at 37 °C in triplicate. Bacterial cell density (OD at 600 nm) was measured using a Fischer Scientific cell density meter model 40. UV-vis and fluorescence spectroscopy experiments

were performed on a Tecan Infinite M200 microplate reader. Bacterial cell lysis 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 $OD_{600nm} = 0$).

A2.3.2 EYPC liposomes.

2 ml of a 25 mg/mL solution of egg-yolk phosphatidyl choline (EYPC) in chloroform were slowly reduced *in vacuo* to form a thin film on the side of a flask. 1 mL of PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , adjusted to pH = 7.4) was added and the resulting suspension and subjected to 10 freeze/thaw cycle (1 cycle = 1 min at -20 °C followed by 1 min at 37 °C). The mixture was extruded on a 100 nm polycarbonate membrane 21 times and diluted to obtain a final concentration of 10 mM. In a plastic cuvette were added 2 mL of ultrapure water, 20 μ L of the liposome solution

A2.3.3 Lucigenin-based ion transport assays.

A 20 μ L aliquot of the stock solution of EYPC liposomes was added to a cuvette containing 2 mL of a solution of NaCl and 10 mM phosphate buffer to obtain a 0.25-0.3 mM solution of phospholipid. The fluorescence of intravesicular dye was monitored with an excitation at 372 nm and the emission was recorded at 503 nm. A 20 μ L aliquot of transporter (different concentrations) in MeOH was injected. At the end of the experiment, 10% aqueous Triton-X was injected to lyse the liposomes. The temperature was set to 25 °C. Experiments were repeated in triplicate and all traces reported are the average of the independent three trials.

A2.3.4 Biofilm inhibition assay.

S. aureus cells were incubated in LB medium at 37 °C for 5 h and rediluted in LB medium to the desired final concentration ($OD_{600nm} = 0.1-0.15$). *S. aureus* biofilms were labeled with Live/Dead stain after 12 h incubation with antibiotics in growth medium (LB broth). Negative Control: DMSO (final concentration not exceeding 10 % volume). Positive Control: 70 % ethanol.

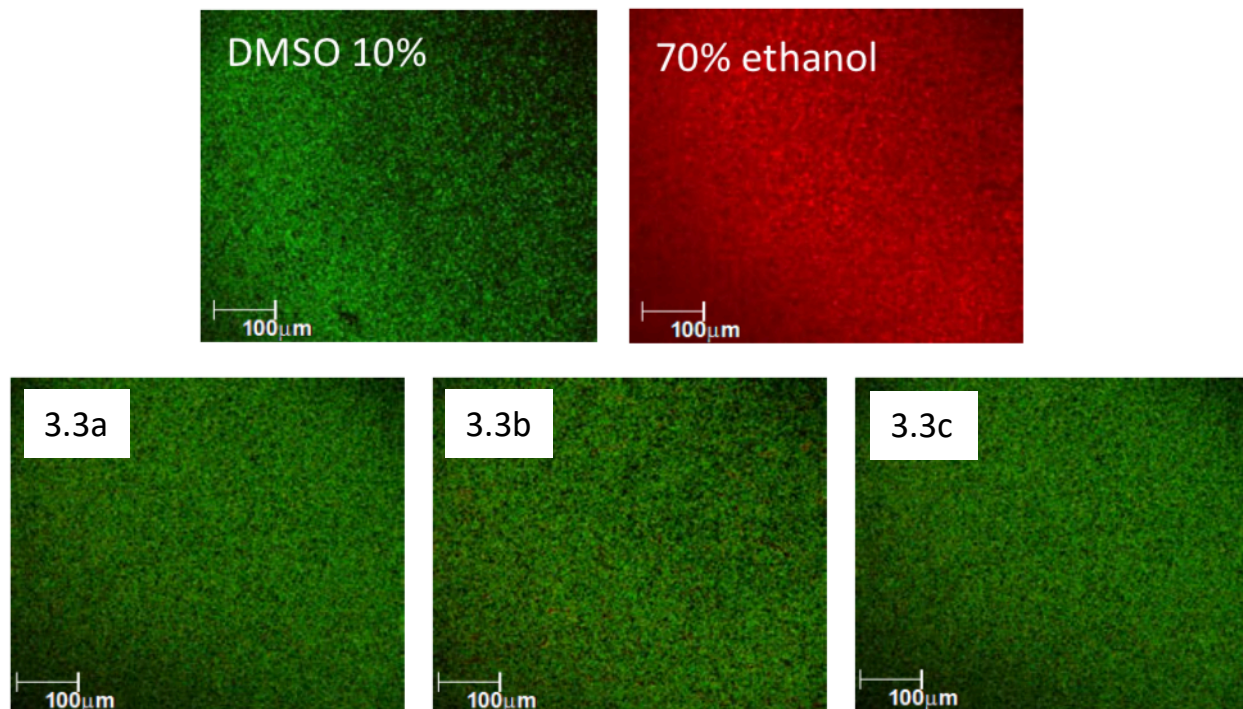


Figure A2.5. MRSA biofilms labeled with Live/Dead stains after a 24 h incubation in growth medium with $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ antimicrobial. (a) Negative control (DMSO 10%). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) **3.3a-c**, $50 \mu\text{g mL}^{-1} = 20\times\text{MIC}$.

A2.3.5 Biofilm disruption assay.

S. aureus cells were incubated in LB medium at 37°C for 5 h and rediluted in LB medium to the desired final concentration ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1\text{-}0.15$). After an incubation of 12 h in 8-well chambers, the growth media was removed via pipetting and the resulting biofilms were washed 2 times with 0.9 % NaCl solution to remove the remaining planktonic cells. Formed *S. aureus* biofilms were treated with antibiotics over a 24 h monitoring in 0.9 % NaCl solution Negative Control: DMSO (final concentration not exceeding 10 % volume). Positive Control: 70 % ethanol.

A2.3.6 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis.

Biofilms stained with FilmTracer™ Live/Dead® Biofilm viability kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd.). Briefly, a working solution of fluorescent stains was prepared by adding $1 \mu\text{L}$ of SYTO® 9 stain and $1 \mu\text{L}$ of PI stain to 1 mL of filter-sterilized water. Two hundreds μL of staining

solution were deposited on each well of a 8-well chambered coverglass, after 15 min at room temperature in the dark, samples were washed with sterile saline (0.9% NaCl) from base of the support material. Then, biofilms were examined with a confocal laser microscope (Leica model TCS SP5; Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) using a 20x dry objective (HC PL FLUOTAR 20.0 x 0.50 DRY). A 488 nm laser line was used to excite SYTO® 9, while the fluorescent emission was detected from 500 to 540 nm. PI was sequentially excited with 561 nm laser line and its fluorescent emission was detected from 600 to 695 nm.

A2.3.7 Biofilm formation: crystal violet assay.

S. aureus cells were incubated in LB medium at 37 °C for 5 h and rediluted in LB medium to the desired final concentration (OD_{600nm}= 0.1-0.15). After an incubation with antibiotics of 24-72 h in 8-well chambers, the growth media was removed via pipetting and the resulting biofilms were washed 2 times with saline (0.9% NaCl) to remove the remaining planktonic cells. A saturated solution of crystal violet was added, after 30 min at room temperature, samples were washed 2 times with saline (0.9% NaCl). The stained biofilms were left in saline solution to avoid evaporation and the residual biofilm are observed.



Figure A2.6. Preformed MRSA biofilms treated with different concentrations of **3.4a** after 24 h monitored in 0.9 % NaCl solution. Crystal violet assay (right) (a) Negative control (DMSO only). (b) Positive control (70 % ethanol). (c) 50 µg/mL. (d) 20 µg/mL. (e) 10 µg/mL. (f) 5 µg/mL (MIC). (g) 2.5 µg/mL. (h) 1.25 µg/mL.

A2.3.8 Dynamic light scattering (DLS) assay.

The size of the aggregates was measured by Dynamic Light Scattering on a Wyatt Technology's Möbius® instrument in distilled water at different concentrations of salts dissolved in DMSO.

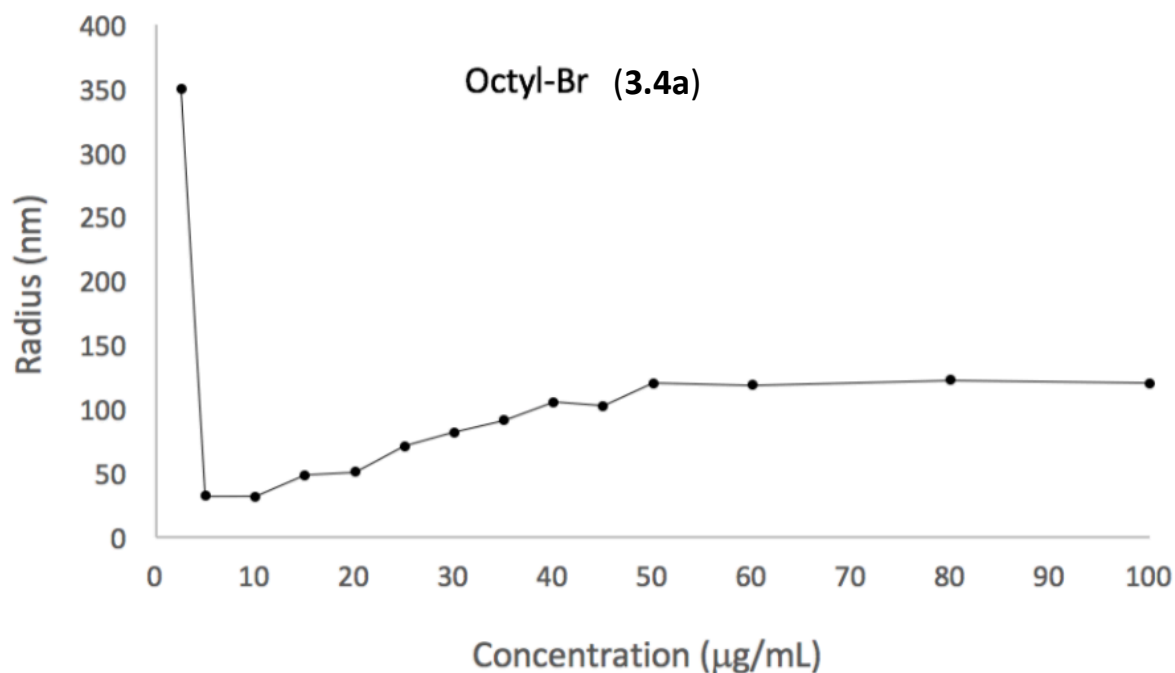


Figure A2.7. Size (radius) of the aggregates formed by **3.4a** at different concentrations.

A2.3.9 Molecular modelling.

All calculations were performed on a Windows® Vista platform. In order to assess the energy content for various molecules designed, semi-empirical quantum calculations were undertaken using the PM6 method in gas phase or in aqueous solution (MOPAC2009TM; ©Stewart Computational Chemistry). Theoretical calculations were carried out at the restricted Hartree-Fock level (RHF) using the PM6 semi-empirical SCF-MO methods. All structures were optimized to a gradient inferior to 0.1 using the eigenvector following method. The MOPAC Cartesian coordinates were generated with OpenBabel 2.2.0 graphical interface (©Chris Morley) from the geometries obtained with ArgusLab UFF.

A2.3.9 Hemolytic assay.

Red blood cells in Alserver's solution were centrifuged 10 min. at 300 x g, washed 3 times with PBS buffer and resuspended in PBS at 2% v/v. In a 96 wells plate was added 195 μL of red blood cells solution and 5 μL of compound in DMSO, and the plate was incubated with light agitation for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. The plate was then centrifuged for 10 min at 300 x g and 50 μL of the supernatant of each well was transferred to another plate. Absorbance was measured at $\lambda = 405 \text{ nm}$.

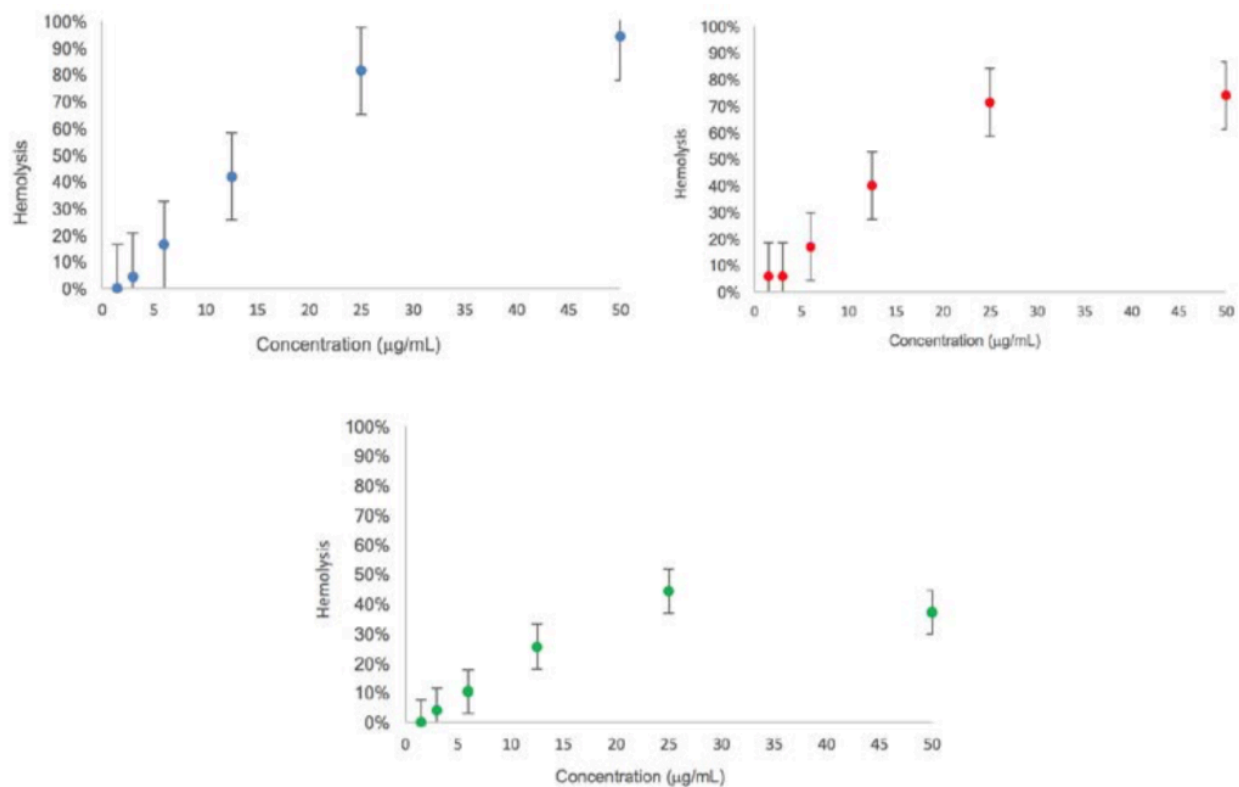


Figure A2.8. Red blood cells hemolysis of compound **3.3a**, **3.3b**, and **3.3c**.

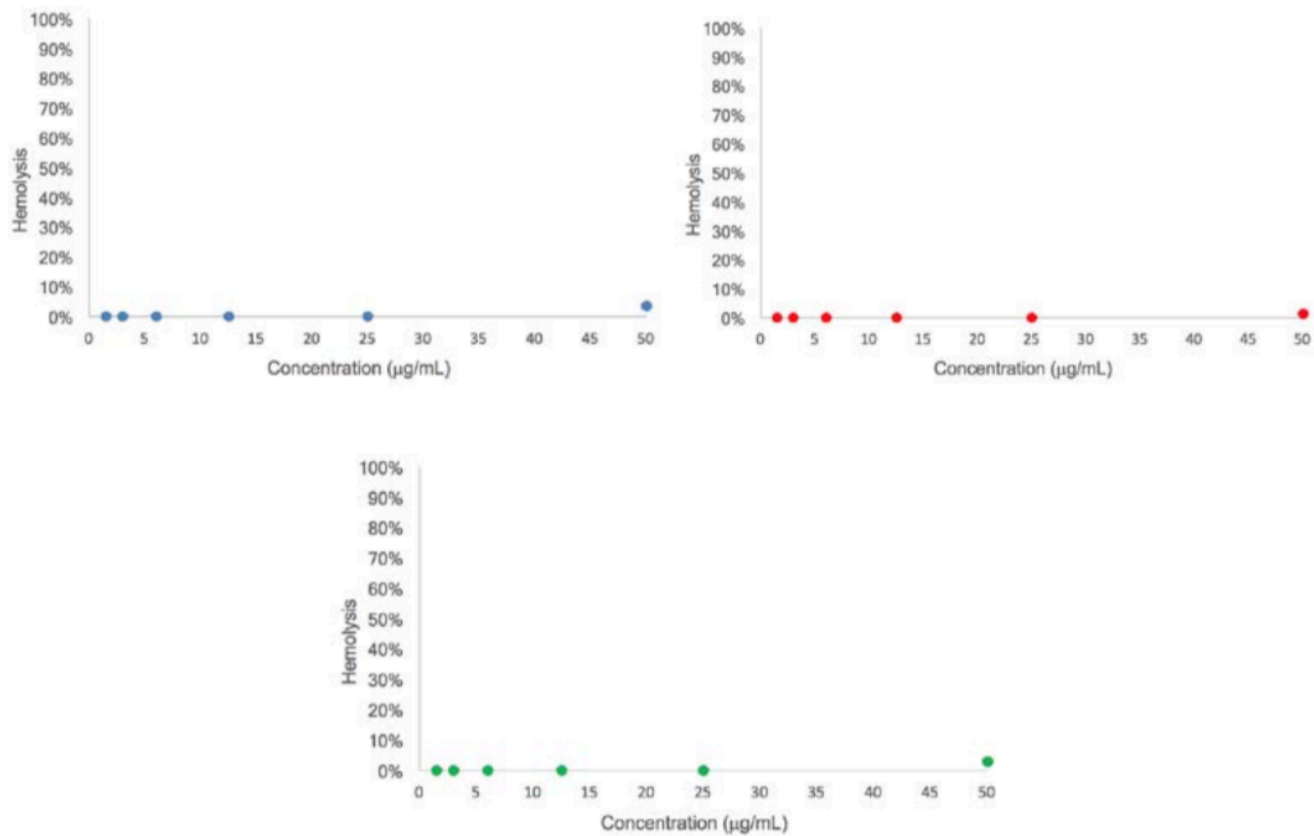


Figure A2.9. Red blood cells hemolysis of compound **3.4a**, **3.4b**, and **3.4c**.

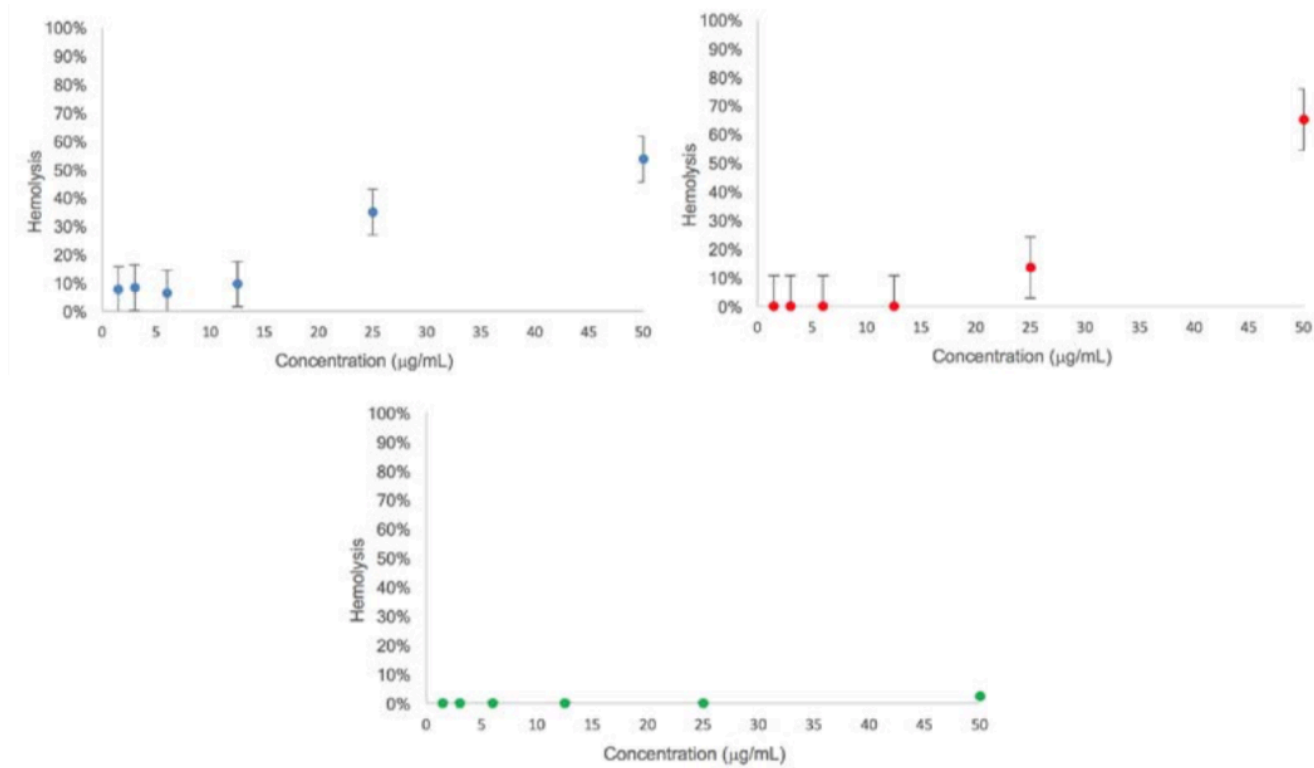
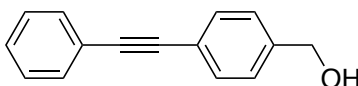


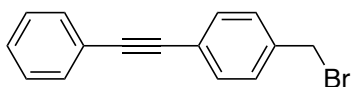
Figure A2.10. Red blood cells hemolysis of compound **3.5a**, **3.5b**, and **3.5c**.

Annexe 3 : informations supplémentaires de l'article 3 « Benzimidazolium salts prevent and disrupt methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms »

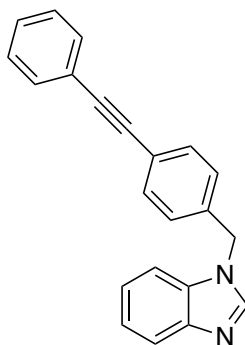
A3.1 Synthesis and characterization.



(4-phenylethynyl)benzyl alcohol (4.2). To a carefully degassed solution of 4-iodobenzyl alcohol (4.0 g, 17.1 mmol), PPh₃ (90 mg, 0.343 mmol), and PdCl₂(PPh₃)₂ (120 mg, 0.171 mmol) in 50 mL of dry THF, (65 mg, 0.343 mmol) and Et₃N (19.1 mL, 137 mmol) was added. The mixture was degassed for another 5 min before phenylacetylene (1.98 mL, 18 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred overnight at 50 °C under nitrogen atmosphere. Then, 50 mL of water was added and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The combined organic fractions were wash with NH₄Cl_(sat) when a blue aqueous phase was observed, brine, and dried over Na₂SO₄. The solvent is removed under reduced pressure and the resulting brownish solid was triturated with hexane until no more apolar (solvent front) product was observed by TLC (40 % EtOAc/hexane). Filtration of the resulting solid afforded **(4-phenylethynyl)benzyl alcohol (4.2)** as a white solid in 90% isolated yield (3.21 g, 15.4 mmol). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ7.54-7.50 (m, 4H), 7.37-7.24 (m, 5H), 4.66 (s, 2H), 2.00 (b, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ140.9, 131.7, 131.5, 128.3, 128.2, 126.7, 123.1, 122.3, 89.3, 89.1, 64.8. HRMS (ESI) calcd for C₁₅H₁₃O⁺[M+H]⁺: 209.0961, found 209.0969.

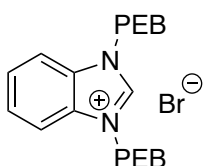


(4-phenylethynyl)benzyl bromide (4.3). (4-Phenylethynyl) benzyl alcohol (**4.2**) (1.0 g, 4.8 mmol) was dissolved in 20 mL of dry CH_2Cl_2 . The mixture was cooled to $0\text{ }^\circ\text{C}$ and phosphorus tribromide (0.68 mL, 7.20 mmol) was added dropwise. Then the mixture was stirred for 2 hours at $0\text{ }^\circ\text{C}$ then water was added and the aqueous phase was extracted 3 times with CH_2Cl_2 . Then, silica gel was added before the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by filtration on silica gel (Hexane 100 %) to afford (4-phenylethynyl)benzyl bromide (**4.3**) as a white solid in 100 % isolated yield (1.3 g, 4.8 mmol). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.54-7.48 (m, 4H), 7.37-7.24 (m, 5H), 4.48 (s, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 137.6, 131.9, 131.5, 129.0, 128.3, 128.2, 123.3, 122.9, 90.2, 88.8, 32.9. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Br}^+[\text{M}+\text{H}]^+$: 271.0117, found 271.0109.

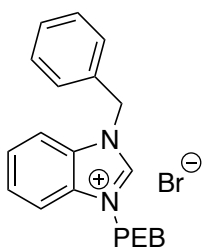


(4-phenylethynyl)benzyl benzimidazole (4.5). To a solution of benzimidazole (869 mg, 7.36 mmol) in THF (30.0 mL) at $0\text{ }^\circ\text{C}$ was added sodium hydride (336 mg, 8.4 mmol) portion wise. After stirring for 15 minutes, (4-phenylethynyl)benzyl bromide (**4.3**) (1.9 g, 7.00 mmol) was slowly added. The reaction is allowed to warm up to room temperature and stirred until no more starting benzimidazole was observed by TLC (100% EtOAc) (2-3 h). The reaction was then quenched with water (200 mL) and the resulting precipitate was filtered and washed with water, EtOAc, and Hexane to afford (4-phenylethynyl)benzyl benzimidazole (**4.5**) as a white solid in 93% yield (2.0 g, 6.5 mmol). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7.66–7.51 (m, 7H), 7.44–7.38 (m, 3H), 7.33 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 2H), 7.21 (d, $J = 6.2\text{ Hz}$, 2H), 5.56 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 137.6, 131.7, 131.5, 131.4, 131.3, 128.8, 128.8, 128.8, 127.7, 122.5, 122.1, 121.6, 89.5, 88.9, 47.5. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 309.1386, found 309.1380.

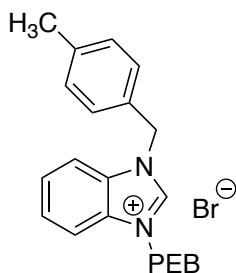
General procedure for 1st and 2nd generation benzimidazolium salt formation (4.6-4.21). To a solution of **(4-phenylethynyl)benzyl benzimidazole (4.5)** (135 mg, 0.438 mmol) in MeCN (2 mL) was added the corresponding alkyl or benzyl bromide (1.31 mmol, 3 eq.). The reaction is stirred until LCMS analysis show completion of the reaction (24-48 h). MeCN was evaporated and the resulting solid is triturated with EtOAc to remove the excess alkyl or benzyl bromide. The resulting white solid was filtered, washed with hexane, and dried to afford the corresponding benzimidazolium salt **(4.6-4.21)** as a white powder.



1,3-bis(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.6). Yield 95%. Purity 98.99%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ ppm = 9.97 (s, 1H), 7.90 -7.96 (m, 1H), 7.52 (m, 14H), 7.38 - 7.45 (m, 7H), 5.81 (s, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 143.5, 137.3, 131.7, 131.5, 131.4, 131.3, 128.8, 127.6, 122.5, 122.1, 121.1, 89.5, 88.9, 47.5. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{27}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 499.2169, found 499.2175.

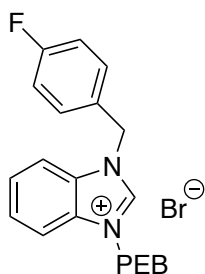


3-benzyl-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.7). Yield 65%. Purity 100%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.11 (s, 1H), 7.98 (m, 2H), 7.75 - 7.51 (m, 10H), 7.50-7.34 (m, 6H), 5.84 (d, $J = 15.6$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 143.3, 134.9, 134.4, 132.4, 131.9, 131.6, 129.5, 129.3, 129.2, 129.2, 128.8, 127.3, 123.1, 122.4, 114.5, 114.5, 90.6, 89.2, 50.5, 50.2. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 399.1856, found 399.1856.



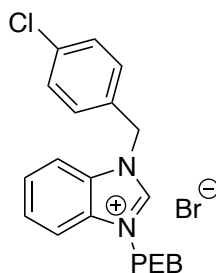
3-(4-methylbenzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.8).

Yield 65%. Purity 99.48%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.03 (s, 1H), 7.96 (m, 2H), 7.69–7.60 (m, 4H), 7.60–7.52 (m, 4H), 7.48–7.40 (m, 5H), 7.24 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.83 (s, 2H), 5.74 (s, 2H), 2.30 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.7, 138.3, 134.5, 131.9, 131.4, 131.1, 130.8, 129.6, 129.2, 129.0, 128.8, 128.7, 128.4, 126.9, 122.7, 122.0, 114.1, 114.0, 90.1, 88.7, 49.9, 49.7, 20.7. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 413.2001, found 413.2012.



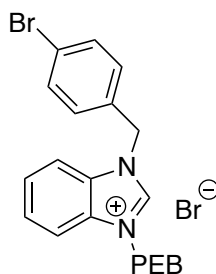
3-(4-fluorobenzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.9).

Yield 79%. Purity 98.65%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.07 (s, 1H), 8.08–7.90 (m, 2H), 7.68–7.49 (m, 10H), 7.46 – 7.39 (m, 3H), 7.29 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 5.82 (d, J = 17.6 Hz, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.7, 161.7, 143.3, 134.9, 132.4, 131.9, 131.6, 131.5, 131.4, 131.3, 130.6, 129.5, 129.3, 129.2, 127.3, 123.1, 122.4, 116.5, 116.3, 114.5, 114.5, 90.6, 89.2, 65.4, 62.5, 50.2, 49.8. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO- d_6) δ -114.73. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{FN}_2[\text{M}]^+$: 417.1762, found 417.1760.



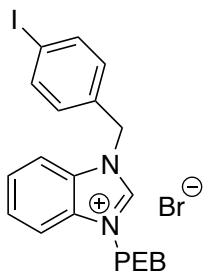
3-(4-chlorobenzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.10).

Yield 75%. Purity 96.89%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.07 (s, 1H), 8.04–7.90 (m, 2H), 7.76–7.49 (m, 12H), 7.47–7.35 (m, 3H), 5.83 (d, J = 12.9 Hz, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 143.0, 134.4, 133.5, 132.8, 131.9, 131.4, 131.1, 131.0, 130.4, 129.0, 128.8, 128.7, 126.9, 122.6, 122.0, 114.0, 90.1, 88.7, 49.7, 49.3. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{ClN}_2[\text{M}]^+$: 433.1466, found 433.1456.

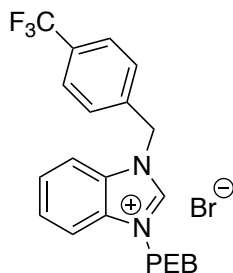


3-(4-bromobenzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.11).

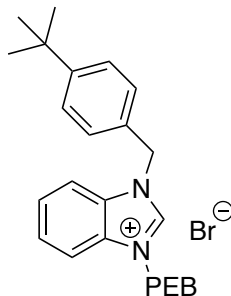
Yield 80%. Purity 99.53 %. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.09 (s, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.72–7.48 (m, 12H), 7.43 (s, 3H), 5.83 (d, J = 19.5 Hz, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-6) δ 143.0, 134.4, 133.2, 131.9, 131.4, 131.1, 131.0, 130.7, 129.0, 128.8, 128.7, 126.9, 122.6, 122.1, 122.0, 114.0, 90.1, 88.7, 49.7, 49.4. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{CBrN}_2[\text{M}]^+$: 477.0961, found 477.0959.



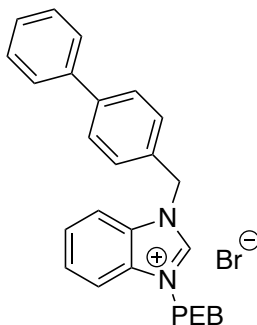
3-(4-iodobenzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.12). Yield 99%. Purity 100%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.04 (s, 1H), 7.95 (s, 2H), 7.81 (m, J = 6.9 Hz, 2H), 7.70–7.51 (m, 8H), 7.49–7.24 (m, 5H), 5.80 (d, J = 28.5 Hz, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.9, 137.8, 134.4, 133.5, 131.9, 131.4, 131.1, 131.1, 130.7, 129.0, 128.8, 128.7, 126.9, 122.6, 122.0, 114.0, 95.5, 90.1, 88.7, 49.7, 49.5. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{I}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 525.0822, found 525.0804.



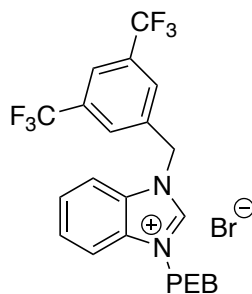
1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-3-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.13). Yield 65%. Purity 99.57%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.11 (s, 1H), 8.09–7.90 (m, 2H), 7.83 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.71–7.55 (m, 6H), 7.55 (m, 2H), 7.48–7.37 (m, 3H), 5.91 (d, J = 39.2 Hz, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 143.4, 138.7, 134.5, 132.1, 131.6, 131.3, 129.3, 129.2, 129.0, 128.9, 127.1, 127.1, 126.1, 126.0, 122.8, 122.1, 114.2, 114.1, 90.2, 88.8, 49.9, 49.6. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO) δ -63.71. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2[\text{M}]^+$: 467.1729, found 467.1727.



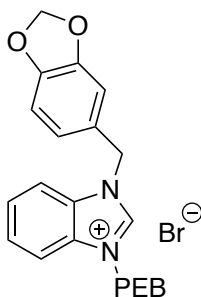
3-(4-(*tert*-butyl)benzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ium bromide (4.14). Yield 62%. Purity 99.52%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.09 (s, 1H), 8.06–8.02 (m, 1H), 7.98–7.93 (m, 1H), 7.68–7.52 (m, 8H), 7.50–7.41 (m, 7H), 5.80 (d, *J* = 40.9 Hz, 4H), 2.08 (s, 1H), 1.26 (s, 9H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.3, 142.7, 134.5, 131.9, 131.4, 131.1, 131.1, 131.0, 129.0, 128.8, 128.2, 126.8, 125.8, 122.6, 122.0, 114.1, 114.0, 90.1, 88.7, 49.7, 34.4, 31.0. HRMS (ESI): *m/z* Calcd for C₃₃H₃₁N₂[M]⁺: 455.2482, found 455.2483.



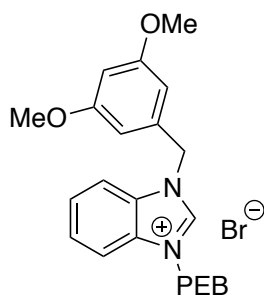
3-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-3-ium bromide (4.15). Yield 69%. Purity 100%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.09 (s, 1H), 8.09–8.03 (m, 1H), 8.00–7.95 (m, 1H), 7.79–7.71 (m, 2H), 7.71–7.52 (m, 12H), 7.51–7.32 (m, 6H), 5.85 (s, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 142.9, 140.6, 139.3, 134.4, 133.0, 131.9, 131.4, 131.1, 129.0, 129.0, 128.8, 128.7, 127.8, 127.2, 126.9, 126.7, 122.7, 122.0, 114.1, 114.0, 90.1, 88.7, 49.7. HRMS (ESI): *m/z* Calcd for C₃₅H₂₇N₂[M]⁺: 475.2169, found 475.2159.



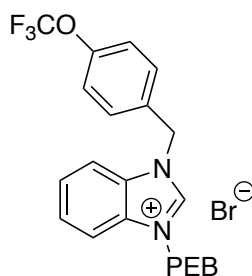
3-(3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.16). Yield 68%. Purity 97.62%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.03 (s, 1H), 8.35 (s, 2H), 8.19 (s, 1H), 8.07–8.01 (m, 1H), 7.99–7.91 (m, 1H), 7.74–7.51 (m, 8H), 7.48–7.39 (m, 3H), 5.97 (s, 2H), 5.84 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 143.5, 137.0, 134.4, 131.8, 131.4, 131.1, 131.1, 130.8, 130.6, 129.8, 129.0, 128.8, 128.7, 127.0, 126.9, 122.6, 122.0, 114.1, 113.8, 90.1, 88.7, 49.8, 48.9. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO) δ -62.79. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_2[\text{M}]^+$: 535.1603, found 535.1609.



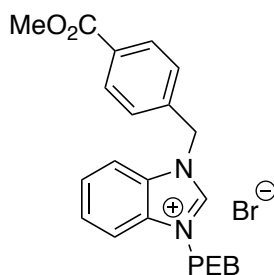
3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.17). Yield 87%. Purity 98.85%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.07 (s, 1H), 8.05–7.99 (m, 1H), 7.99–7.88 (m, 1H), 7.70–7.49 (m, 8H), 7.47–7.36 (m, 3H), 7.20 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 5.84 (s, 2H), 5.69 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 147.7, 147.7, 142.7, 134.5, 131.9, 131.4, 131.1, 131.0, 129.0, 128.8, 128.7, 127.2, 126.8, 126.8, 122.7, 122.6, 122.0, 114.1, 113.9, 109.0, 108.6, 101.4, 90.1, 88.7, 50.0, 49.7. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2[\text{M}]^+$: 443.1754, found 443.1756.



3-(3,5-dimethoxybenzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.18). Yield 87%. Purity 99.09%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.15 (s, 1H), 8.15–7.86 (m, 2H), 7.76–7.51 (m, 8H), 7.49–7.41 (m, 3H), 6.75 (s, 2H), 6.51 (s, 1H), 5.87 (s, 2H), 5.72 (s, 2H), 3.74 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160.9, 142.9, 135.9, 134.5, 131.9, 131.4, 131.1, 131.0, 129.0, 128.8, 128.7, 126.8, 122.6, 122.0, 114.1, 114.0, 106.7, 100.0, 90.1, 88.7, 55.4, 50.1, 49.7. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2[\text{M}]^+$: 459.2067, found 459.2078.

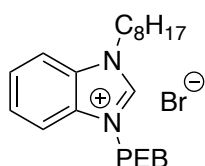


1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-3-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.19). Yield 75%. Purity 99.63%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.09 (s, 1H), 8.06–7.89 (m, 2H), 7.72–7.51 (m, 10H), 7.48–7.38 (m, 5H), 5.85 (d, $J = 2.7$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 148.3, 142.9, 134.2, 133.2, 131.7, 131.2, 130.9, 130.9, 130.4, 128.8, 128.6, 128.6, 126.7, 122.5, 121.8, 121.4, 113.9, 113.8, 89.9, 88.5, 49.6, 49.0. ^{19}F NMR (471 MHz, CDCl_3) δ -52.03. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}[\text{M}]^+$: 483.1679, found 483.1688.



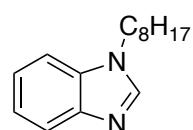
3-(4-(methoxycarbonyl)benzyl)-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium

bromide (4.20). Yield 84%. Purity 100%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.19 (s, 1H), 8.14–7.85 (m, 4H), 7.78–7.49 (m, 10H), 7.49–7.25 (m, 3H), 5.92 (d, J = 23.2 Hz, 4H), 3.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 165.6, 143.0, 139.0, 134.2, 131.7, 131.2, 130.9, 129.6, 129.5, 128.8, 128.6, 128.4, 126.7, 122.5, 121.8, 113.9, 113.8, 89.9, 88.5, 52.1, 49.6, 49.5. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2[\text{M}]^+$: 457.1911, found 457.1912.

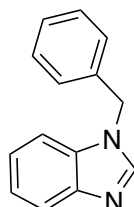


3-octyl-1-(4-(phenylethynyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.21). Yield 66%. Purity 99.06%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.97 (s, 1H), 8.27–8.07 (m, 1H), 7.94 (dd, J = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.76–7.50 (m, 8H), 7.43 (d, J = 2.2 Hz, 3H), 5.82 (s, 2H), 4.51 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.10–1.73 (m, 2H), 1.41–1.09 (m, 10H), 0.84 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.4, 134.5, 131.8, 131.3, 131.2, 130.7, 128.9, 128.7, 128.5, 126.7, 126.6, 122.5, 121.8, 113.8, 113.7, 90.0, 88.5, 49.5, 46.8, 31.0, 28.4, 28.3, 25.7, 22.0, 13.8. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 421.2638, found 421.2645.

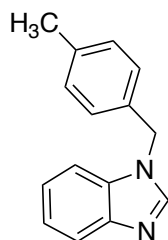
General procedure for benzimidazole alkylation (4.23-4.32). To a solution of benzimidazole (**4.4**) (1.00 g, 8.46 mmol) in THF (25.0 mL) at 0 °C was added sodium hydride (406 mg, 10.2 mmol) portion wise. After stirring for 15 minutes, a solution of the corresponding benzyl or alkyl bromide (8.89 mmol, 1.05 eq.) in THF (5 mL) was slowly added. The reaction is allowed to warm up to R.T. and stirred until no more starting benzimidazole is observed by TLC (100% EtOAc) (2-3 h). The reaction is then quenched with water and the aqueous layer is extracted three times with EtOAc, dried over Na₂SO₄ and purified using silica gel chromatography (100% EtOAc) to afford the corresponding alkylated benzimidazole (**4.23-4.32**).



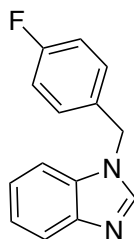
1-octyl-1H-benzo[d]imidazole (4.23). Yield 96%, ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (s, 1H), 7.76-7.71 (m, 1H), 7.35-7.31 (m, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 4.17 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.19-1.13 (m, 10H), 0.80 (t, J = 1.8 Hz, 3H) ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 143.1, 142.6, 133.8, 122.7, 121.2, 120.2, 109.8, 45.3, 31.6, 29.2, 29.3, 26.7, 22.5, 14.0. HRMS (ESI): m/z Calcd for C₁₅H₂₂N₂[M+H]⁺: 231.1863, found 231.1867.



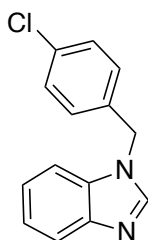
1-benzyl-1H-benzo[d]imidazole (4.24). Yield 91%, ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.41 (s, 1H), 7.68-7.64 (m, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 7.35-7.25 (m, 5H), 7.23-7.16 (m, 2H), 5.50 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 144.25, 143.58, 136.98, 133.67, 128.71, 127.75, 127.40, 122.41, 121.60, 119.51, 110.73, 47.64. HRMS (ESI): m/z Calcd for C₁₄H₁₃N₂[M+H]⁺: 209.1073, found 209.1079.



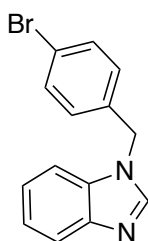
1-(4-methylbenzyl)-1H-benzo[d]imidazole (4.25). Yield 40%, ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.39 (s, 1H), 7.70–7.60 (m, 1H), 7.55–7.40 (m, 1H), 7.27–7.04 (m, 6H), 5.44 (s, 2H), 2.24 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 144.2, 143.6, 137.0, 133.9, 133.6, 129.2, 127.4, 122.3, 121.5, 119.5, 110.7, 47.4, 20.6. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 223.1230, found 223.1232.



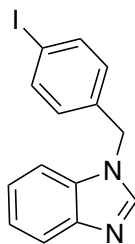
1-(4-fluorobenzyl)-1H-benzo[d]imidazole (4.26). Yield 97%, ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.44 (s, 1H), 7.71–7.66 (m, 1H), 7.57–7.51 (m, 1H), 7.43–7.36 (m, 2H), 7.27–7.13 (m, 4H), 5.50 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162.59, 160.65, 144.15, 143.62, 133.55, 133.20, 133.17, 129.62, 129.56, 122.42, 121.61, 119.53, 115.58, 115.40, 110.66, 46.87. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO- d_6) δ -114.63. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FN}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 227.0979, found 227.0973.



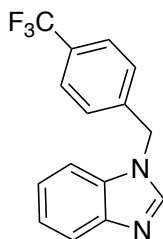
1-(4-chlorobenzyl)-1H-benzo[d]imidazole (4.27). Yield 92%, ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (s, 1H), 7.73–7.62 (m, 1H), 7.55–7.47 (m, 1H), 7.43–7.36 (m, 2H), 7.36–7.26 (m, 2H), 7.25 – 7.15 (m, 2H), 5.50 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 144.23, 143.59, 135.98, 133.55, 132.41, 129.30, 128.70, 122.50, 121.69, 119.56, 110.66, 46.90. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 243.0684, found 243.0680.



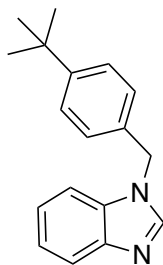
1-(4-bromobenzyl)-1H-benzo[d]imidazole (4.28). Yield 62%, ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (s, 1H), 7.71–7.63 (m, 1H), 7.57–7.46 (m, 3H), 7.29–7.24 (m, 2H), 7.24–7.15 (m, 2H), 5.49 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 144.2, 143.6, 136.4, 133.6, 131.6, 129.6, 122.5, 121.7, 120.9, 119.6, 110.7, 46.9. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 287.0178, found 287.0173.



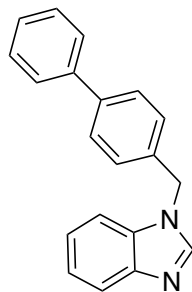
1-(4-iodobenzyl)-1H-benzo[d]imidazole (4.29). Yield 71%, ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.40 (s, 1H), 7.77–7.56 (m, 3H), 7.48 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.29–6.92 (m, 4H), 5.47 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 143.7, 143.1, 135.9, 133.0, 131.1, 129.1, 122.0, 121.2, 120.4, 119.1, 110.2, 46.5. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{IN}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 335.0040, found 335.0041.



1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazole (4.30). Yield 96%, ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.45 (s, 1H), 7.79–7.60 (m, 3H), 7.56–7.43 (m, 3H), 7.28–7.09 (m, 2H), 5.63 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 144.3, 143.6, 141.8, 133.6, 128.0, 125.6, 125.6, 125.6, 122.6, 121.7, 119.6, 110.6, 47.0. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO- d_6) δ -64.06. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 277.0947, found 277.0942.

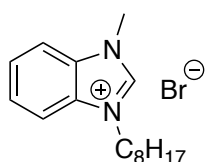


1-(4-(*tert*-butyl)benzyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole (4.31). Yield 84%, ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.41 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.38–7.32 (m, 2H), 7.26–7.16 (m, 4H), 5.45 (s, 2H), 1.22 (s, 9H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 150.1, 134.0, 127.1, 125.4, 122.3, 121.5, 119.5, 110.7, 47.2, 34.2, 31.0. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 265.1699, found 265.1697.

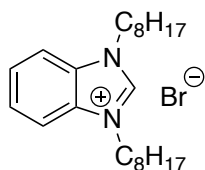


1-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole (4.32). Yield 44%, ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.45 (s, 1H), 7.70–7.54 (m, 6H), 7.4–7.32 (m, 5H), 7.26–7.11 (m, 2H), 5.55 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 144.4, 143.8, 139.8, 136.3, 133.8, 129.1, 128.1, 127.7, 127.2, 126.8, 122.6, 121.8, 119.7, 110.9, 47.4. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_2[\text{M}+\text{H}]^+$: 285.1386, found 285.1386.

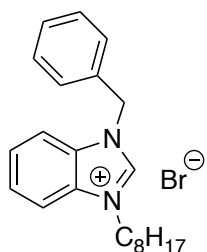
General procedure for 3rd generation benzimidazolium salt formation (4.33-4.43). To a solution of corresponding alkylated benzimidazole (**4.22-4.32**) (0.438 mmol) in MeCN (2 mL) is added octyl bromide (1.31 mmol, 3 eq.). The reaction is stirred until LCMS analysis show completion of the reaction (24-48 h). Another 3 equivalent of octyl bromide is added if the reaction is not completed after 48 h and stirred for an additional 24 h. MeCN is then evaporated and the resulting solid is triturated with EtOAc to remove the excess reagents. The resulting white solid is filtered, washed with hexane, and dried to afford the corresponding benzimidazolium salt (**4.33-4.43**) as a white powder.



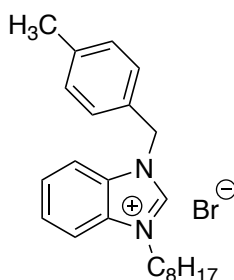
1-methyl-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.33). Yield 94%. Purity 99.36%. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 11.20 (s, 1H), 7.77–7.73 (m, 1H), 7.71–7.66 (m, 1H), 7.64–7.59 (m, 2H), 4.55 – 4.48 (m, 2H), 4.26 (s, 3H), 1.98 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.38–1.31 (m, 2H), 1.31–1.22 (m, 2H), 1.22 – 1.11 (m, 6H), 0.76 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 142.72, 131.97, 131.02, 127.28, 127.25, 113.10, 112.90, 47.68, 33.86, 31.58, 29.46, 28.92, 28.91, 26.49, 22.47, 13.97. HRMS (ESI): m/z Calcd for C₁₆H₂₅N₂[M]⁺: 245.2012, found 245.2012.



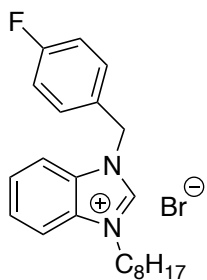
1,3-dioctyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.34). Yield 81%. Purity 95.46%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.88 (s, 1H), 8.11 (dd, J = 6.2, 3.1 Hz, 2H), 7.69 (dd, J = 6.3, 3.1 Hz, 2H), 4.49 (t, J = 7.1 Hz, 4H), 1.98–1.78 (m, 4H), 1.47–1.07 (m, 20H), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 142.07, 131.10, 126.55, 113.74, 46.67, 39.52, 31.14, 28.50, 28.45, 28.39, 25.73, 22.04, 13.93. HRMS (ESI): m/z Calcd for C₂₃H₃₉N₂[M]⁺: 343.3113, found 343.3115.



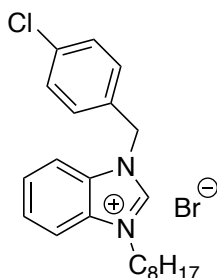
1-benzyl-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.35). Yield 67%. Purity 95.83%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.03 (s, 1H), 8.13 (dd, J = 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.98 (dd, J = 7.1, 1.3 Hz, 1H), 7.77–7.61 (m, 2H), 7.58–7.48 (m, 2H), 7.47–7.34 (m, 3H), 5.80 (s, 2H), 4.53 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.98–1.90 (m, 2H), 1.37–1.17 (m, 10H), 0.91–0.82 (m, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.4, 134.1, 131.3, 130.8, 129.0, 128.7, 128.2, 126.7, 126.6, 113.9, 113.9, 49.8, 46.8, 31.1, 28.5, 28.4, 28.4, 25.8, 22.0, 13.9. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 321.2325, found 321.2326.



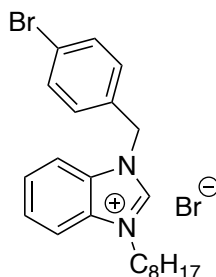
1-(4-methylbenzyl)-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.36). Yield 99%. Purity 99.69%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.13 (s, 1H), 8.12 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.04–7.94 (m, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.44 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 5.76 (s, 2H), 4.53 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.92 (m, 2H), 1.38–1.13 (m, 10H), 0.83 (t, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 142.2, 138.1, 131.3, 131.1, 130.7, 129.4, 128.3, 126.6, 126.6, 113.9, 113.9, 49.6, 46.8, 31.1, 28.5, 28.4, 28.4, 25.7, 22.0, 20.7, 13.9. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 335.2482, found 335.2473.



1-(4-fluorobenzyl)-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.37). Yield 81%. Purity 100%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.00 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 7.0, 1.7 Hz, 1H), 8.06–7.94 (m, 1H), 7.74–7.57 (m, 4H), 7.35–7.22 (m, 2H), 5.77 (s, 2H), 4.51 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.93 (p, J = 7.6 Hz, 2H), 1.43–1.18 (m, 10H), 0.84 (t, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 206.5, 163.1, 161.2, 142.4, 131.3, 130.8, 130.7, 130.3, 130.3, 126.7, 126.7, 115.9, 115.8, 113.9, 113.8, 49.1, 46.8, 31.1, 30.7, 28.5, 28.4, 25.8, 22.0, 13.9. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO) δ -114.68. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{FN}_2[\text{M}]^+$: 339.2231, found 339.2232

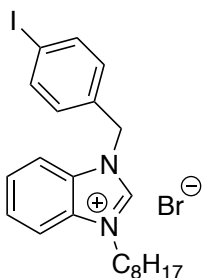


1-(4-chlorobenzyl)-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.38). Yield 88% Purity 100%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.99 (s, 1H), 8.21–8.05 (m, 1H), 8.05–7.93 (m, 1H), 7.75–7.64 (m, 2H), 7.57 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.53–7.39 (m, 2H), 5.79 (s, 2H), 4.51 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.96–1.89 (m, 2H), 1.37–1.20 (m, 10H), 0.84 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.9, 133.9, 133.5, 131.8, 131.3, 130.8, 129.4, 127.2, 127.1, 114.4, 114.3, 49.6, 47.3, 31.6, 29.0, 28.9, 26.2, 22.5, 14.4. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{ClN}_2[\text{M}]^+$: 355.1936, found 355.1941.



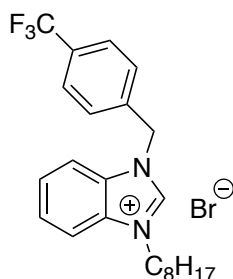
1-(4-bromobenzyl)-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.39). Yield 93%. Purity 100%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.88 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 7.1, 1.3 Hz, 1H), 7.95 (dd, J = 7.0, 1.3 Hz, 1H), 7.75–7.54 (m, 4H), 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.74 (s, 2H), 4.50 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.92 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 1.40–1.15 (m, 10H), 0.85 (t, J = 6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.9, 133.9, 132.3, 131.8, 131.2, 131.1, 127.2, 127.1, 122.5, 114.4, 114.3, 49.6, 47.3, 31.6, 29.0, 28.9, 26.2, 22.5, 14.4. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{BrN}_2[\text{M}]^+$: 399.1430, found 399.1424.

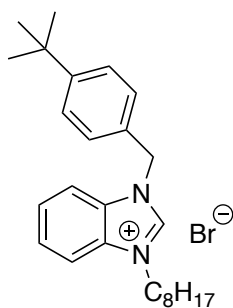


1-(4-iodobenzyl)-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.40). Yield 46%. Purity 97.73%.

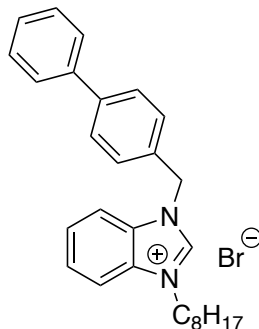
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.89 (s, 1H), 8.11 (dd, J = 7.3, 1.3 Hz, 1H), 7.94 (dd, J = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.86–7.73 (m, 2H), 7.73–7.55 (m, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.72 (s, 2H), 4.50 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.98–1.84 (m, 2H), 1.40–1.14 (m, 10H), 0.84 (d, J = 6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.5, 133.4, 131.8, 131.3, 130.8, 130.6, 126.7, 126.6, 122.0, 113.9, 113.8, 49.1, 46.8, 31.1, 28.5, 28.4, 25.8, 22.0, 13.9. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{IN}_2[\text{M}]^+$: 447.1292, found 447.1281.



3-octyl-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.41). Yield 71%. Purity 100%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.05 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.83–7.58 (m, 6H), 5.92 (s, 2H), 4.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.10–1.81 (m, 2H), 1.27 (d, $J = 35.6$ Hz, 10H), 0.84 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 143.1, 139.2, 131.8, 131.3, 129.5, 127.3, 127.2, 126.3, 126.3, 114.4, 114.2, 49.7, 47.4, 31.6, 29.0, 28.9, 26.2, 22.5, 14.4. ^{19}F NMR (471 MHz, DMSO- d_6) δ -63.87. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_2[\text{M}]^+$: 389.2199, found 389.2206.



1-(4-(*tert*-butyl)benzyl)-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.42). Yield 83%. Purity 98.83%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.00 (s, 1H), 8.18–8.08 (m, 1H), 8.08–7.96 (m, 1H), 7.74–7.62 (m, 2H), 7.54–7.37 (m, 4H), 5.73 (s, 2H), 4.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.96–1.76 (m, 2H), 1.24 (s, 19H), 0.96–0.67 (m, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 151.2, 142.3, 131.3, 131.2, 130.9, 128.0, 126.7, 126.6, 125.7, 113.9, 49.5, 46.8, 34.4, 31.1, 31.0, 28.5, 28.4, 25.8, 22.0, 13.9. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 377.2951, found 377.2954.



1-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethyl)-3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (4.43). Yield 97%. Purity 98.66%. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.02 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 6.5, 2.4 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 6.5, 2.4 Hz, 1H), 7.74–7.60 (m, 8H), 7.46 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.41–7.32 (m, 1H), 5.82 (s, 2H), 4.52 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.02–1.83 (m, 2H), 1.47–1.18 (m, 10H), 0.91–0.66 (m, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 142.9, 141.0, 139.8, 133.7, 131.8, 131.4, 129.5, 129.4, 128.2, 127.7, 127.2, 127.2, 114.4, 50.0, 47.3, 31.6, 29.0, 28.9, 26.3, 22.5, 14.4. HRMS (ESI): m/z Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_2[\text{M}]^+$: 397.2638, found 397.2638.

A3.2 Concepts and methods used.

A3.2.1 Hemolytic assay.

Red blood cells in Alserver's solution were centrifuged 10 min at 300 x g, washed 3 times with PBS buffer and resuspended in PBS at 2% v/v. In a 96-well plate was added 195 μL of red blood cells solution and 5 μL of compound in DMSO, and the plate was incubated with light agitation for 1 h at 37 $^\circ\text{C}$. The plate was then centrifuged for 10 min at 300 x g and 50 μL of the supernatant of each well was transferred to another plate. Absorbance was measured at λ = 405 nm.

A3.2.2 Biofilm inhibition assay.

S. aureus cells were incubated in LB medium at 37 $^\circ\text{C}$ for 5 h and rediluted in LB medium to the desired final concentration ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ = 0.1-0.15). *S. aureus* biofilms were labeled with Live/Dead stain after 12 h incubation with antibiotics in growth medium (LB broth). Negative Control: DMSO (final concentration not exceeding 10 % volume). Positive Control: 70 % ethanol.

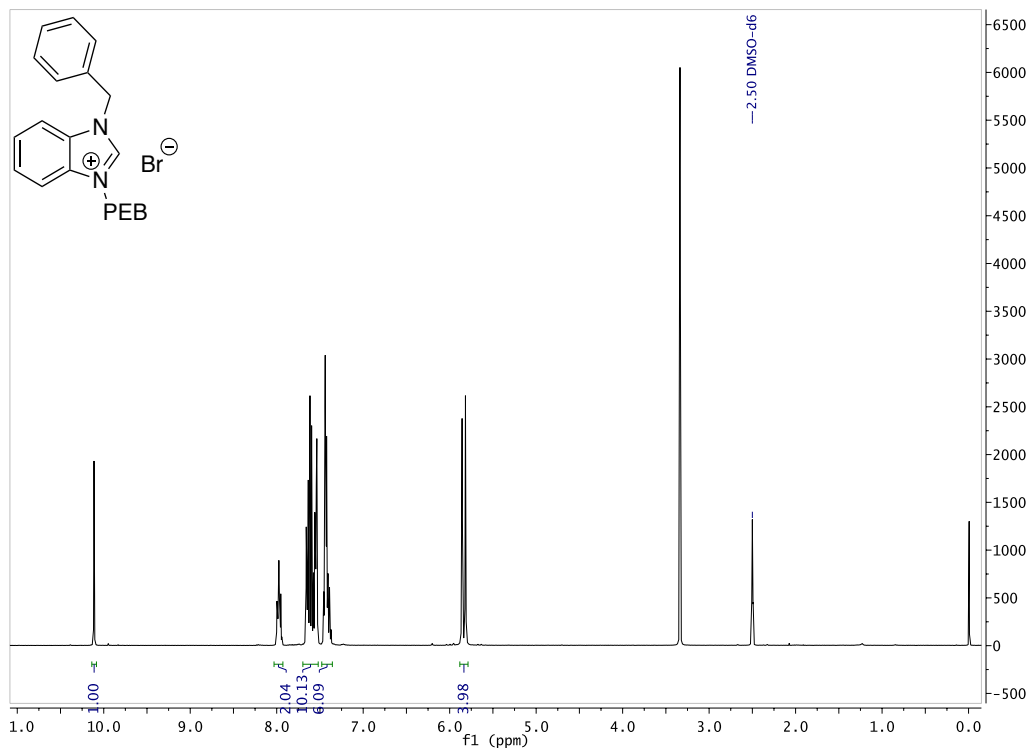
A3.2.3 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis.

Biofilms stained with FilmTracer™ Live/Dead® Biofilm viability kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd.). Briefly, a working solution of fluorescent stains was prepared by adding 1 µL of SYTO® 9 stain and 1 µL of PI stain to 1 mL of filter-sterilized water. Two hundred µL of staining solution were deposited on each well of a chambered coverglass (8-well), after 15 min at room temperature in the dark, samples were washed with sterile saline (0.9% NaCl) from base of the support material. Then, biofilms were examined with a confocal laser microscope (Leica model TCS SP5; Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) using a 20x dry objective (HC PL FLUOTAR 20.0 x 0.50 DRY). A 488 nm laser line was used to excite SYTO® 9, while the fluorescent emission was detected from 500 to 540 nm. PI was sequentially excited with 561 nm laser line and its fluorescent emission was detected from 600 to 695 nm.

A3.2.4. Scanning electron microscopy.

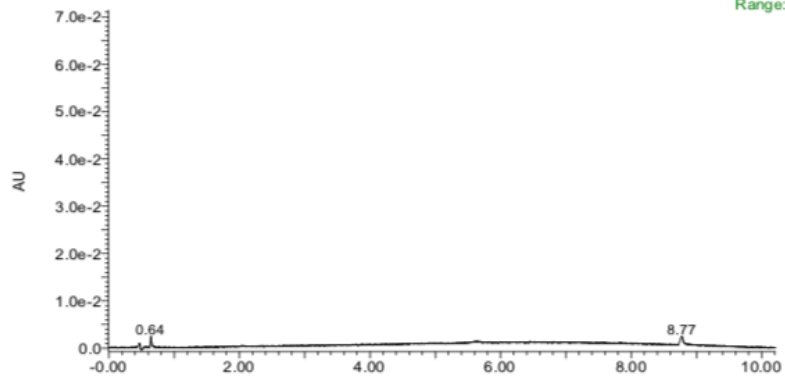
Bacterial samples were applied to titanium surfaces for 12 hours in order to form biofilms, following by a fixation for 1 h at 4 °C in 4% Paraformaldehyde and 0,1% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.3, and subsequently rinsed three times with PB. Following fixation, samples were incubated for 1 hour in 1% osmium tetroxide at room temperature and then dehydrated through an ethanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 95% and two times 100%) followed by drying using a Critical Point Drier CPD300 (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada). A JEOL JSM-7400F (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) operated at 1.5 kV was used to image the samples.

A3.3 NMR spectra and LCMS of newly synthesized compounds



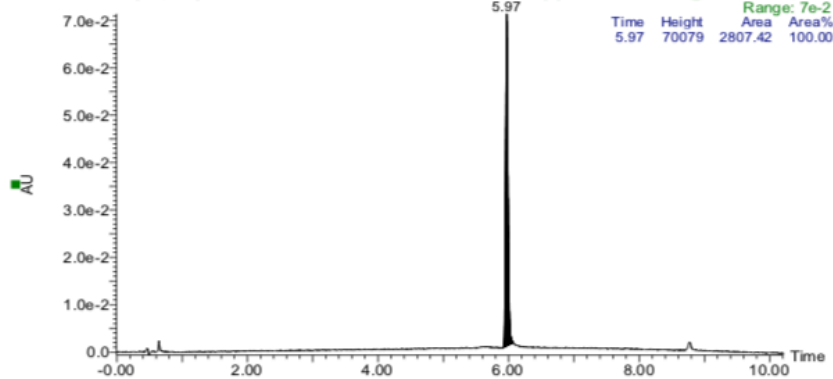
BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 MEOH-LC-05

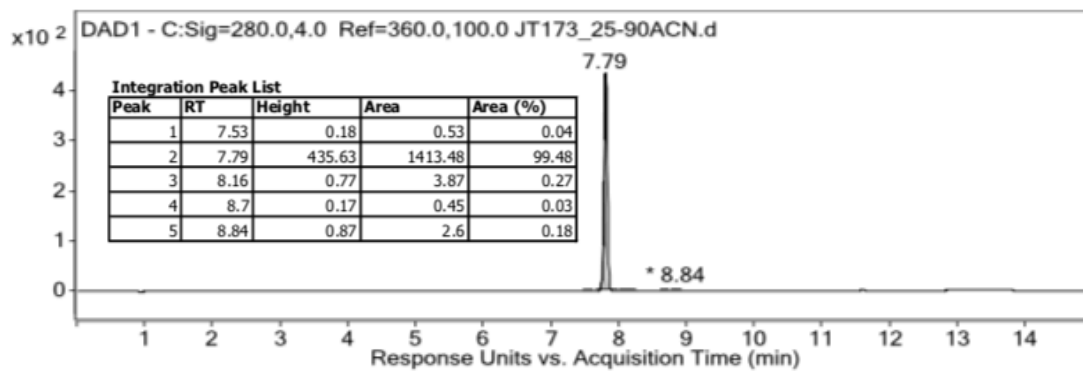
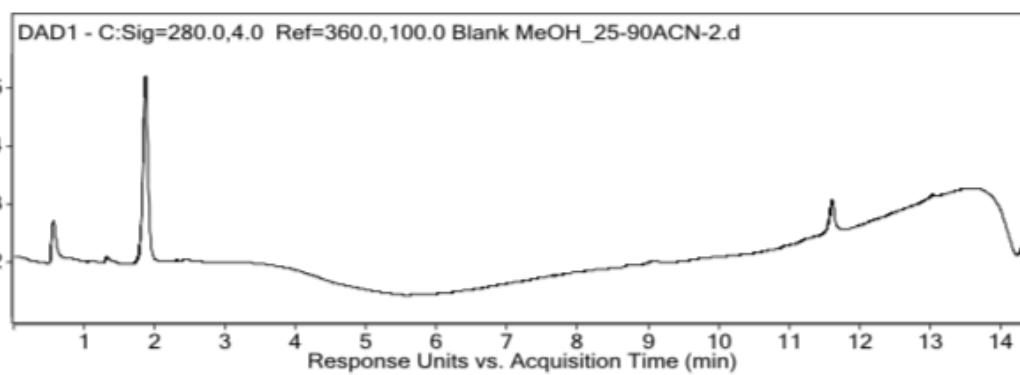
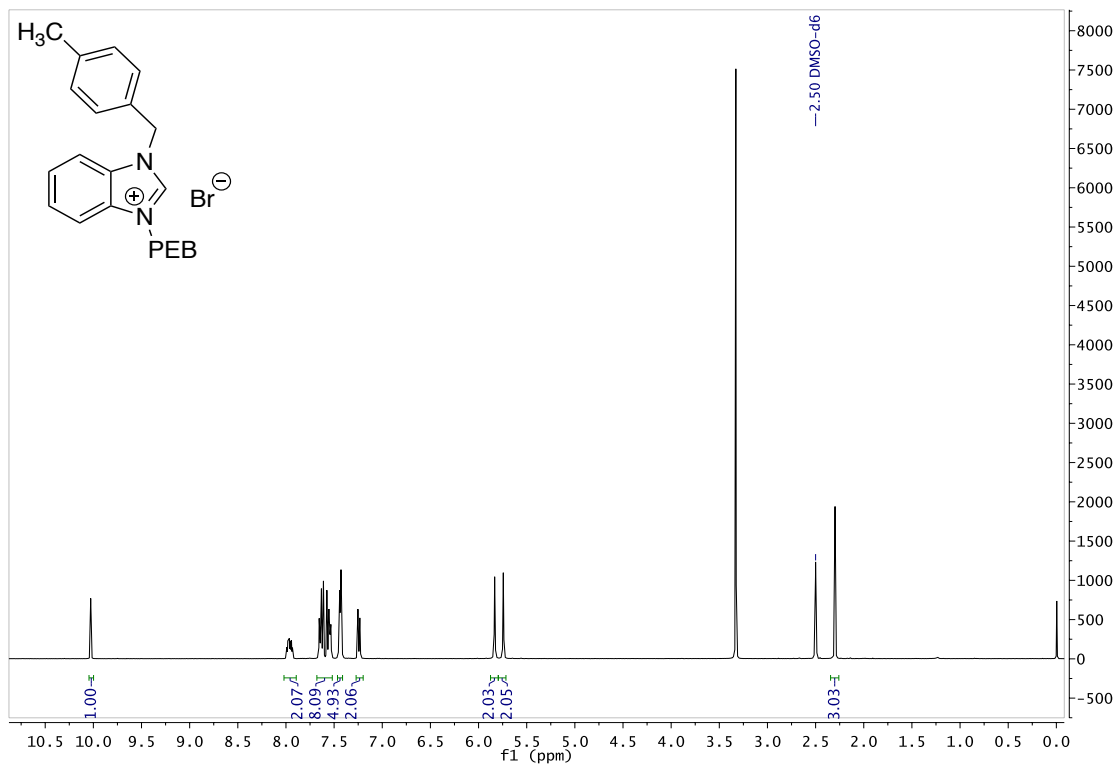
(2) PDA Ch3 280nm@2.4nm -Compens.
 Range: 3e-3

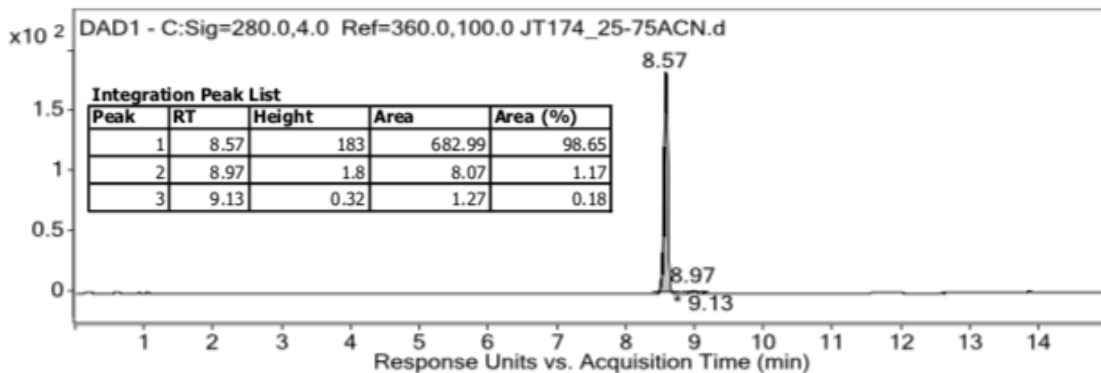
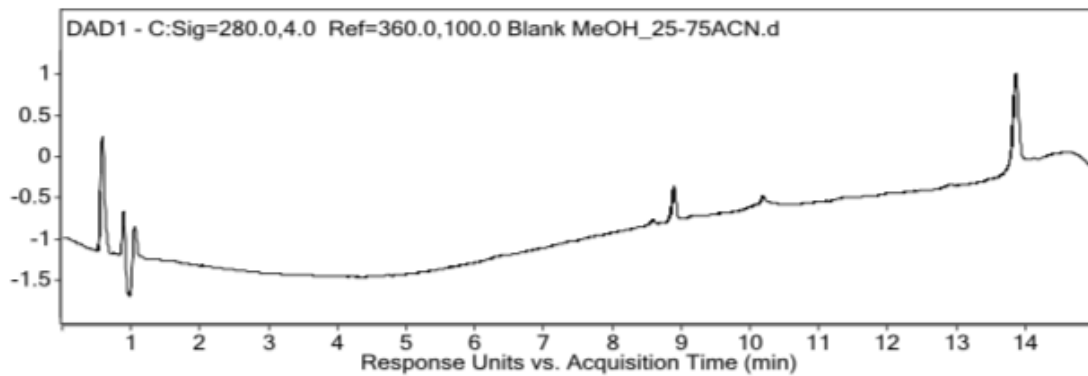
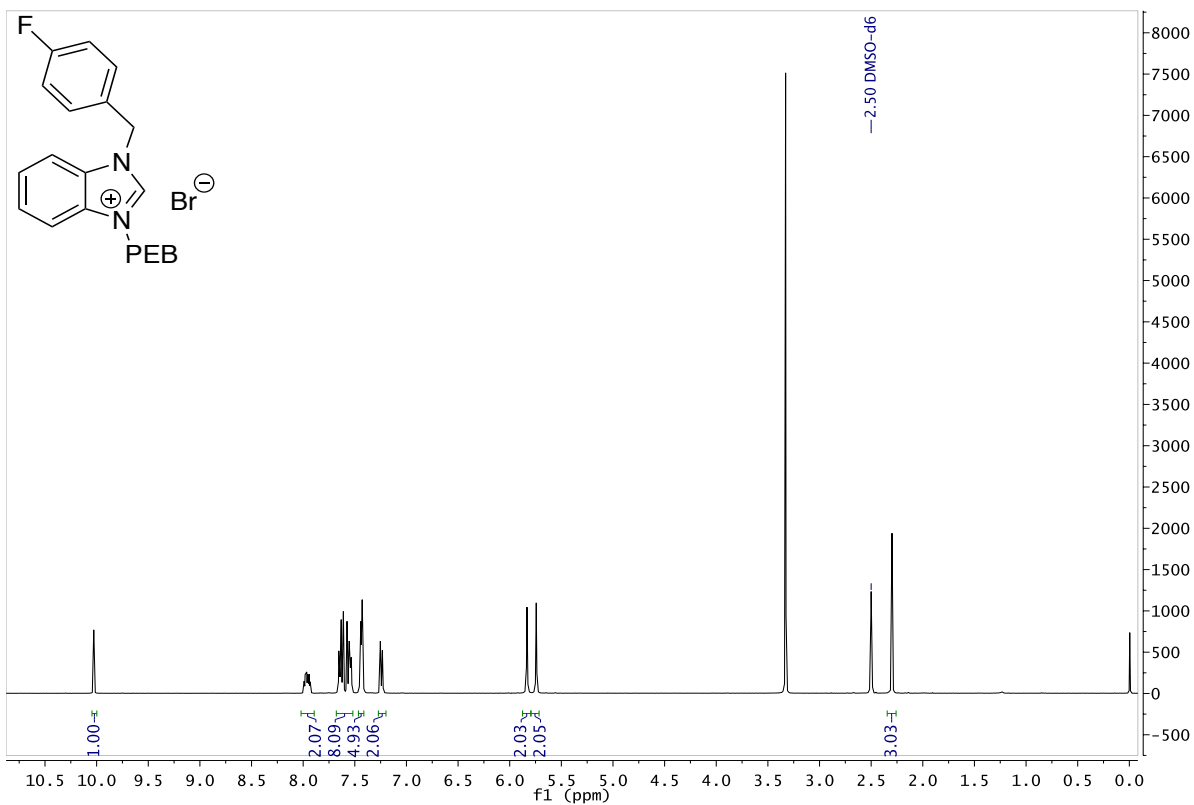


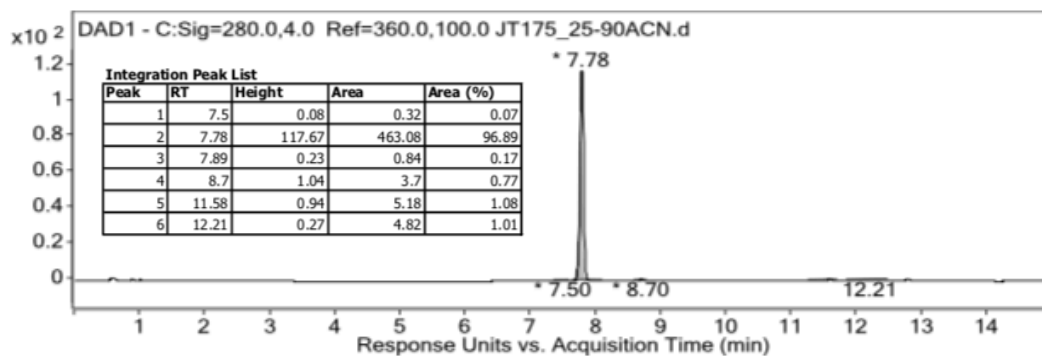
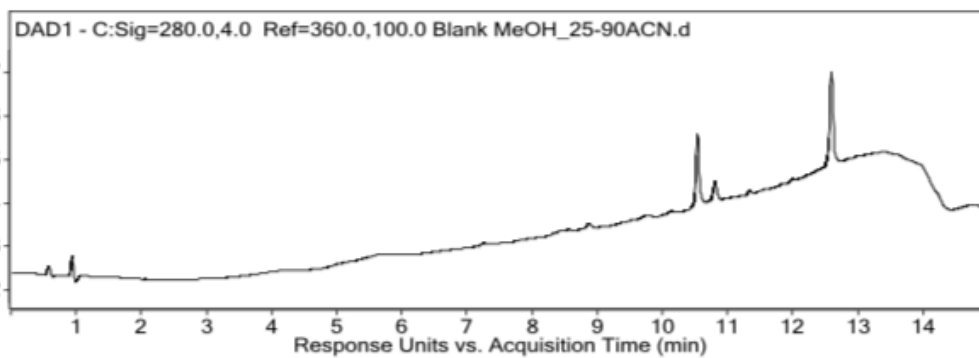
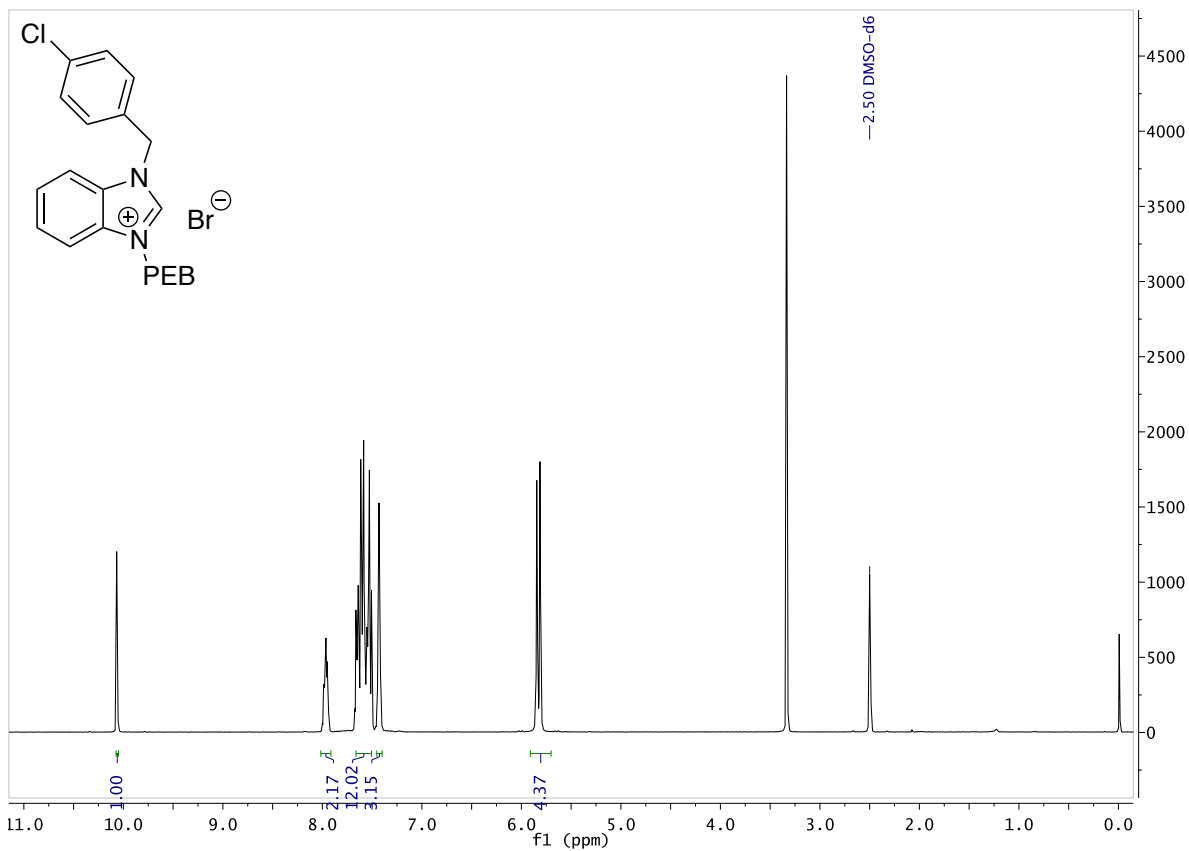
JT-172-LC-4 Sm (Mn, 2x3)

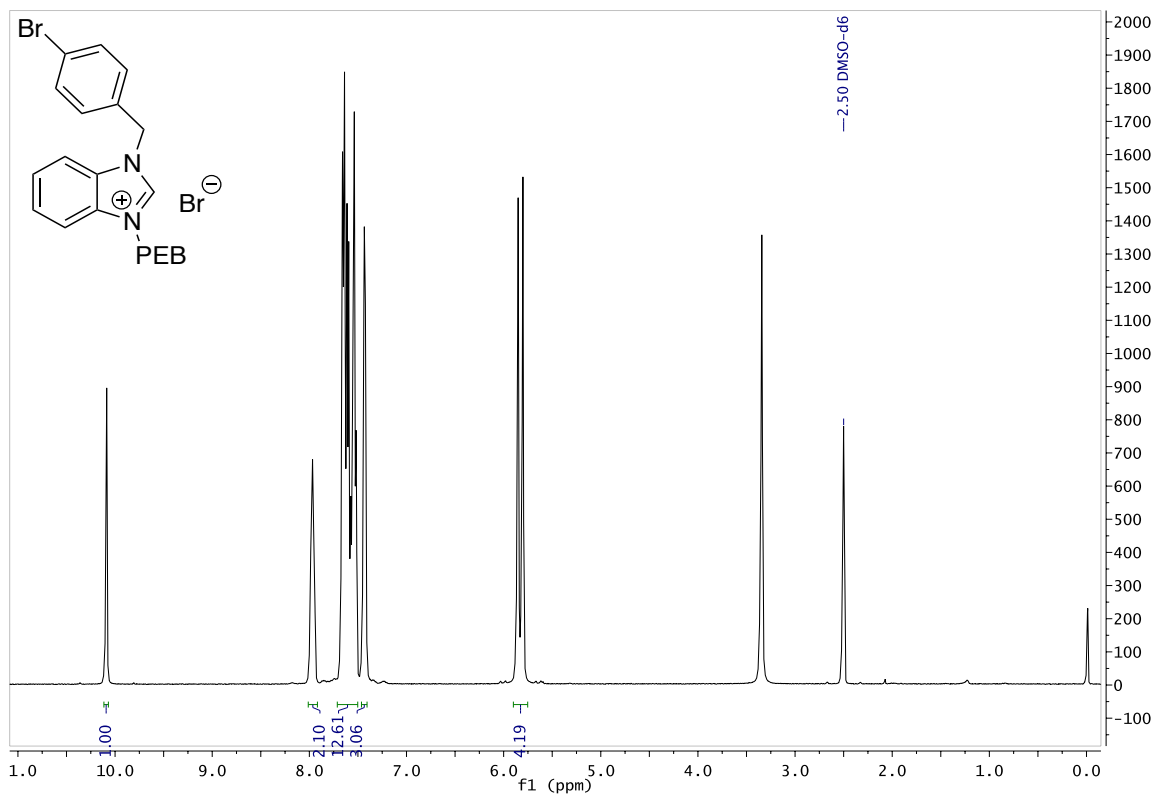
(2) PDA Ch3 280nm@2.4nm -Compens.
 Range: 7e-2







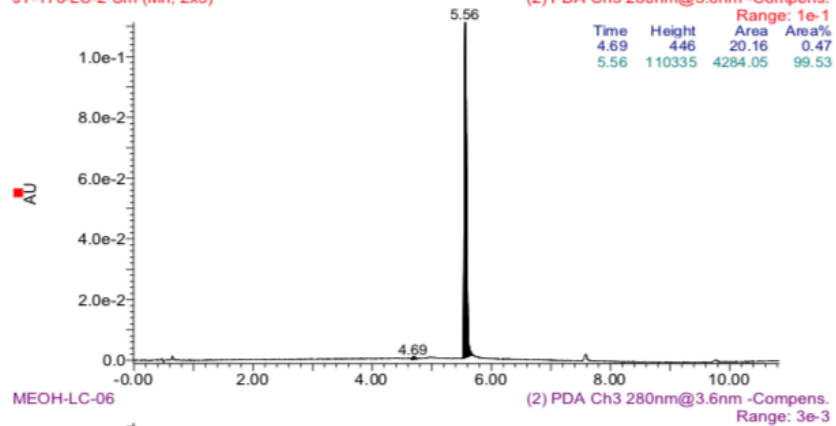




Chromatogram

BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-176-LC-2 Sm (Mn, 2x3)

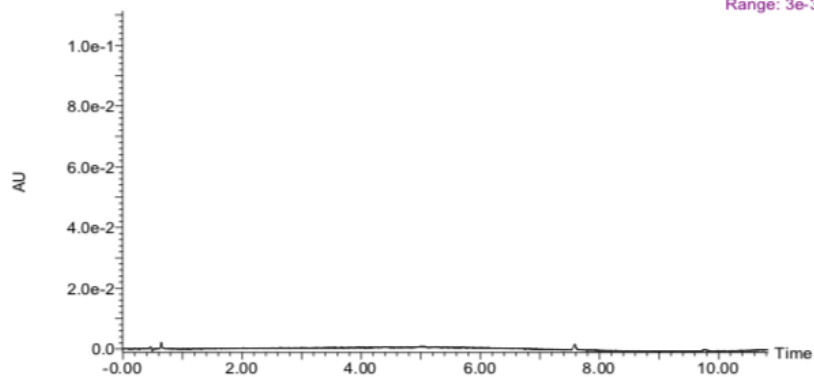
(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens.

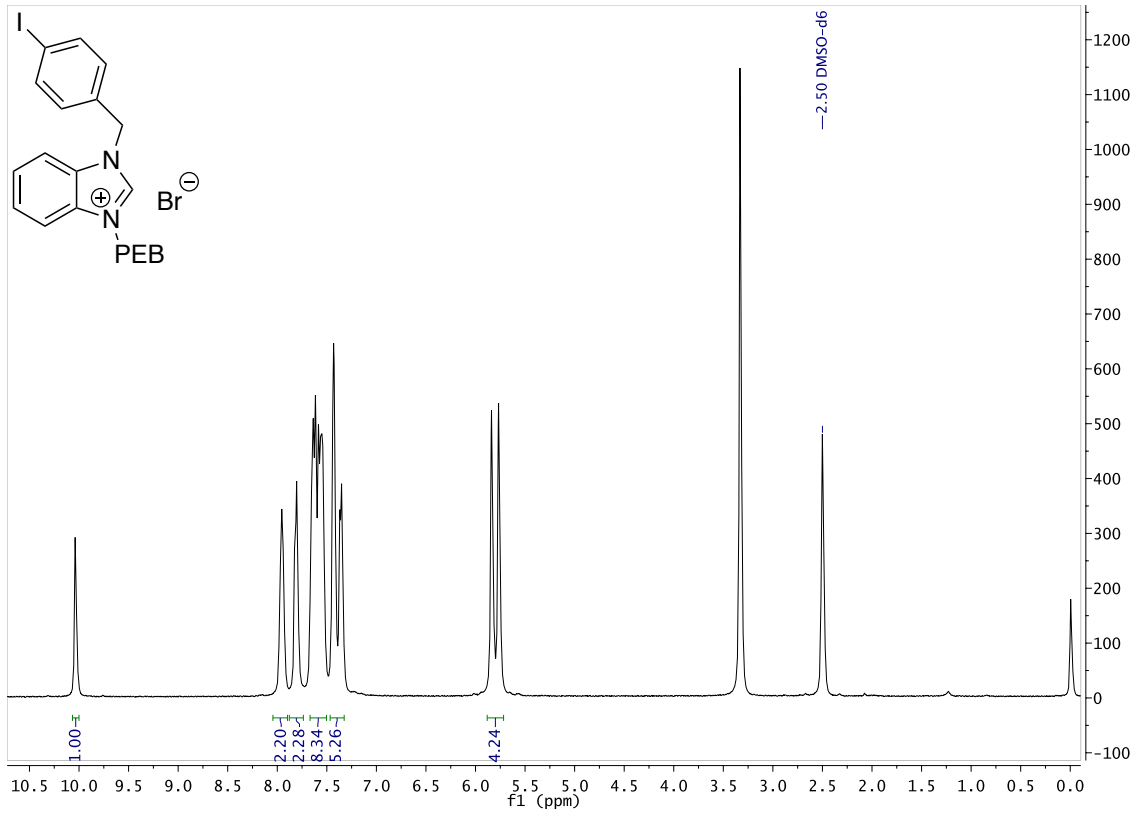


MEOH-LC-06

(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens.

Range: 3e-3



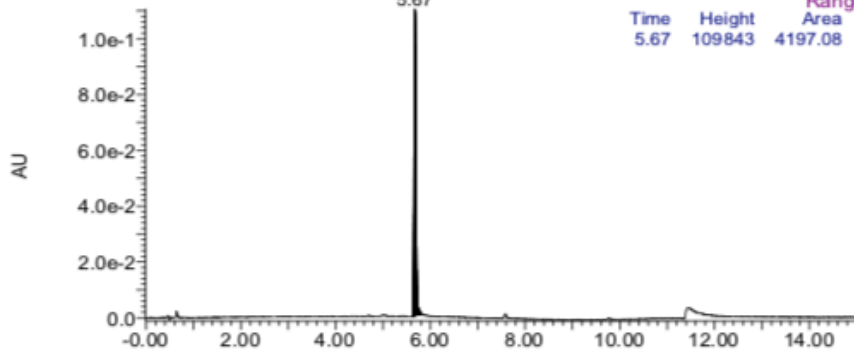


Chromatogram

BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-177-LC-1 Sm (Mn, 2x3)

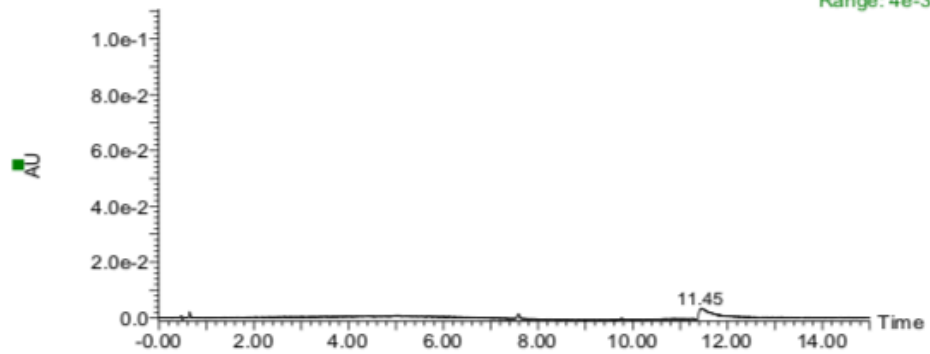
(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens. Range: 1e-1

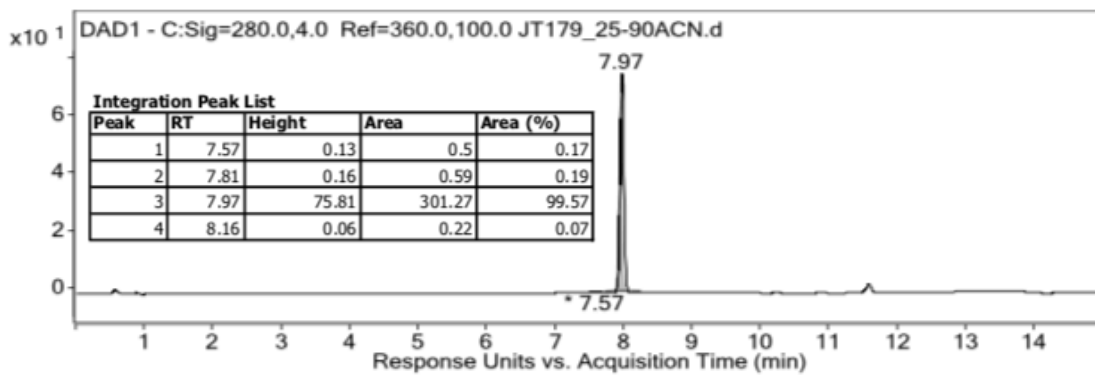
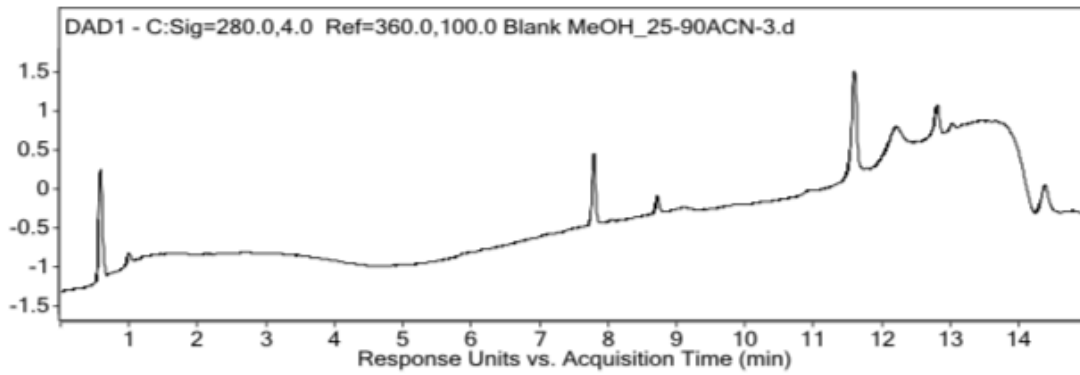
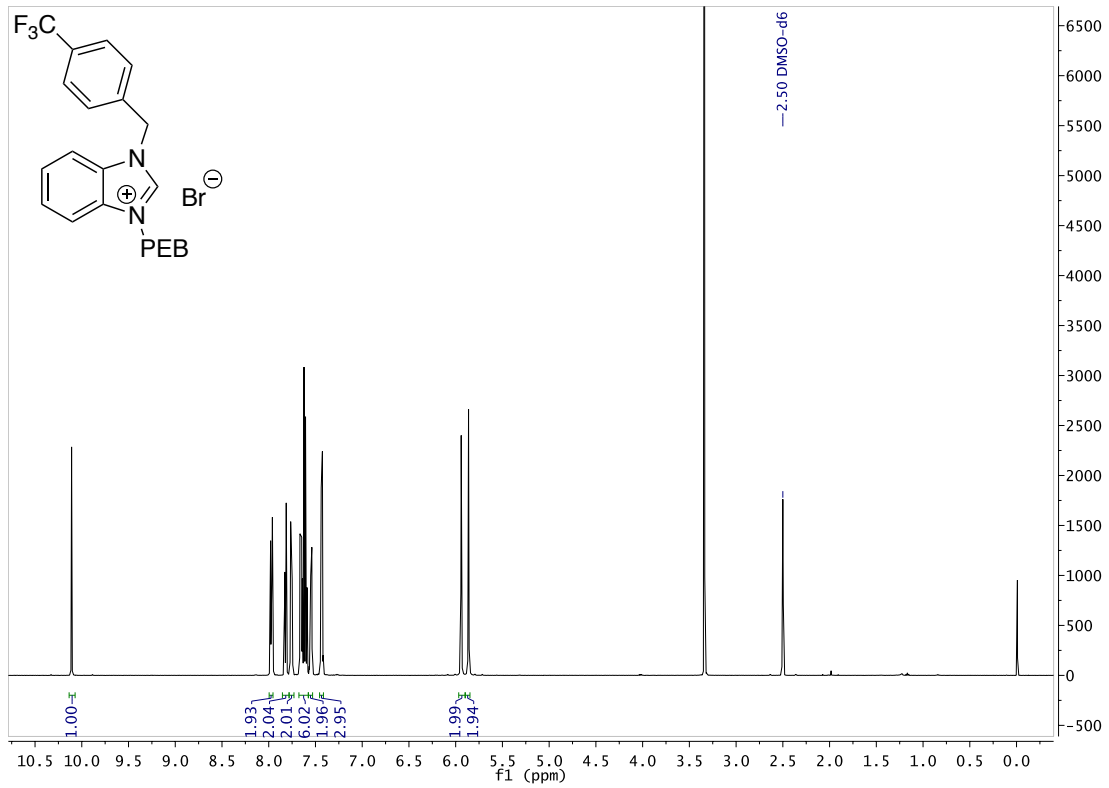
Time	Height	Area	Area%
5.67	109843	4197.08	100.00

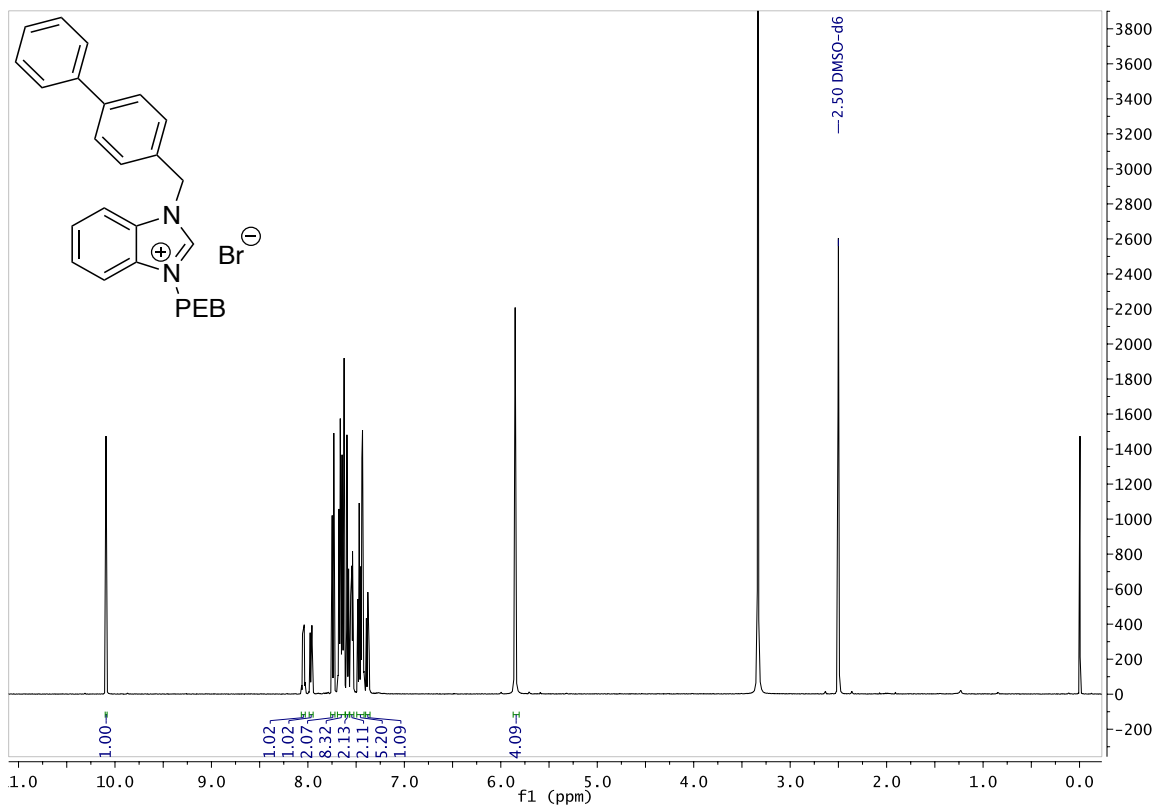


MEOH-LC-06

(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens. Range: 4e-3



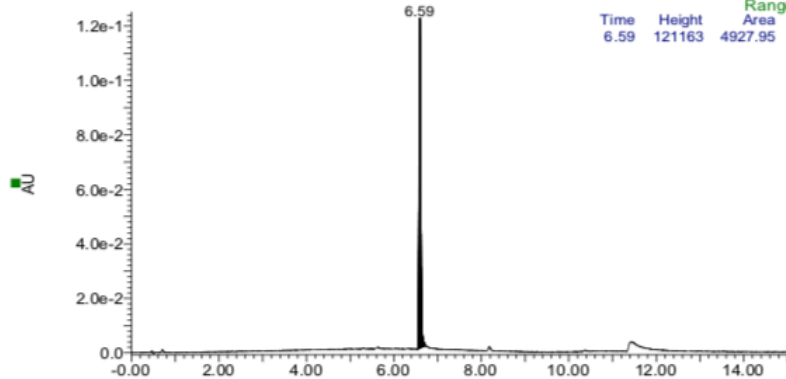




Chromatogram

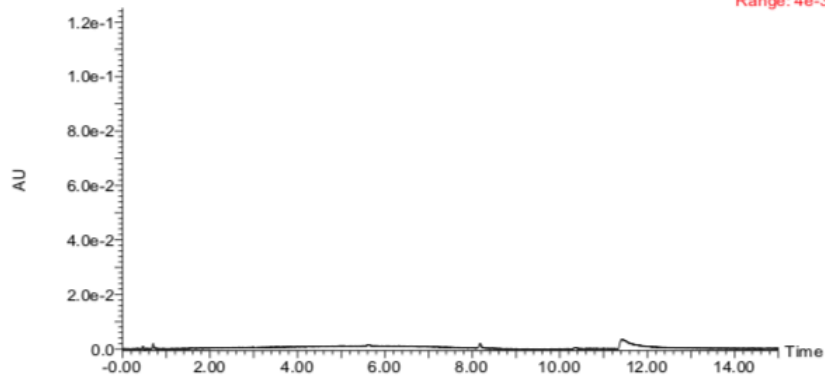
BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-181-LC-1 Sm (Mn, 2x3)

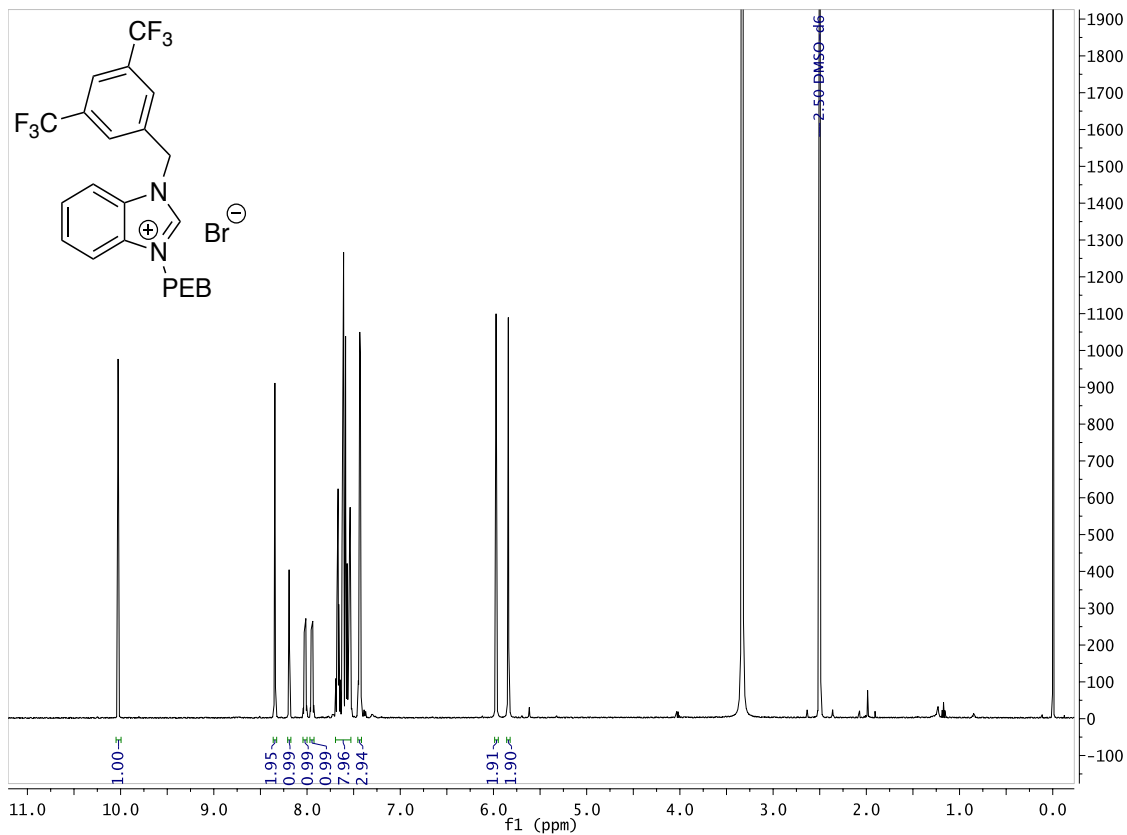
(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens.
 Range: 1e-1
 Time Height Area Area%
 6.59 121163 4927.95 100.00



mEoh-LC-08

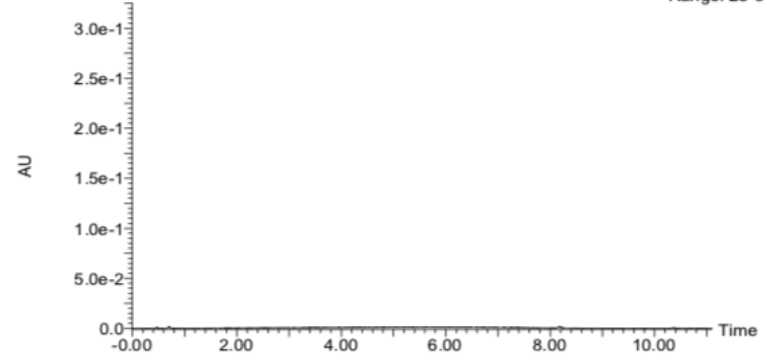
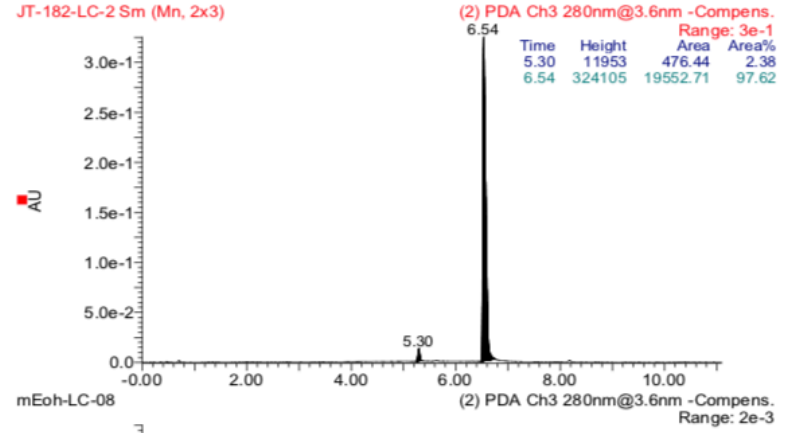
(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens.
 Range: 4e-3

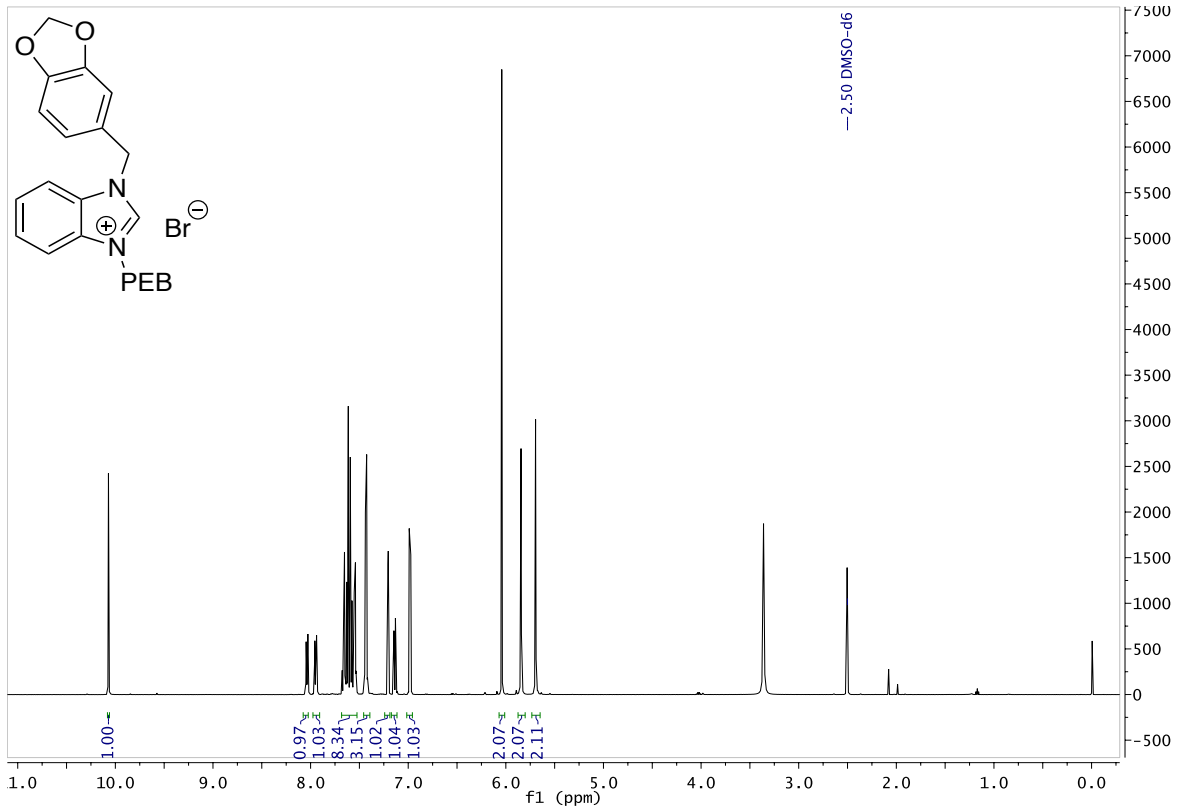




Chromatogram

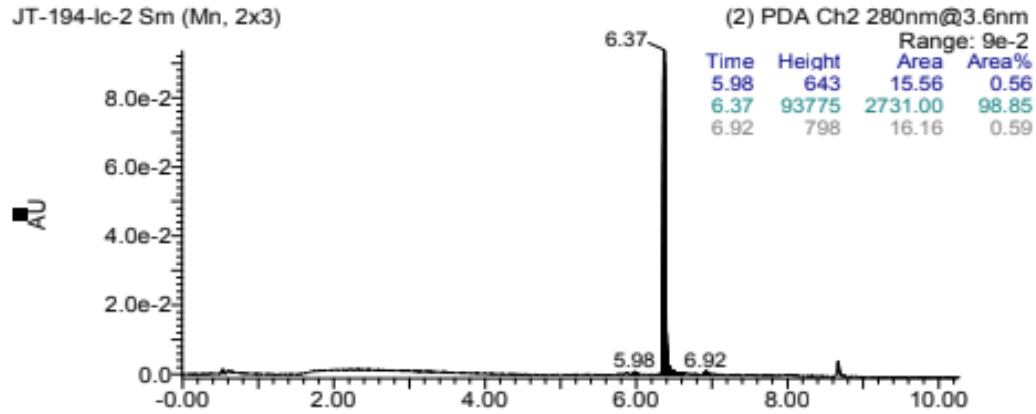
BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-182-LC-2 Sm (Mn, 2x3)



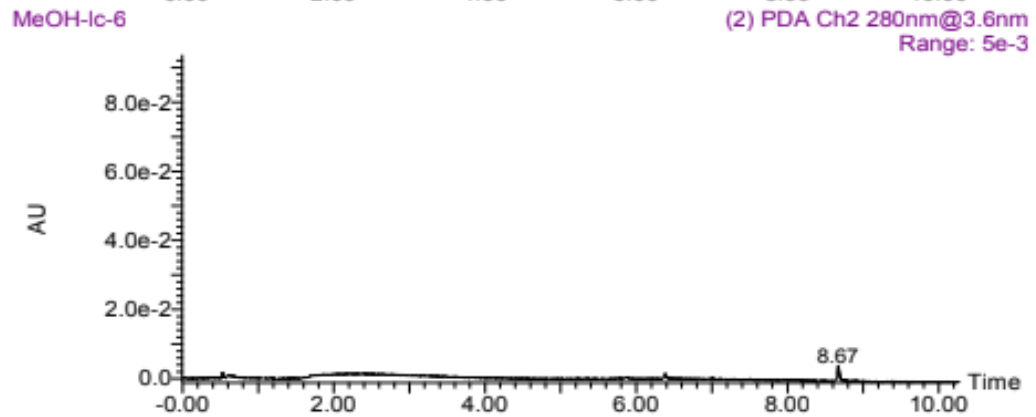


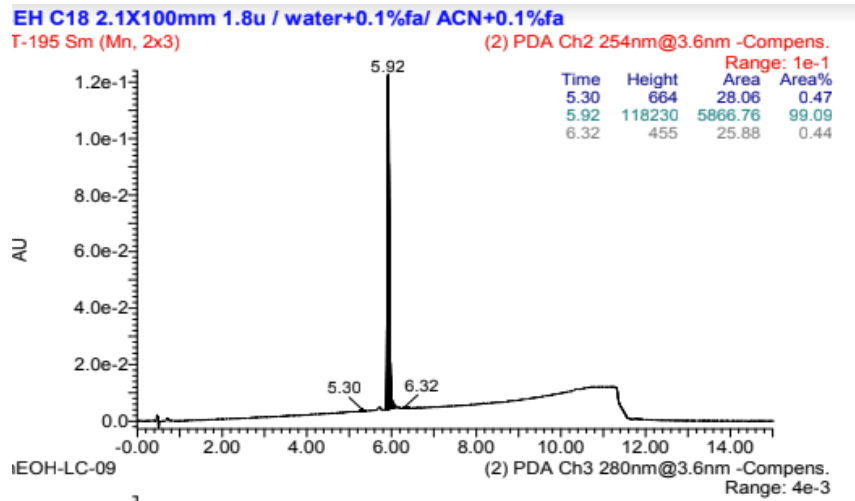
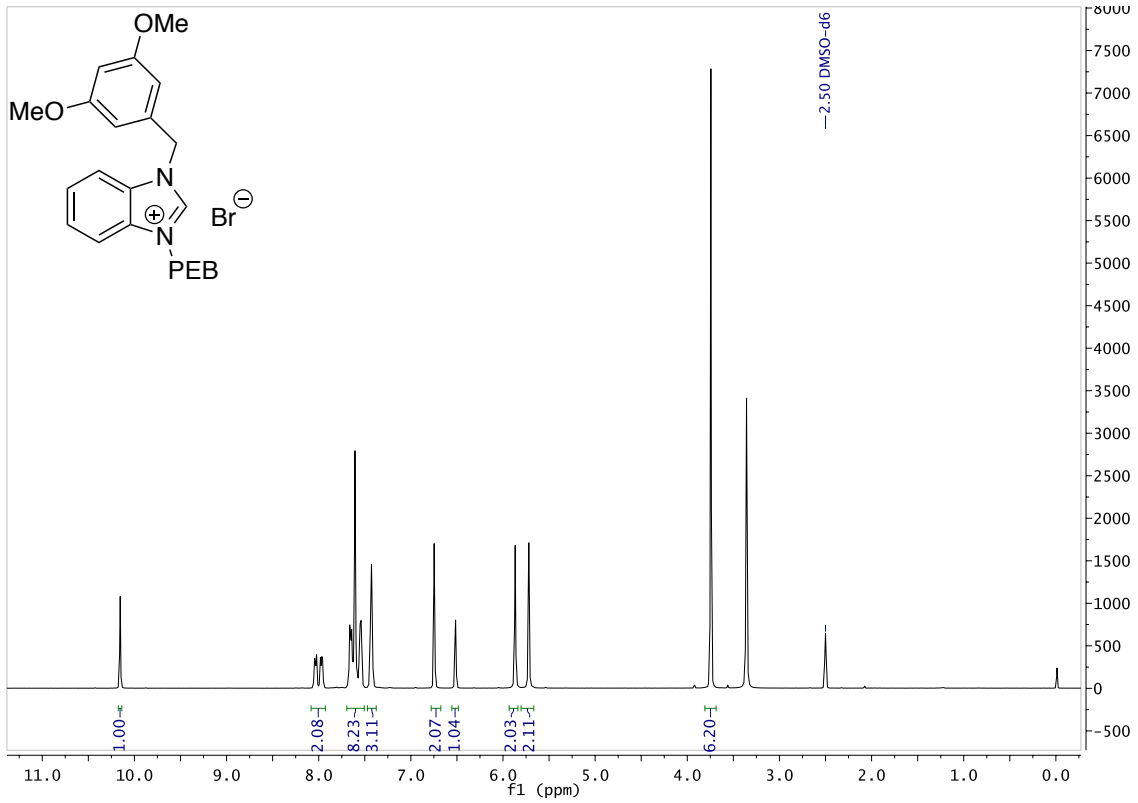
BEH C18 2.1X100mm 1.8U/ H2O+0.1%FA/ ACN+0.1%FA

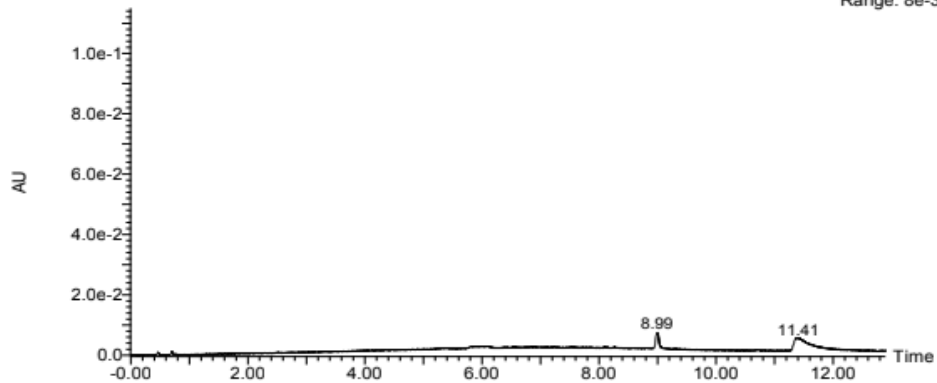
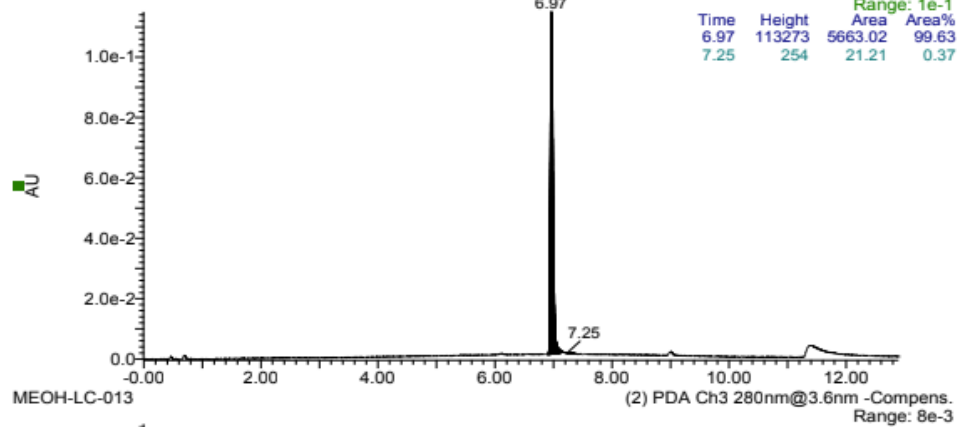
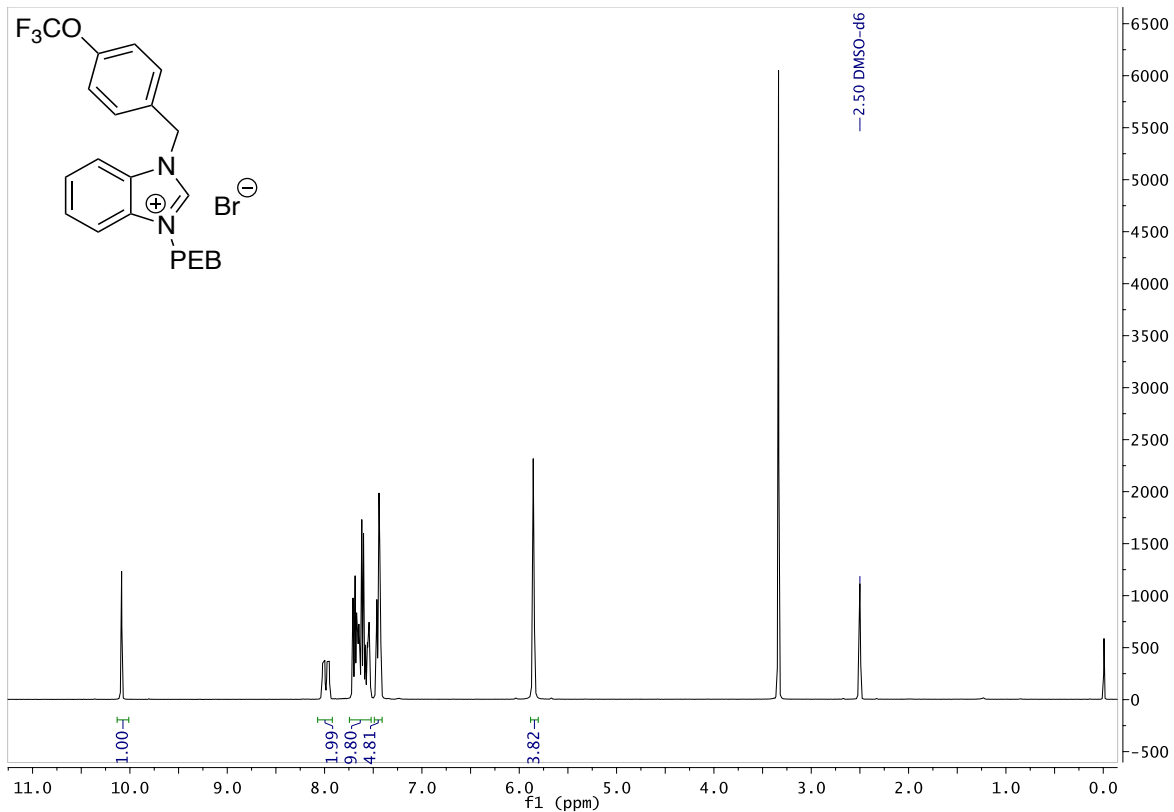
JT-194-Ic-2 Sm (Mn, 2x3)

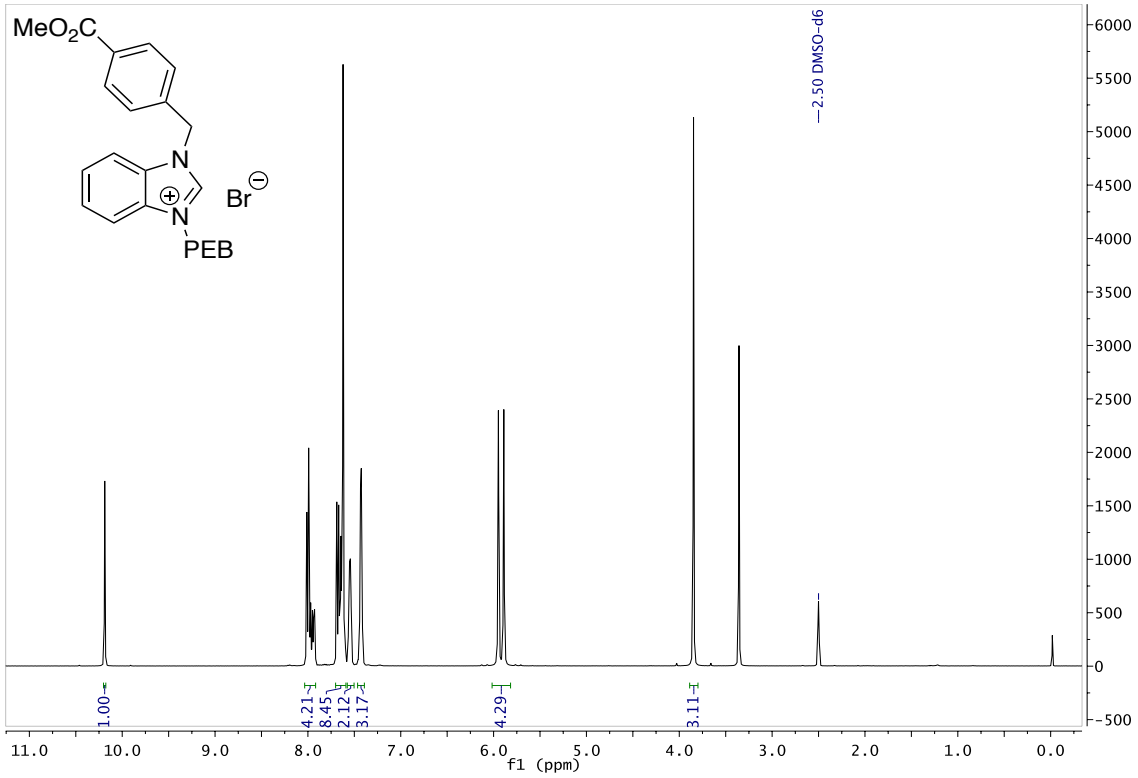


MeOH-Ic-6





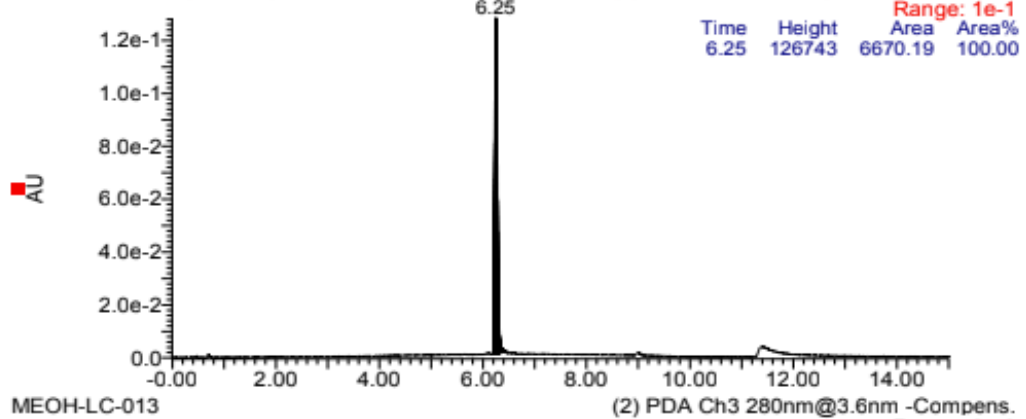




BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa

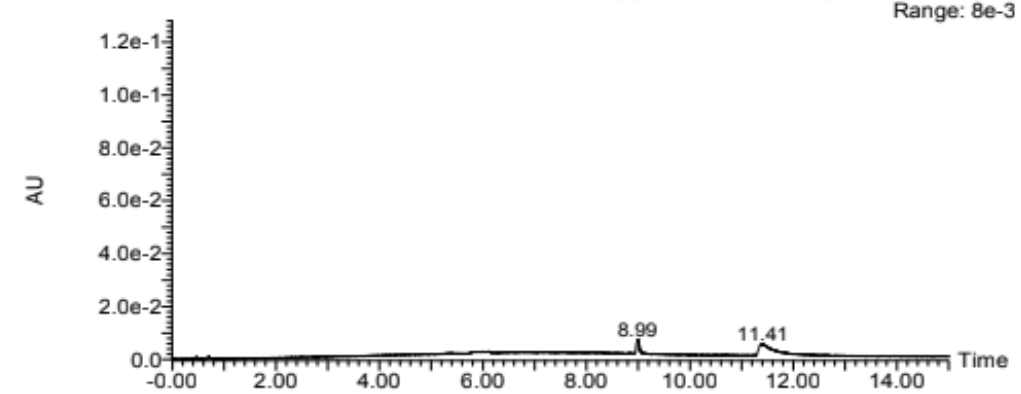
JT-197-LC-2 Sm (Mn, 2x3)

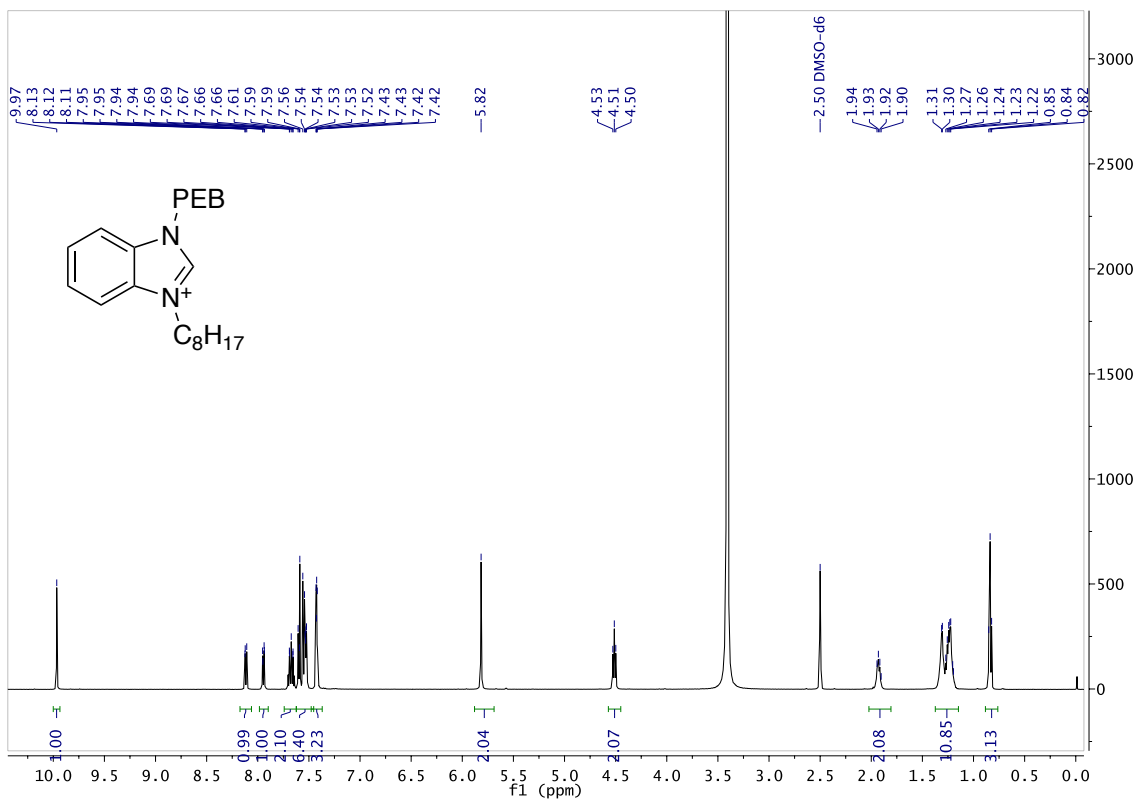
(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens.



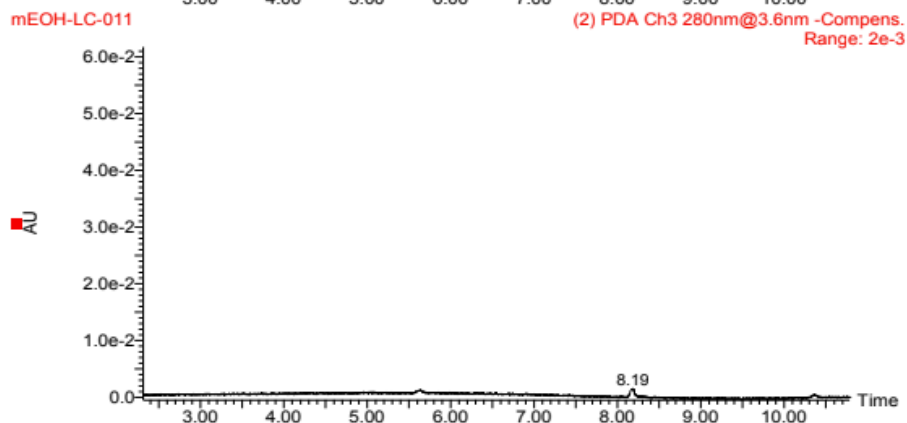
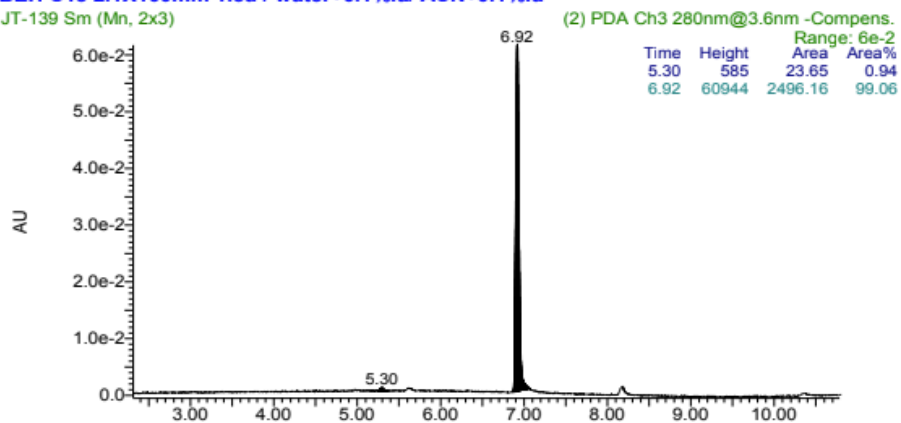
MEOH-LC-013

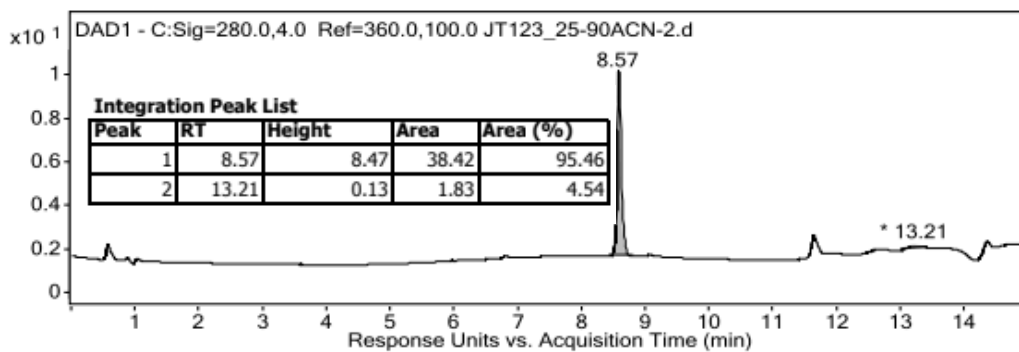
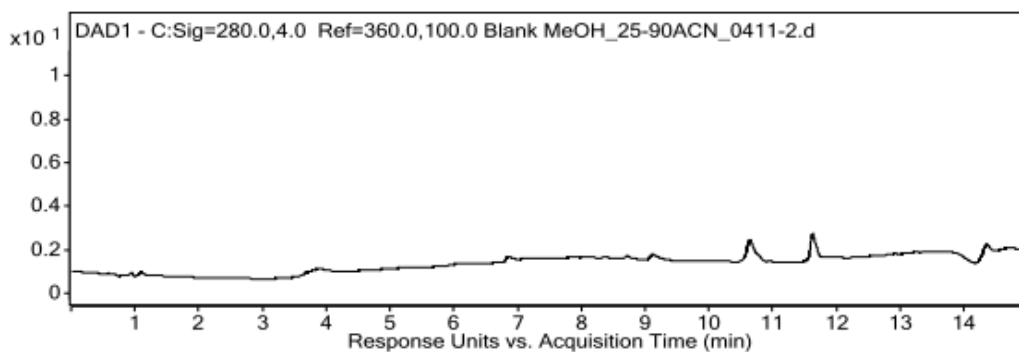
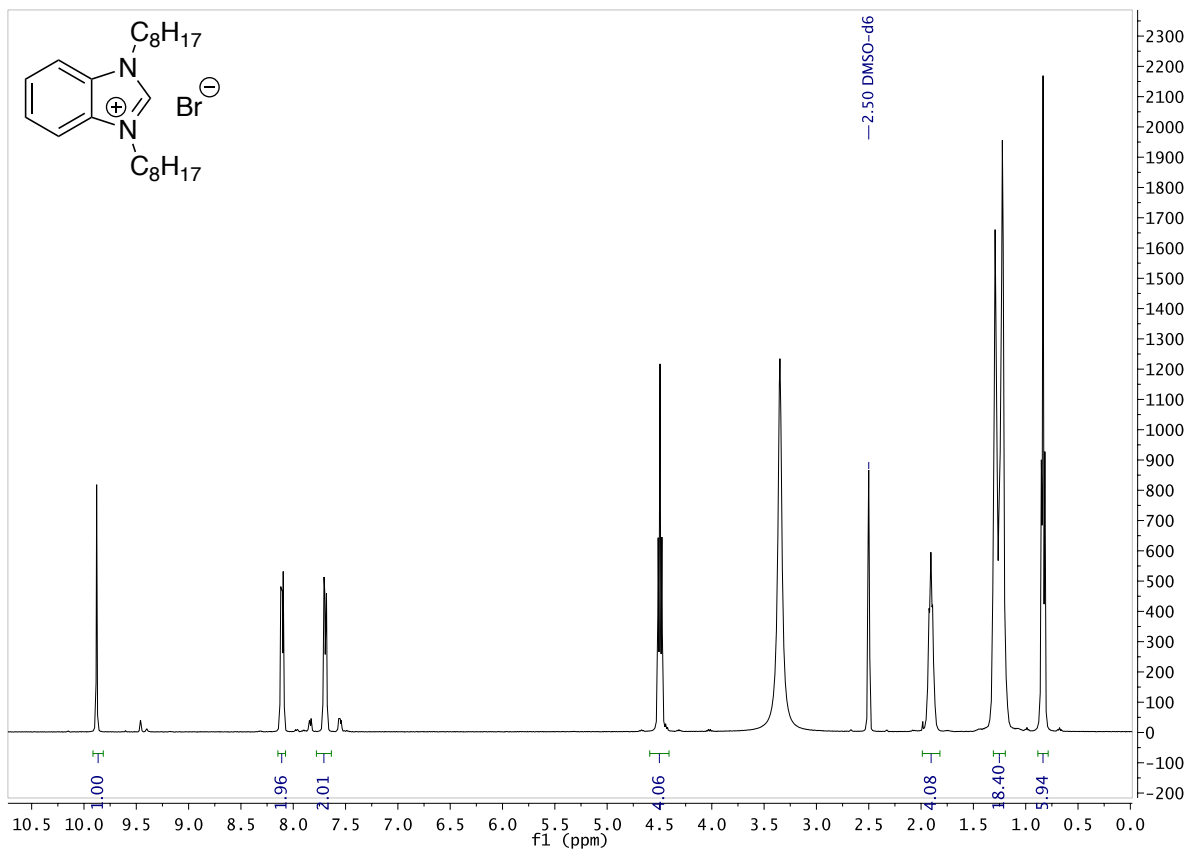
(2) PDA Ch3 280nm@3.6nm -Compens.

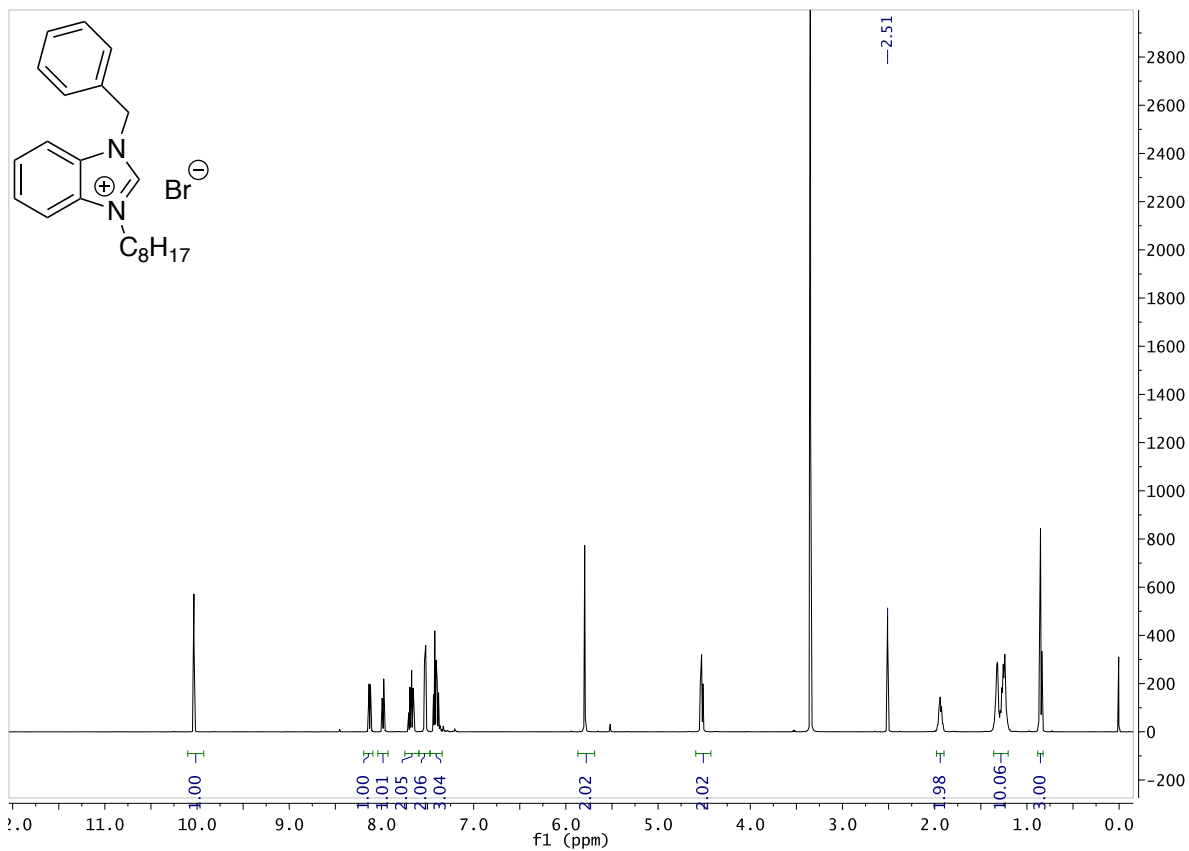




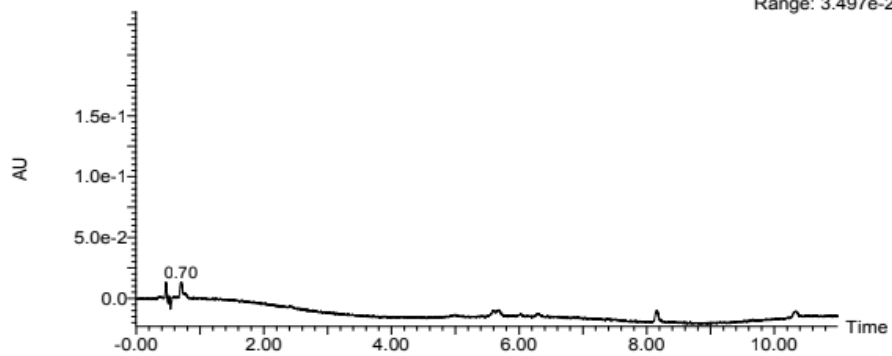
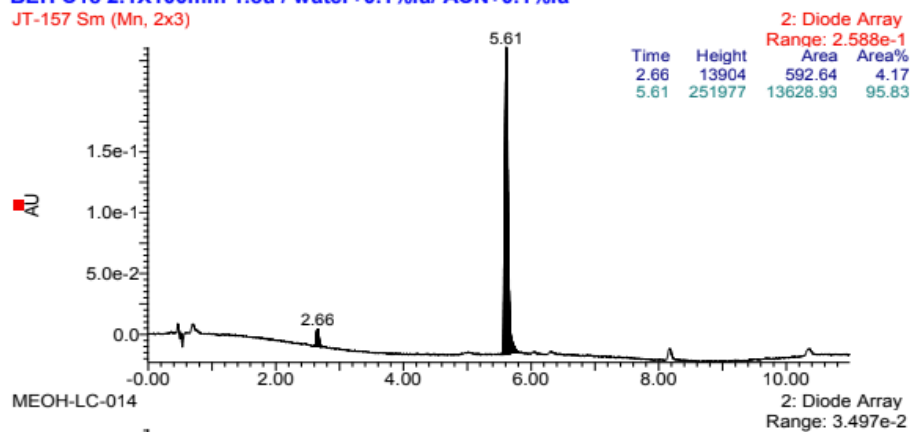
BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-139 Sm (Mn, 2x3)

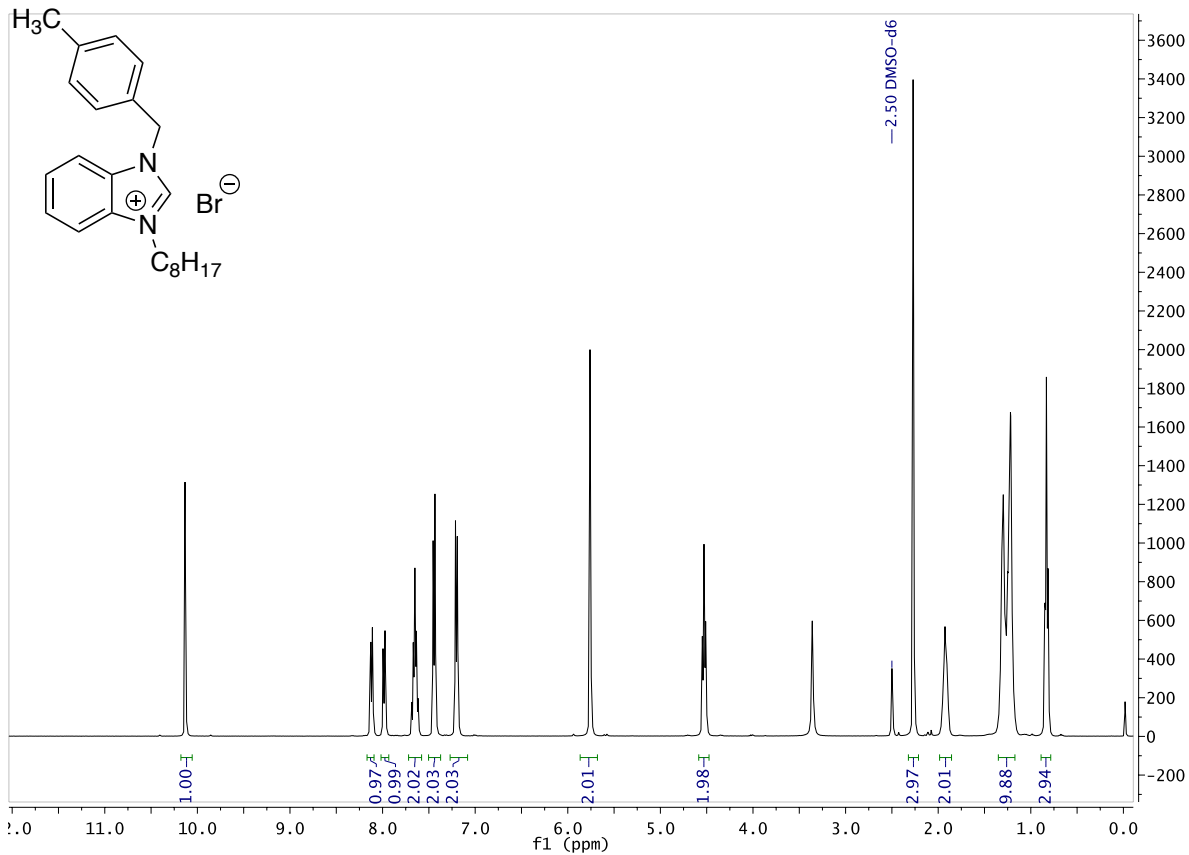




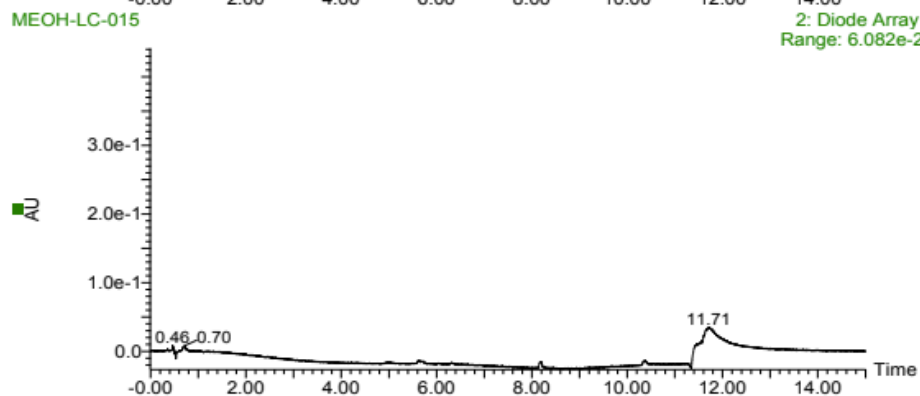
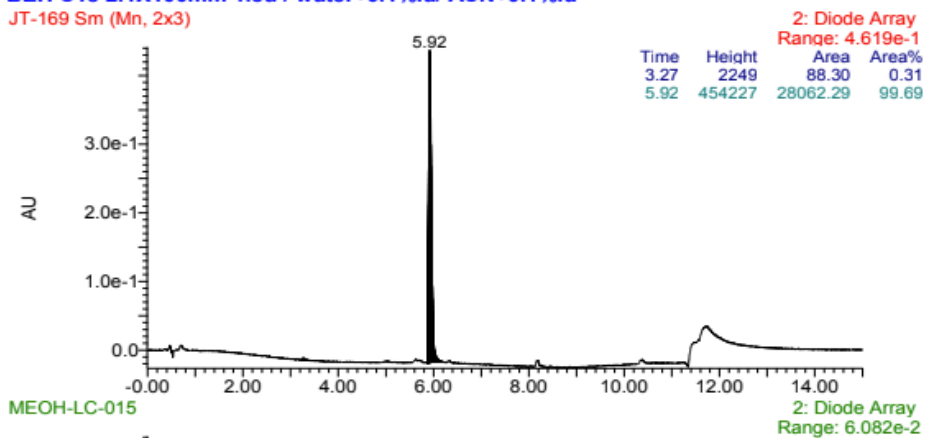


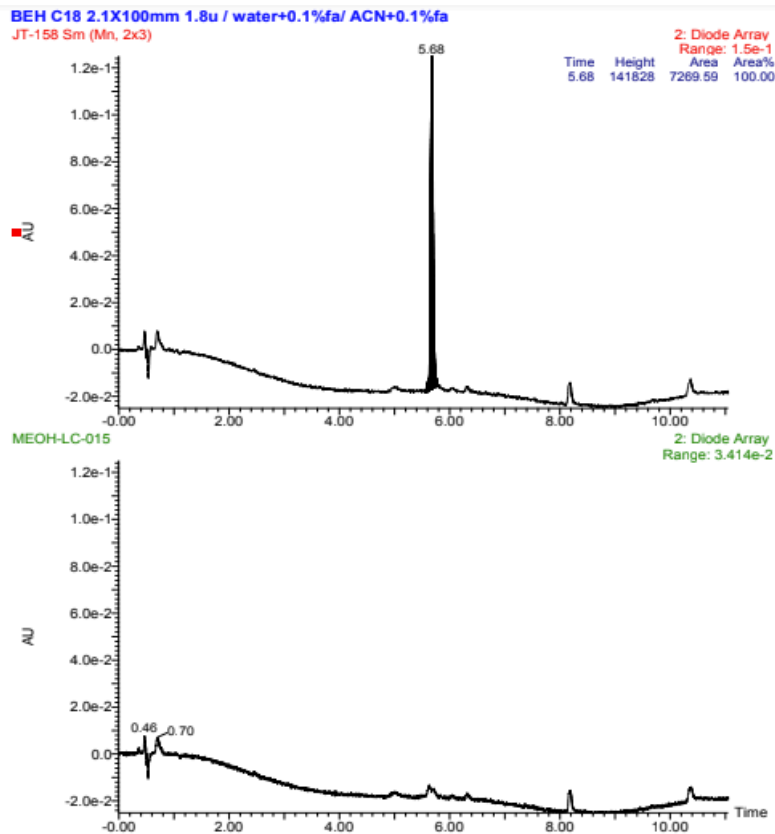
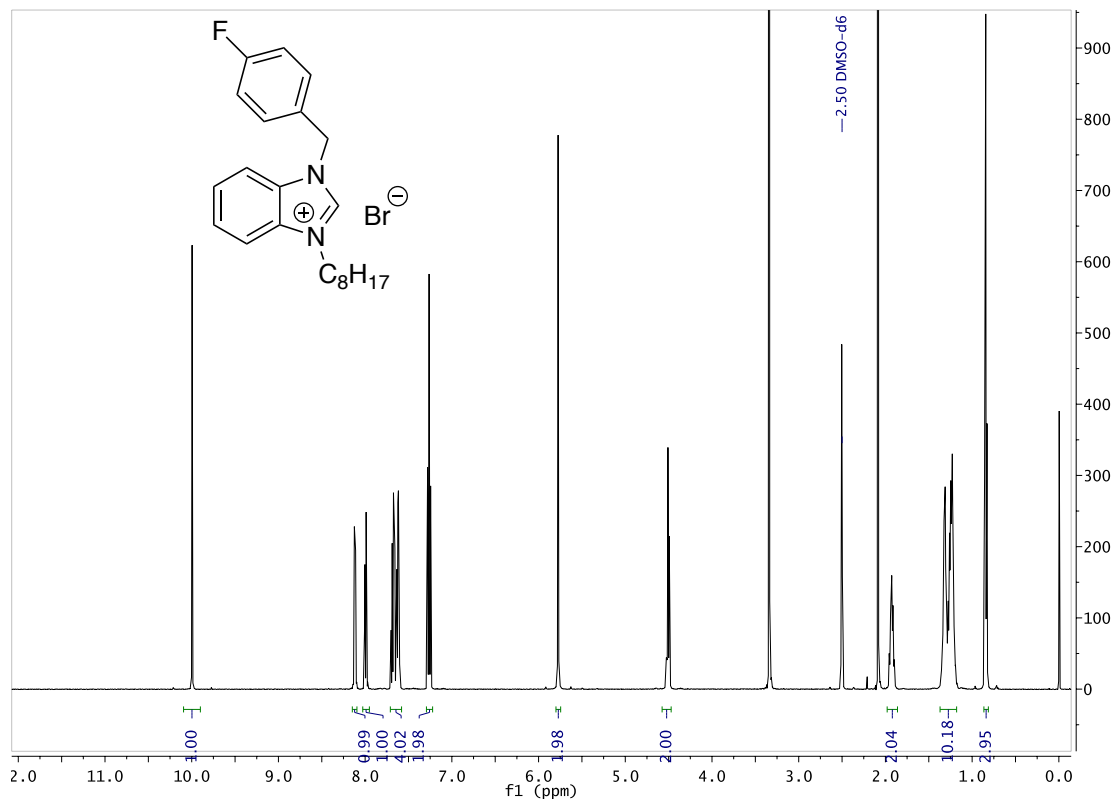
BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-157 Sm (Mn, 2x3)

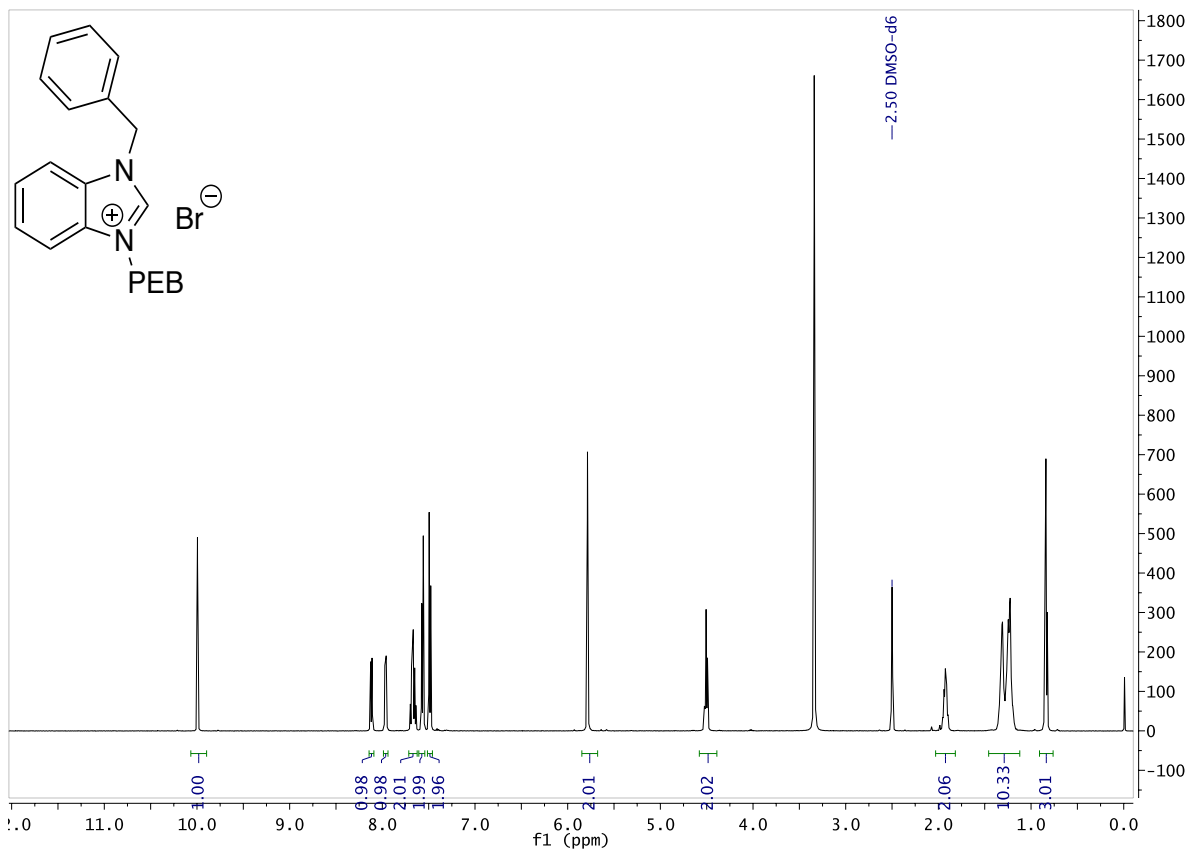




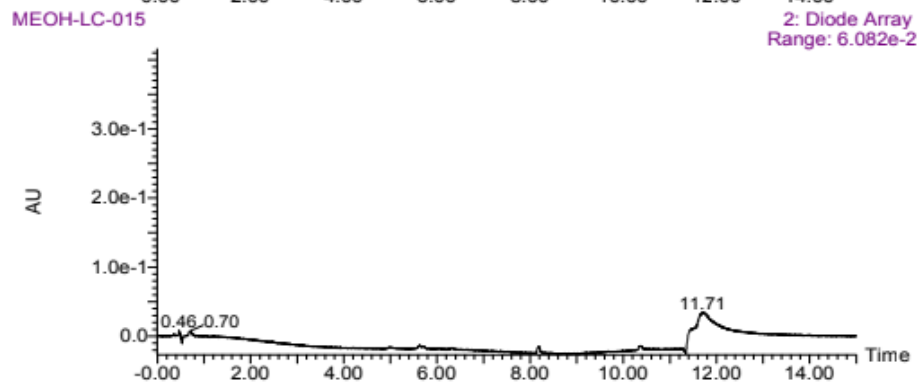
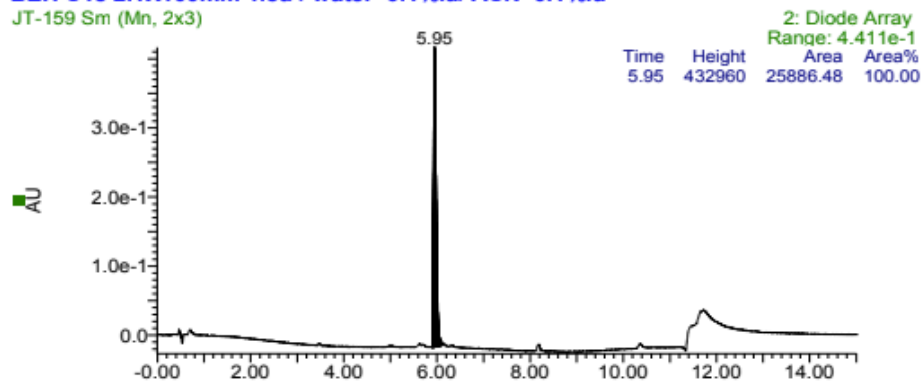
BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-169 Sm (Mn, 2x3)

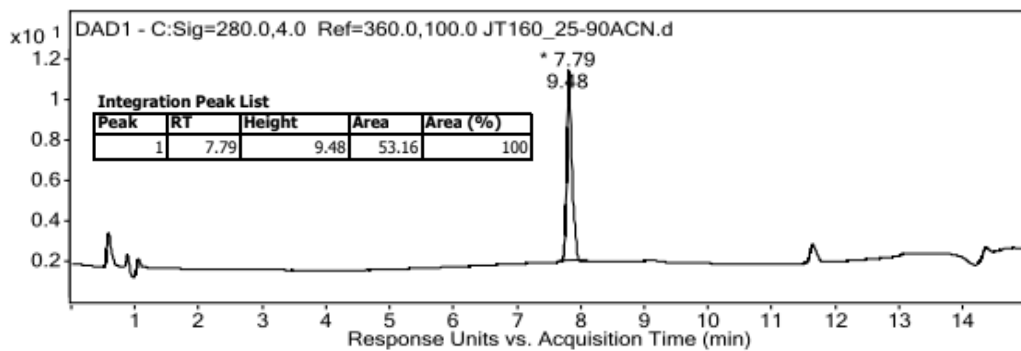
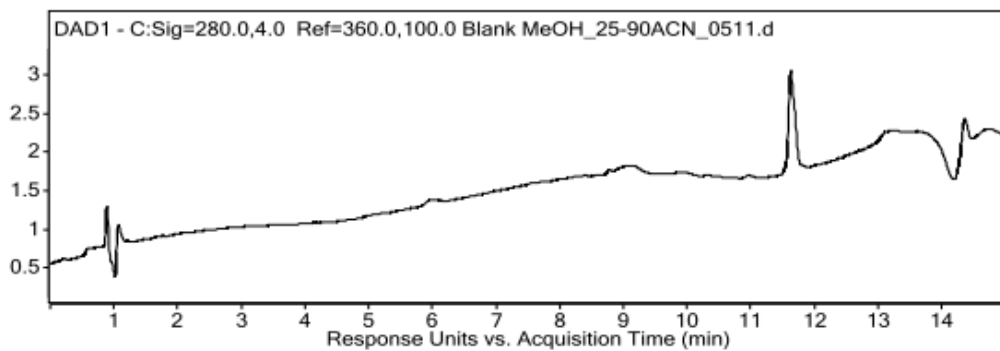
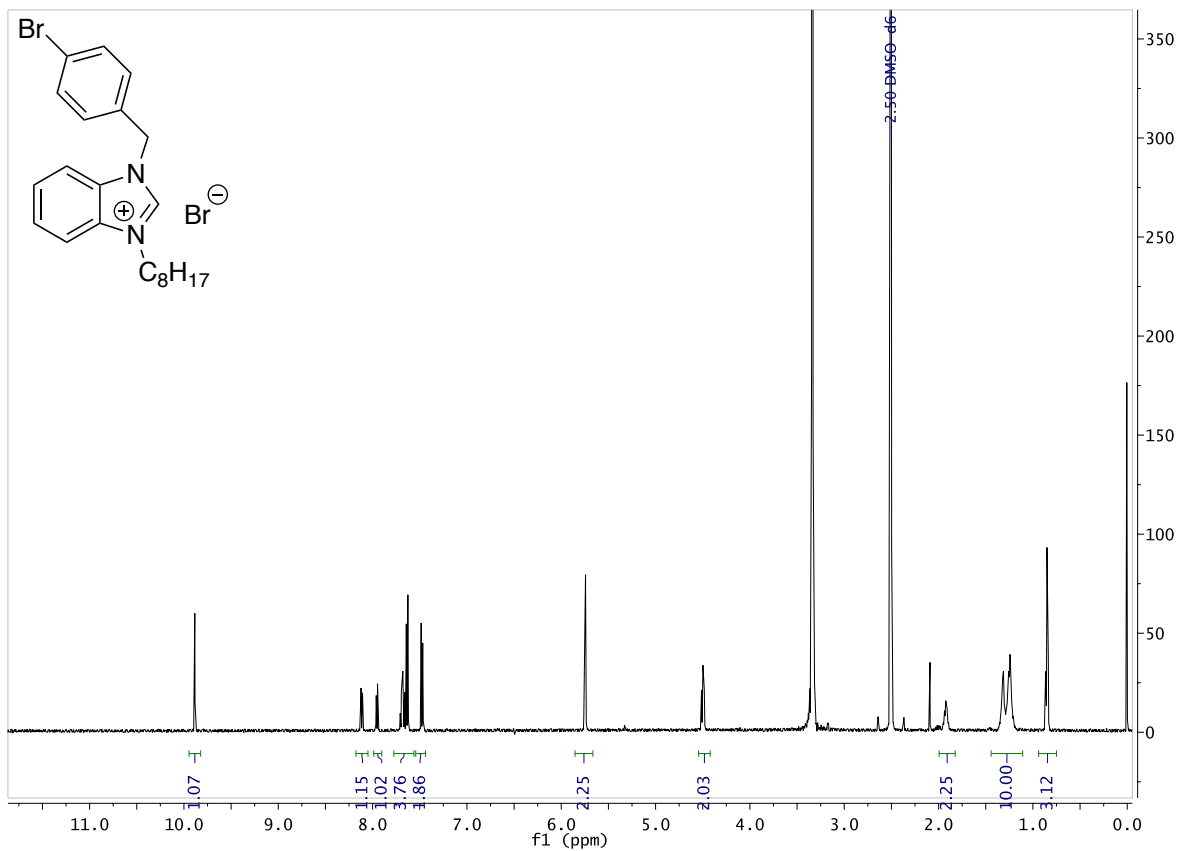


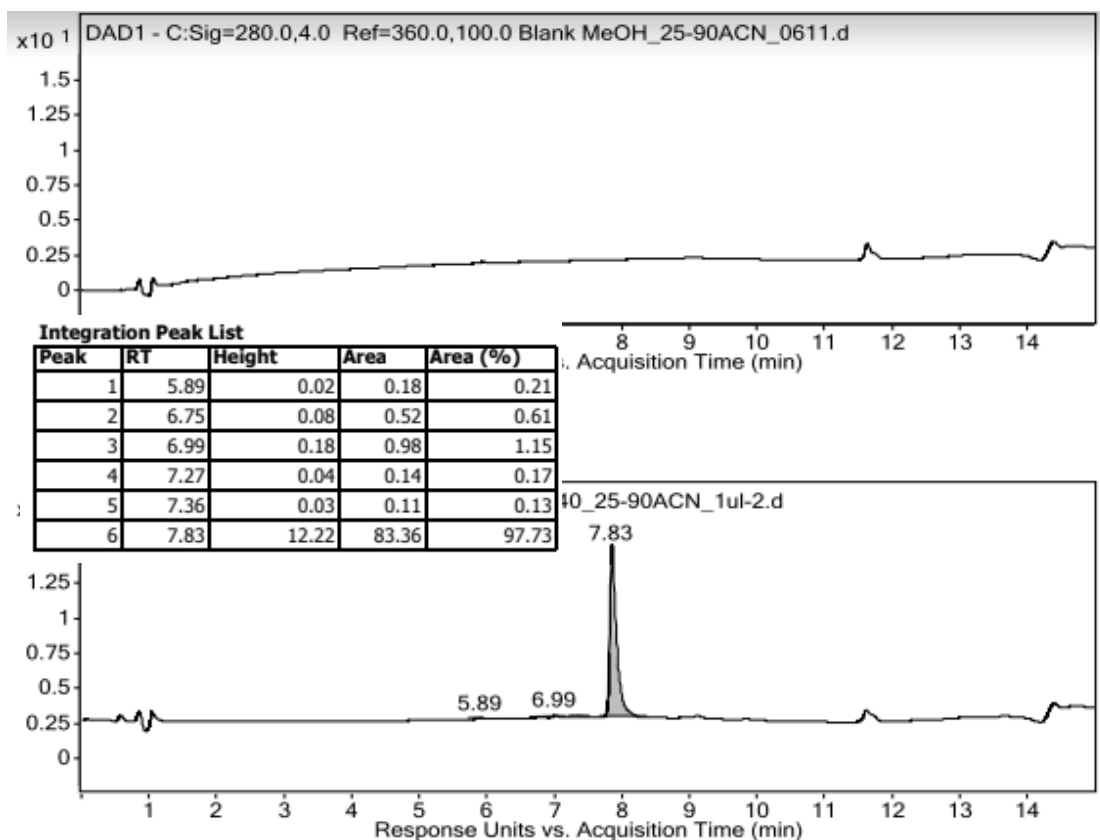
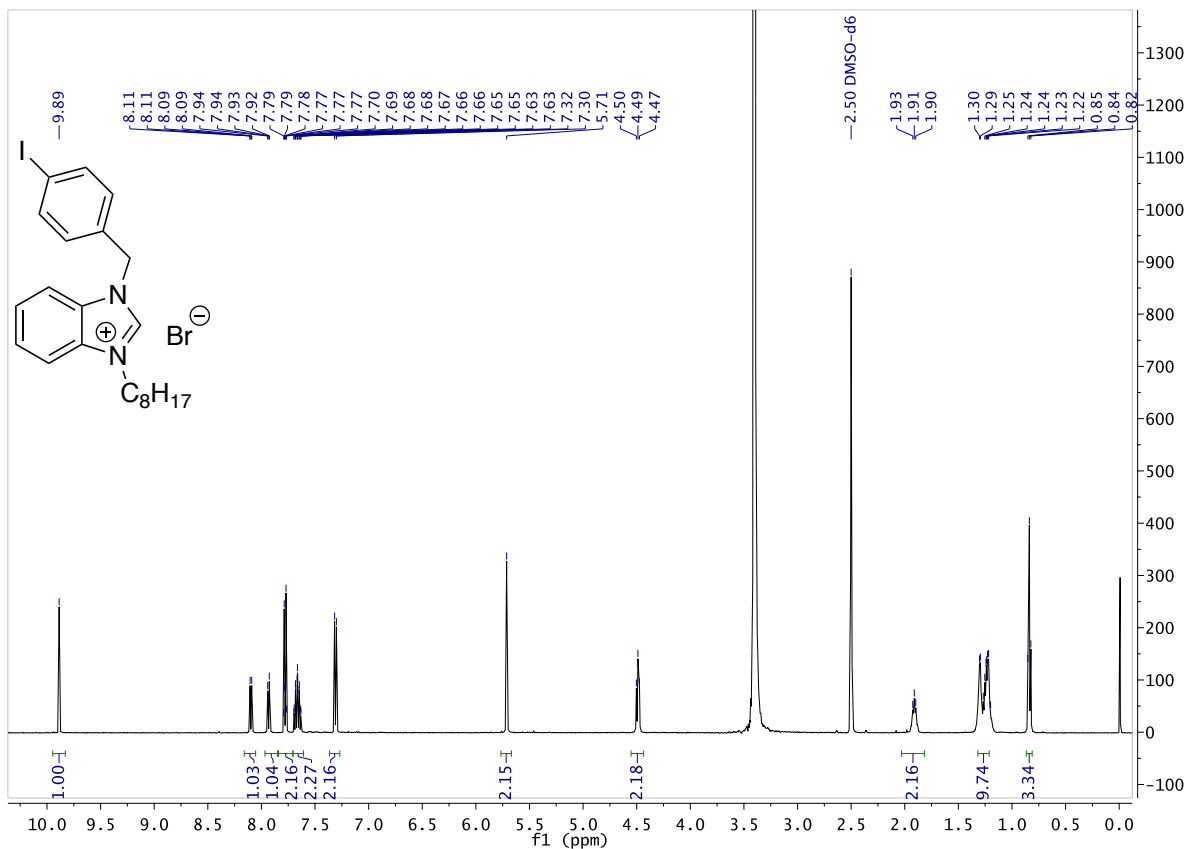


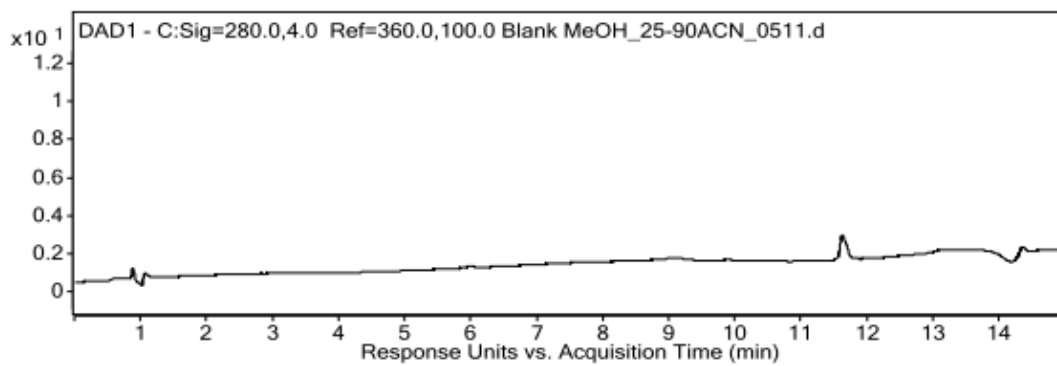
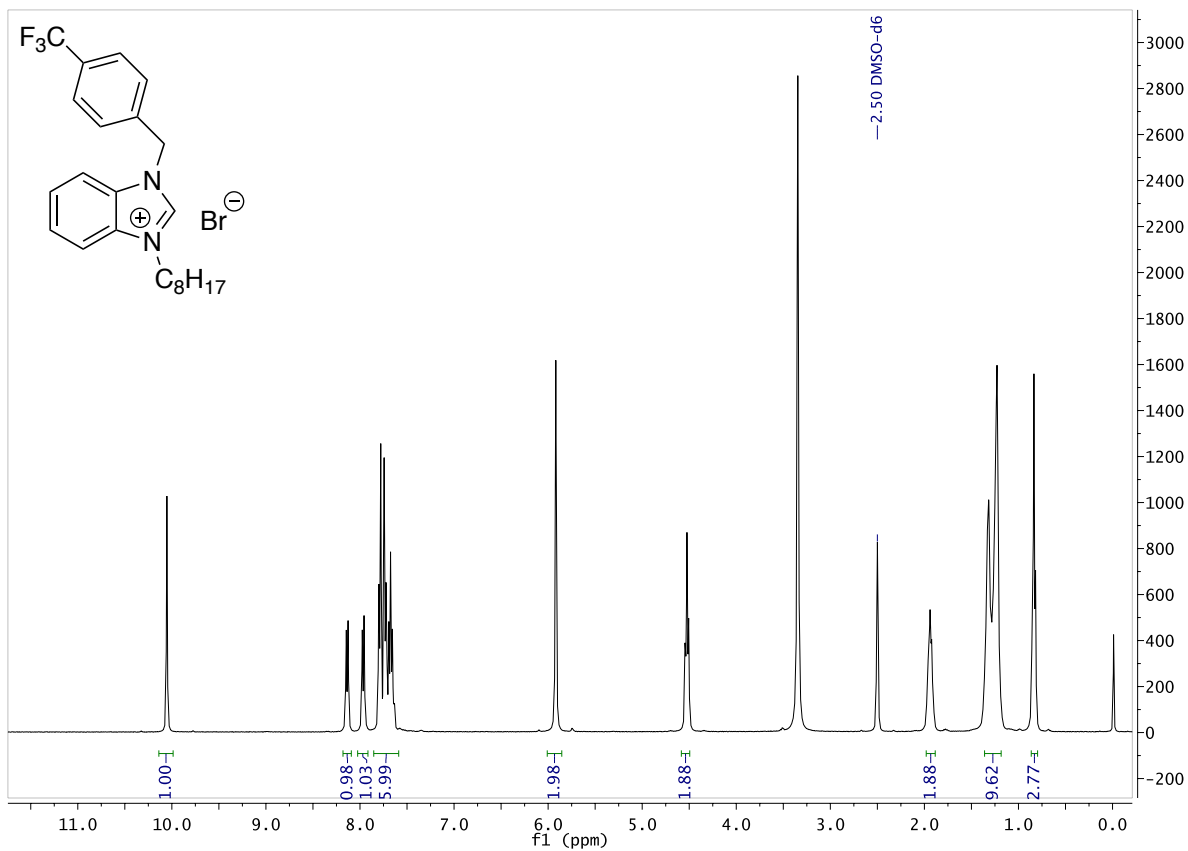


BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-159 Sm (Mn, 2x3)



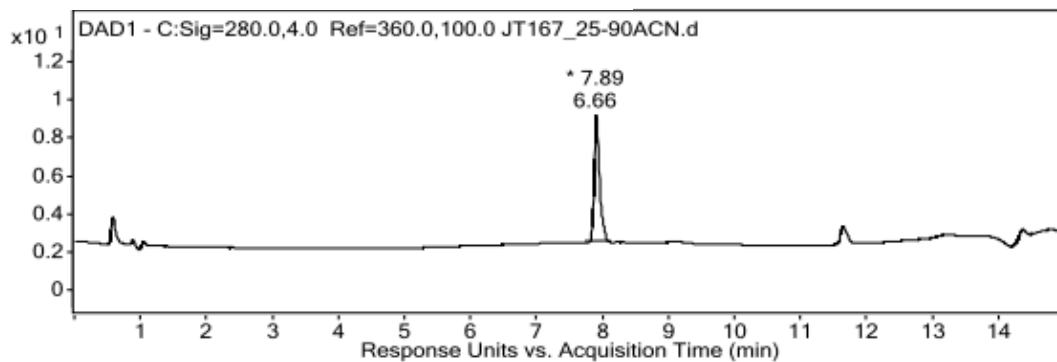


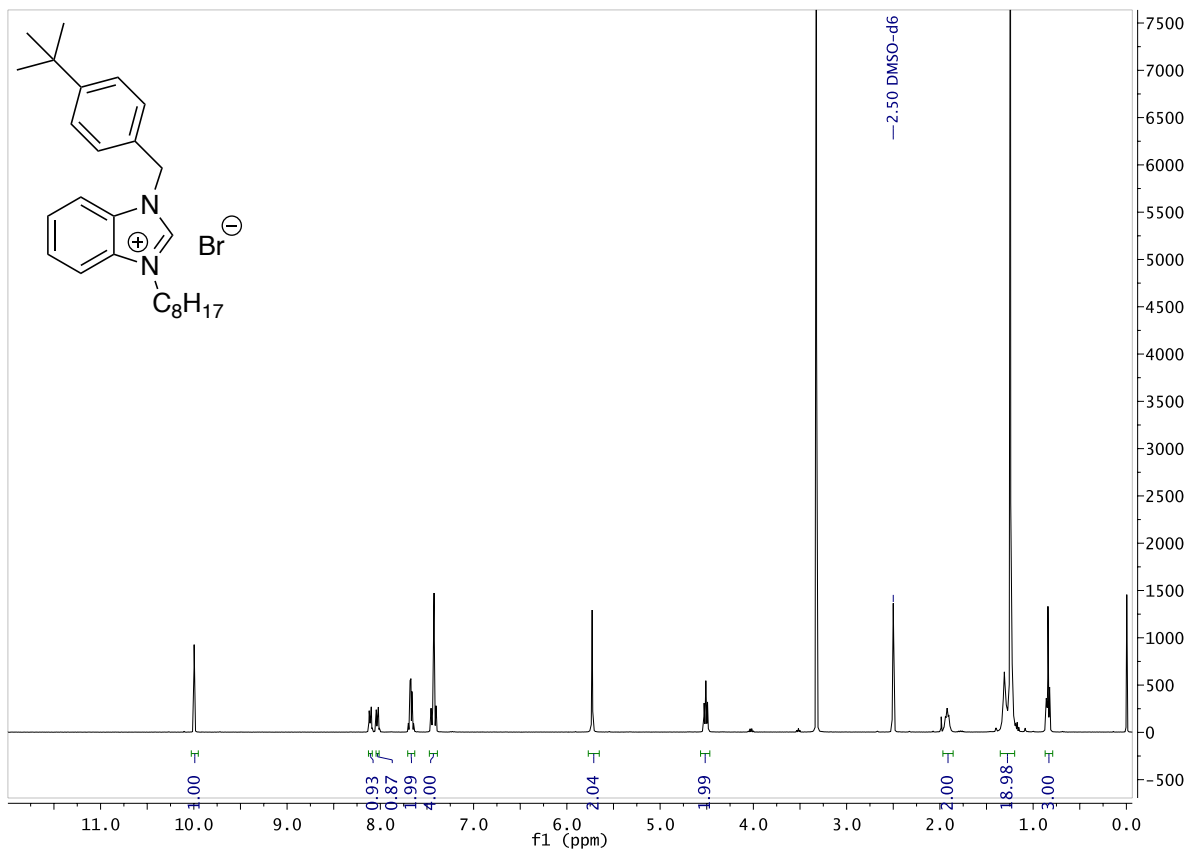




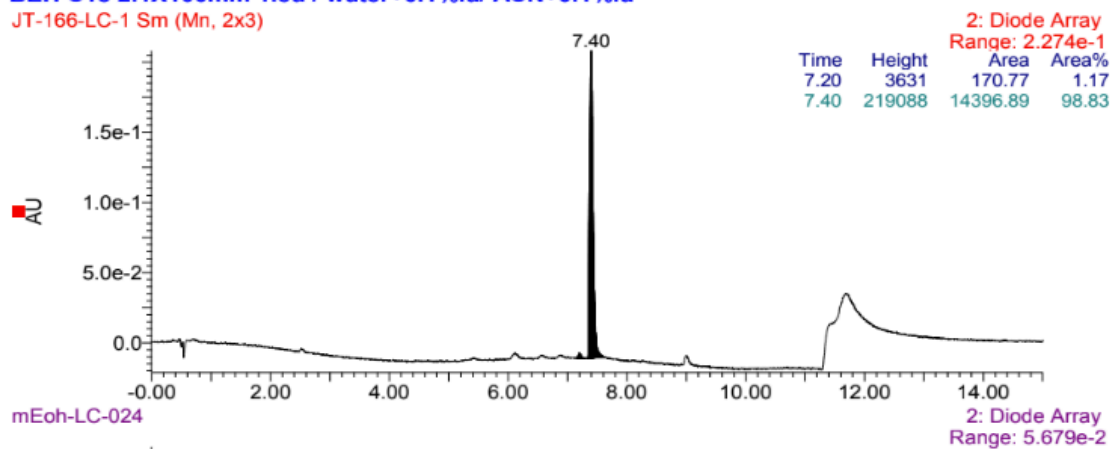
Integration Peak List

Peak	RT	Height	Area	Area (%)
1	7.89	6.66	37.39	100

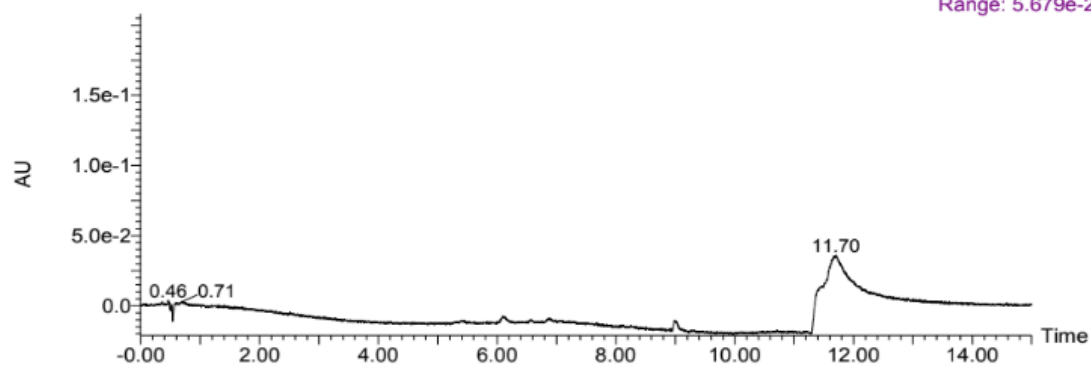


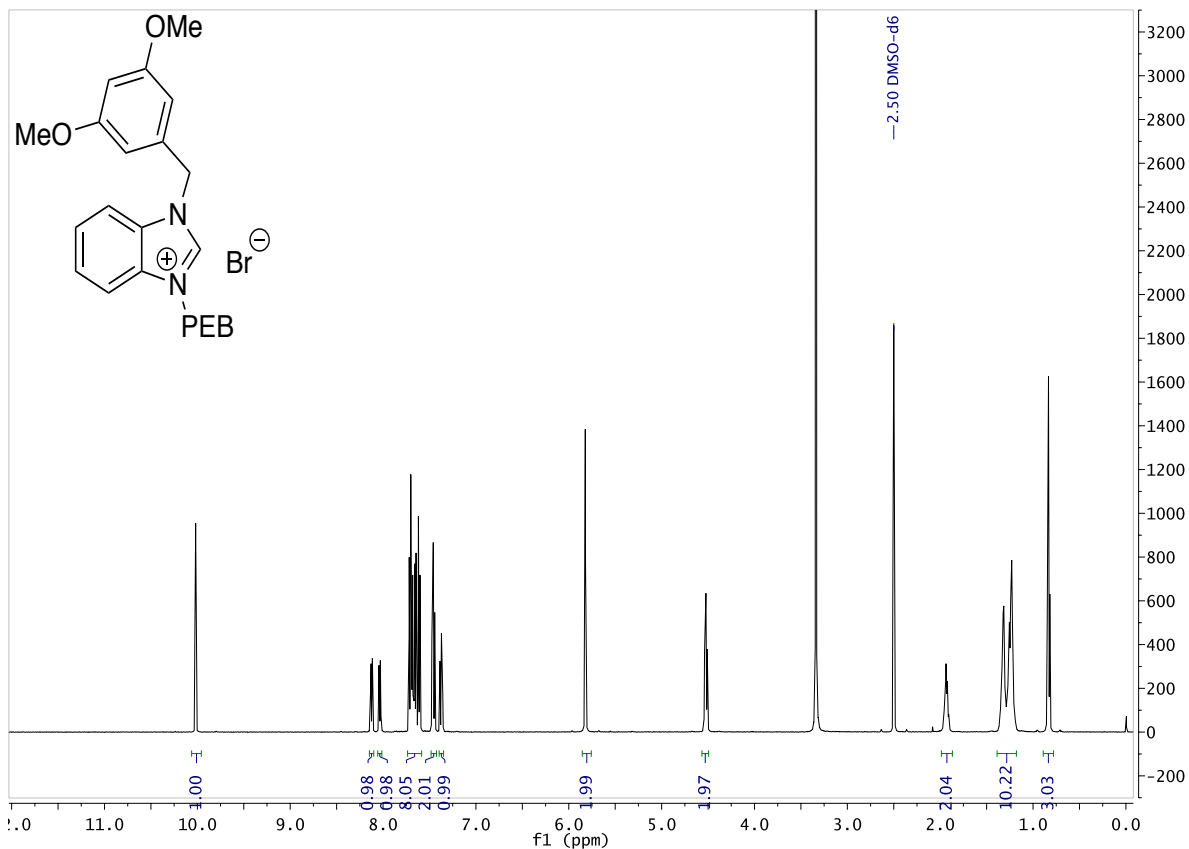


BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-166-LC-1 Sm (Mn, 2x3)

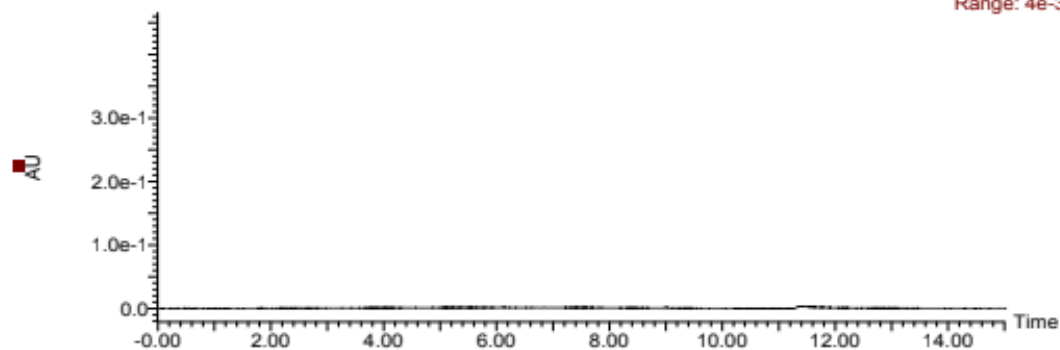
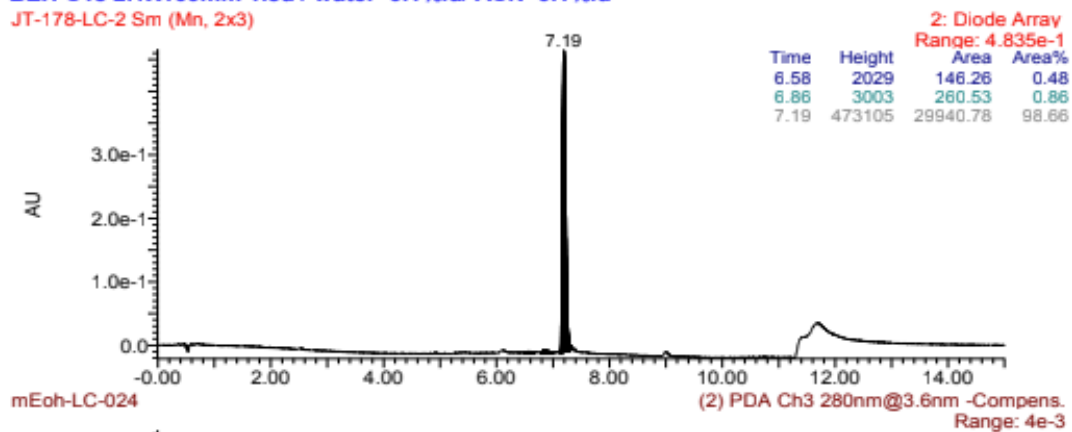


mEoh-LC-024





BEH C18 2.1X100mm 1.8u / water+0.1%fa/ ACN+0.1%fa
 JT-178-LC-2 Sm (Mn, 2x3)



Annexe 4 : informations supplémentaires de l'article 4 «Phytochemicals and cyclodextrins based- Pickering emulsions: natural potentiators of antibacterial, antifungal and antibiofilm activity»

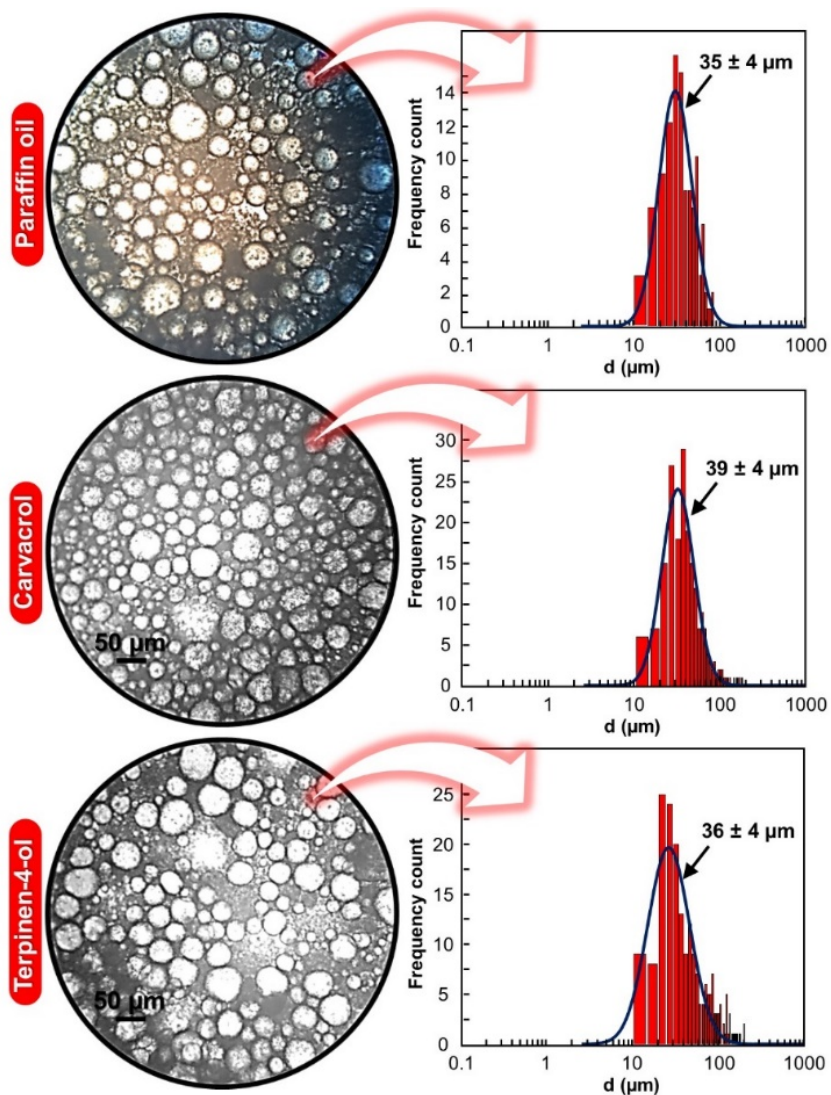


Figure A4.1. Microphotographs of oil/water emulsion (weight ratio: 1/1) stabilized with β -CD (10 wt. %) observed under: transmitted light illumination (A), reflected oblique light illumination (B) and 3D surface plot interpretation (C).

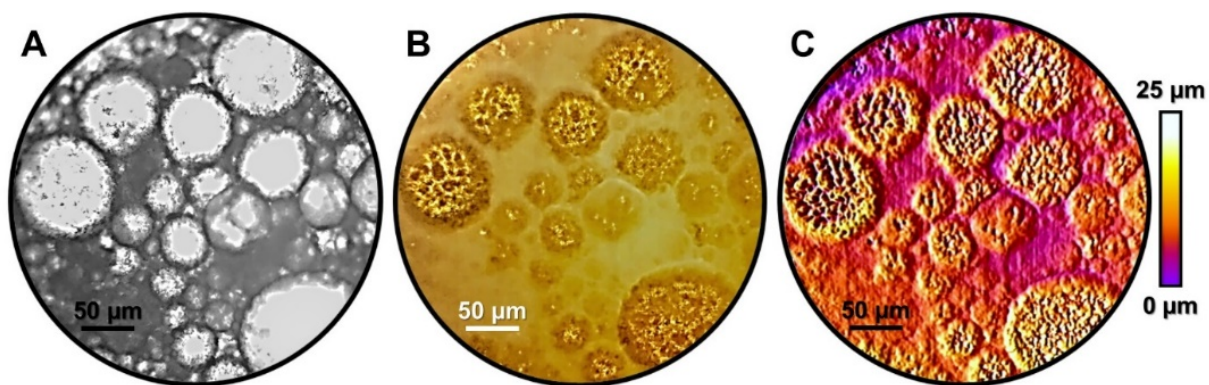


Figure A4.2. Microphotographs of terpinen-4-ol/water emulsion (weight ratio: 1/1) stabilized with β -CD (10 wt. %) observed under: transmitted light illumination (A) reflected oblique light illumination (B) and 3D surface plot interpretation (C).

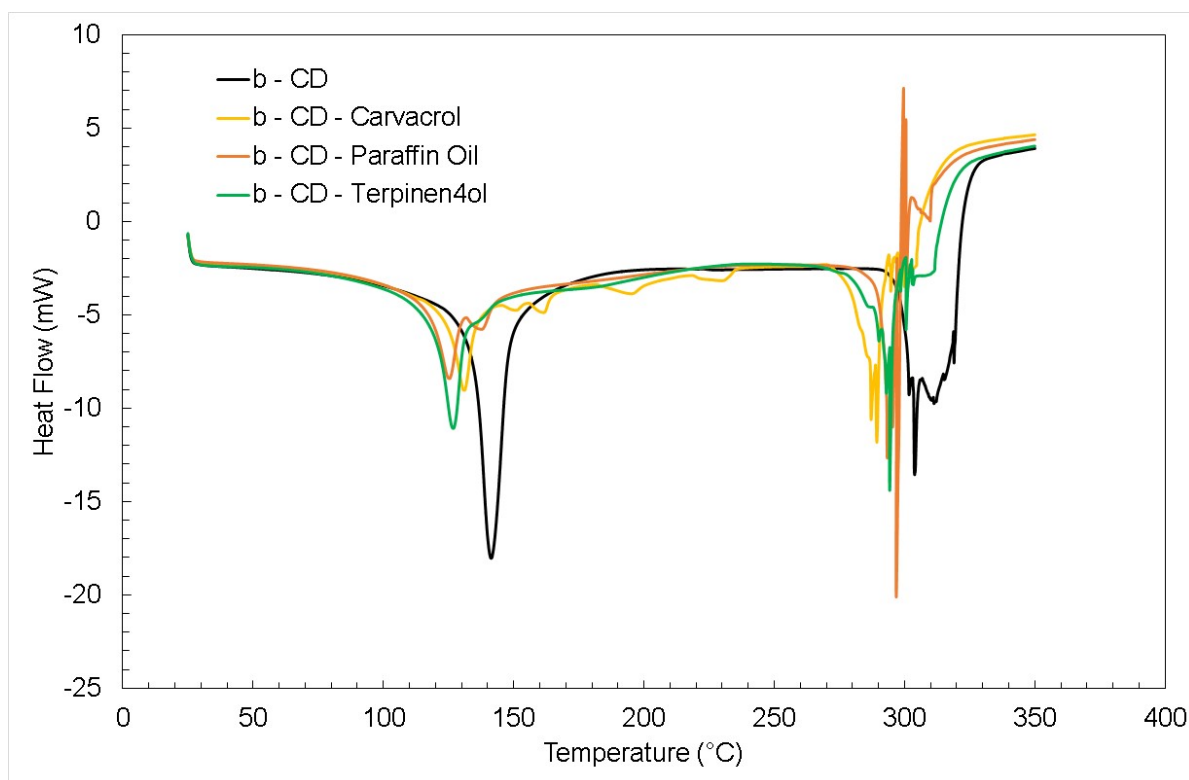


Figure A4.3. DSC of the dry powders compared to the free β -CD.

