

Université de Montréal

# Synthèse de nouveaux sels de benzimidazolium rigide pour la perméabilisation membranaire

*Par*

Amélie Dubreuil

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Master of Science (M. Sc.) en chimie

Décembre 2021

© Amélie Dubreuil

*Ce mémoire intitulé :*

**Synthèse de nouveaux sels de benzimidazolium rigide pour la  
perméabilisation membranaire**

*Présenté par*

**Amélie Dubreuil**

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

**Richard Giasson**

Président-rapporteur

**Andreea R. Schmitzer**

Directeur de recherche

**Alexis Vallée-Bélisle**

Membre du jury

## Résumé

La résistance aux antibiotiques est responsable de nombreuses maladies et décès depuis plusieurs décennies. L'augmentation de la résistance bactérienne a donc encouragé les chercheurs à développer de nouveaux antibiotiques, et de nouvelles stratégies pour contrer les différents mécanismes de résistance. L'un des mécanismes de résistance les plus notables est la formation de biofilms. Par conséquent, notre groupe de recherche s'est concentré sur différents types de mécanismes d'action des antibiotiques, plus particulièrement sur la perméabilisation de la membrane cellulaire. Ceci est réalisé par la formation de pores, d'agrégats, de canaux ou de micelles à travers celle-ci. En réponse à cela, nous avons synthétisé des composés antibactériens possédant deux cations benzimidazolium, deux chaînes apolaires hydrophobes et un échafaudage phényl- ou pyridyl-phényléthynylène, ayant la capacité de former des agrégats supramoléculaires via des interactions  $\pi$ - $\pi$  et des liaisons hydrogène à travers la bicouche lipidique. Ces composés perturbateurs de la membrane agissent par un mécanisme rapide et efficace et ont montré de bons résultats contre les souches *MRSA* (Methicilin Resistant Staphylococcus Aureus), ce qui en fait des candidats prometteurs pour combattre les infections bactériennes et la formation des biofilms.

**Mots-clés :** antibiotique, perméabilisation, biofilm, membrane cellulaire, sels de benzimidazolium.

## Abstract

Antibiotic resistance has been responsible for multiple diseases and deaths for several decades. The rise of bacterial resistance has therefore encouraged researchers to develop new antibiotics, and new strategies to counter their various resistance mechanisms. One of the more notable resistance mechanics is the formation of biofilms. Consequently, our research group focused on the different types of antibiotics mechanisms of action, more particularly on the permeabilization of the cell membrane. This is achieved through the formation of pores, aggregate, channels, or micelles through it. In response to this, we have thus synthesized antibacterial compounds with a benzimidazolium cation, a hydrophobic apolar chain and a phenyl- or pyridyl-phenylethynylene scaffold with the capacity to form supramolecular aggregates via  $\pi$ - $\pi$  interaction and hydrogen bonding through the lipid bilayer. These membrane-disrupting compounds act via a rapid and effective mechanism and have shown good results against strains of MRSA, thus making promising candidates to combat bacterial infections and biofilms formation.

**Keywords:** antibiotics, permeabilization, biofilm, cell membrane.

## Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des figures .....	IX
Liste des abréviations .....	XII
Remerciements.....	XIV
Chapitre 1 : Introduction générale .....	1
1.1 Les pandémies.....	1
1.2 Les organismes pathogènes.....	2
1.2.1 Les bactéries .....	2
1.2.2 Les levures.....	3
1.3 Les membranes cellulaires.....	4
1.3.1 Composition des membranes cellulaires.....	4
1.3.2 La membrane des bactéries.....	6
1.3.3 La membrane des levures.....	8
1.4 Découverte des antibiotiques et facteurs influençant la résistance aux antibiotiques .....	10
1.5 Mécanisme d'action des antibiotiques et mode de résistance des bactéries .....	12
1.5.1 Inhibition de la synthèse d'ADN .....	13
1.5.2 Inhibition de la synthèse d'ARN.....	16
1.5.3 Inhibition de la synthèse des protéines.....	17

1.5.4 Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire .....	19
1.5.5 Inhibition bactérienne via des perturbateurs membranaires .....	20
1.6 Les biofilms .....	22
1.6.1 La formation de biofilms .....	22
1.6.2 Composition d'un biofilm .....	23
1.6.3 Cycle de formation des biofilms .....	24
1.7 Les composés cationiques comme perturbateurs membranaires .....	26
1.7.1 Les ammoniums quaternaires .....	26
1.7.2 Les composés de type imidazole et benzimidazole .....	29
1.8 Description du projet .....	33
 Chapitre 2 : Matériel et méthodes utilisés pour l'étude de l'activité antimicrobienne et antibiofilm .....	 36
2.1 Concentration minimale inhibitrice .....	36
2.2 Étude de l'activité des agents antibiofilms .....	39
2.2.1 Détection des biofilms .....	39
2.3 Détermination de la biocompatibilité .....	41
2.4 Références bibliographiques .....	43
 Chapitre 3: (Article) Synthesis and activity of novel bis-benzimidazolium salts against biofilms .....	 48
3.1 Abstract .....	49
3.2 Introduction .....	49
3.3 Results and Discussion .....	51
3.3.1 Antimicrobial activity .....	52

3.3.2 Antibiofilm activity.....	55
3.3.2.1 Ability to inhibit the formation of MRSA biofilms .....	55
3.3.2.2 Ability to destroy the formation of MRSA biofilms .....	57
3.4 Conclusion.....	60
3.5 Reference .....	61
Chapitre 4: Conclusion et perspective .....	62
4.1 Conclusion.....	62
4.2 Perspective.....	63
4.3 Référence .....	64
Annexe 1: .....	I
A1.1 Materials and methods.....	I
A1.2 Synthesis and characterization.....	I
A1.3 Methods for biology assays .....	XIII
A1.3.1 Culture conditions and viability tests for bacteria and yeast.....	XIII
A1.3.2 Biofilm inhibition assay.....	XIII
A1.3.3 Biofilm disruption assay.....	XIII
A1.3.4 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis ....	XIII
A1.3.5 Haemolytic assay .....	XIV
A1.4 NMR spectra and LCMS of the synthesized compounds.....	XX

## Liste des tableaux

Table 3.1: Minimum inhibitory concentration (MIC) in $\mu\text{g/ml}$ on different bacterial strains of benzimidazolium salts.....	54
--	----

## Liste des figures

Figure 1.1: Schéma d'une cellule bactérienne.....	2
Figure 1.2: Structure d'un phospholipide : la phosphatidylcholine. ....	5
Figure 1.3: Structure d'une bicouche lipidique formée par des phospholipides. ....	6
Figure 1.4: Structure d'une membrane de bactérie Gram positifs (A) et négatifs (B). ....	7
Figure 1.5: Structure de l'acide téichoïque et d'un lipopolysaccharide. <sup>15, 16</sup> .....	8
Figure 1.6: Schéma de la structure de la membrane des levures. <sup>18</sup> .....	9
Figure 1.7 : Structure générale des pénicillines (A) et de la méthicilline (B). ....	10
Figure 1.8: Structure de la vancomycine. ....	11
Figure 1.9 : Mécanismes de résistance des bactéries. ....	13
Figure 1.10 : Structure de l'acide nalidixique (A) et de la forme générale d'une fluoroquinolone (B).....	14
Figure 1.11 : Schéma du mécanisme d'inhibition de l'ADN gyrase (ou topoisomérase). <sup>26</sup> .....	15
Figure 1.12 : Structure de la rifamycin B. ....	16
Figure 1.13 : Structure terminale d'un peptidoglycane (acyl-D-Ala-D-Ala) (A) et structure de la forme générale d'un carbapénème (B).....	20
Figure 1.14 : Interactions d'un perturbateur membranaire avec la bicouche lipidique. <sup>58</sup> .....	21
Figure 1.15 : Étape du développement des biofilms. <sup>70</sup> .....	24
Figure 1.16 : Structure générale d'un sel d'ammonium quaternaire.....	27
Figure 1.17 : Forme générale des différents composés contenant des ammoniums quaternaire (QACs). <sup>72</sup> .....	28
Figure 1.18 : Structure générale d'un chlorure de benzalkonium.....	29

Figure 1.19 : Différents composés naturels comportant un noyaux imidazole (rouge) et benzimidazole (bleu).....	30
Figure 1.20 : Structure de composés antifongiques de deuxième génération à base d'imidazole.....	32
Figure 1.21 : Synthèse générale d'un sel de benzimidazolium.....	33
Figure 1.22 : Structure des différents composés synthétisé précédemment et ayant montré une activité antibactérienne accrue. <sup>86</sup> .....	34
Figure 1.23 : Structure générale des composés cible. X : N ou C .....	35
Figure 2.1 : Représentation graphique d'une courbe de croissance d'une culture bactérienne. ....	37
Figure 2.2 : Schéma d'une plaque 96 puits utilisée lors de la détermination de la CMI. .	38
Figure 2.3 : Test mort/vivant (BacLight®). <sup>95</sup> .....	40
Figure 2.4 : Schéma d'une plaque 96 puits lors d'un test d'hémolyse.....	42
Figure 3.1: Structure of a) previously reported compounds and b) those presented in this study.....	50
Figure 3.2: Synthesis of the bis-dibenzimidazolium salts. ....	52
Figure 3.3: Representative images inhibition of <i>MRSA</i> biofilms labeled with <i>Live/Dead</i> stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials... .	56
Figure 3.4: Average of three images of the inhibition of <i>MRSA</i> biofilms labeled with <i>Live/Dead</i> stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials calculated with ImageJ software. Negative control (DMSO 10 %) and positive control (Triton X). ....	57
Figure 3.5: Representative images of the destruction of mature <i>MRSA</i> biofilms labeled with <i>Live/Dead</i> stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials.....	59

Figure 3.6: Average of three images of the destruction of mature *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials calculated with ImageJ software. Negative control (DMSO 10 %) and positive control (Triton X). ..... 60

Figure A1.3.1: Average percent viability in triplicate for *E. Coli* (SK037)..... XV

Figure A1.3.2: Average percent viability in triplicate for *E. Coli* (SK037)..... XV

Figure A1.3.3: Average percent viability in triplicate for *MRSA = Methicillin-resistant S. aureus* (ATCC 43300)..... XVI

Figure A1.3.4: Average percent viability in triplicate for *MRSA = Methicillin-resistant S. aureus* (ATCC 43300)..... XVI

Figure A1.3.5: Average percent viability in triplicate for *MRSA = Methicillin-resistant S. aureus* (ATCC 43300)..... XVII

Figure A1.3.6: Average percent viability in triplicate for *VRE = vancomycin-resistant E. faecium* (BAA-2316). ..... XVII

Figure A1.3.7: Average percent viability in triplicate for *VRE = vancomycin-resistant E. faecium* (BAA-2316). ..... XVIII

Figure A1.3.8: Average percent viability in triplicate for *VRE = vancomycin-resistant E. faecium* (BAA-2316). ..... XVIII

Figure A1.3.9: Average percent viability in triplicate for *C. albicans* (SC5314). ..... XIX

Figure A1.3.10: Average percent hemolysis in triplicate for benzimidazolium salts. .... XIX

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNp : acide ribonucléique polymérase

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

BAC : benzalkonium chloride

CMI : concentration minimal inhibitrice

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

ESI : ionisation par électronébuliseur

g : gramme

h : heure

IP : iodure de propidium

L : litre

LB : Lysogeny Broth

LCMS : spectrométrie de masse couplée à un chromatographe liquide

MHz : megahertz

min : minute

mL : millilitre

mM : millimolaire

mmol : millimole

MRSA : methicillin-resistant *staphylococcus aureus*

nm : nanomètre

PBS : phosphate-buffered saline

PEB : phényléthynylbenzyle

QAC : quaternary ammonium compound

QS : quorum sensing

R : alkyle

RBC : red blood cell

RMN : resonance magnétique nucléaire

rpm : révolutions par minute

SPE : substance polymérique extracellulaire

TBAF : tetra-n-butylammonium fluoride

UV : ultraviolet

VRE : vancomycine-résistant *enterococci*

°C : degré Celsius

$\delta$  : déplacement chimique

$\mu\text{g}$  : microgramme

$\mu\text{L}$  : microlitre

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche Pr. Andreea R. Schmitzer pour m'avoir soutenu tout au long de mon parcours académique, de m'avoir apporté toute l'aide dont j'avais besoin et de m'avoir accepté dans son groupe de recherche. Je remercie également mon groupe de m'avoir apporté toute l'aide dont j'ai eu besoin pour réussir et de m'avoir fait cheminer autant dans mon apprentissage que dans mon développement personnel. Sans vous, mes années de maîtrise n'auraient pas été pareilles! Je tiens à remercier ma famille et amis de m'avoir supporté et encouragé à ne jamais arrêter malgré les nombreuses fois où j'ai dû me désister.

# Chapitre 1 : Introduction générale

## 1.1 Les pandémies

La pandémie du coronavirus à laquelle l'humanité est confrontée actuellement est l'un des plus grands défis jamais vécus après le virus de la grippe espagnole de 1918, qui a fait plus de 50 millions de morts.<sup>1,2</sup> Bien que les virus puissent provoquer des pandémies mortelles, il ne faut cependant pas oublier un autre ennemi omniprésent: les bactéries pathogènes.

D'un point de vue biomédical, les infections bactériennes sont considérées comme étant plus faciles à cibler que les virus, puisque les cellules procaryotes présentent certaines différences avec les cellules humaines, au niveau de la structure de l'enveloppe cellulaire et des processus biochimiques. En revanche, les virus, eux, utilisent plutôt nos cellules pour se propager, ce qui est beaucoup plus difficile à cibler avec des médicaments.<sup>3</sup>

Cependant, au fil des années et avec la surutilisation des antibiotiques et agents antimicrobiens en milieux hospitaliers, les souches de bactéries résistantes sont devenues de plus en plus fréquentes et plus difficiles à traiter. Certaines bactéries pathogènes sont désormais extrêmement résistantes aux médicaments sur le marché, de sorte qu'une infection peut avoir un impact sévère ou même provoquer la mort. Certaines études résumant les rapports cliniques du coronavirus ont même montré que plus de 60 % des patients avaient reçus des antibiotiques.<sup>2,3</sup> Ainsi, sans la découverte de nouveaux antibiotiques et sans la gestion de leur utilisation, le risque de contracter une infection bactérienne est de plus en plus probable.

## 1.2 Les organismes pathogènes

### 1.2.1 Les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes généralement unicellulaires appartenant à la famille des procaryotes. Elles se distinguent des cellules eucaryotes selon plusieurs caractéristiques, telles que le mode de reproduction, l'organisation intracellulaire, dont la présence d'organites dans les cellules eucaryotes, l'organisation de leur ADN, la taille, la motilité et la composition de la membrane. En effet, la cellule bactérienne représente l'organisation la plus simple des organismes unicellulaires, puisqu'elle est dépourvue d'organites compartimentés, tels que le noyau. Elles possèdent un seul chromosome circulaire libre (le plasmide), un nucléoïde (ADN enroulé), plus de 15 000 ribosomes et peuvent posséder une ou deux membranes plasmiques (Figure 1.1).<sup>4-5</sup>

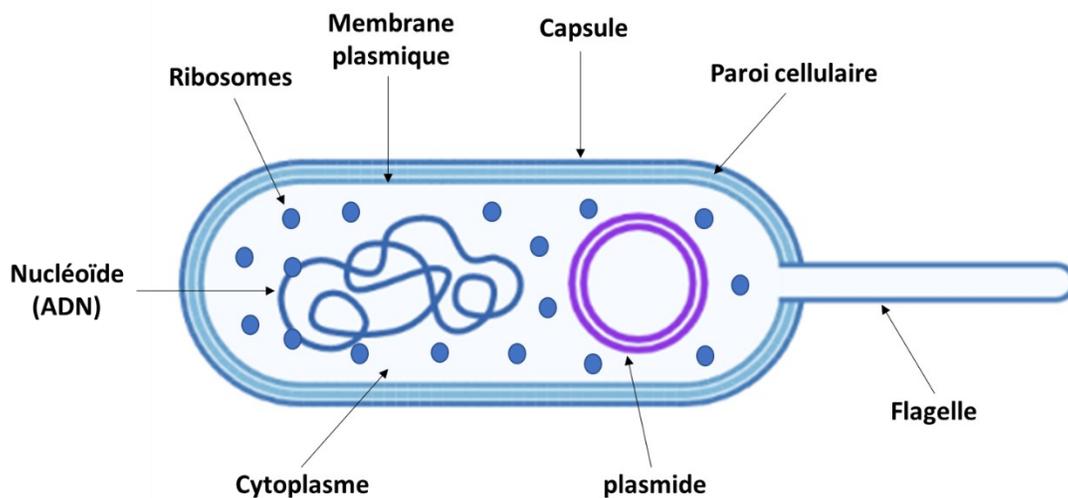


Figure 1.1: Schéma d'une cellule bactérienne.

### 1.2.2 Les levures

Les levures (ou champignons) sont quant à eux, des organismes unicellulaires appartenant à la famille des eucaryotes, tout comme les cellules humaines. Ils sont utilisés dans une multitude de domaines, dont la fermentation de la bière et du vin, l'alimentation (fabrication du pain), la fabrication de textile ou encore la production d'antibiotiques.<sup>6</sup> Par la forte similitude entre les levures et les cellules humaines, elles ont été introduites à titre expérimental par Hershel Roman dès 1930 et elles ont depuis reçu une attention particulière dans la recherche.<sup>7</sup> Ce type d'organisme possède un système biologique idéal relativement simple dans lequel sa structure et son mécanisme fondamental de survie sont largement utilisés à titre de modèle cellulaire de référence, notamment pour l'étude des voies métaboliques. Leur utilisation dans le domaine de la recherche comporte plusieurs avantages : elles peuvent facilement et rapidement se multiplier dans un milieu propice, leur code génétique est bien connu, facilement analysable et manipulable avec les techniques classiques, et finalement, leurs composantes cellulaires peuvent être facilement isolées et étudiées.<sup>7, 8</sup>

Bien que ce type d'organismes soit nécessaire pour de nombreuses espèces avec lesquels ils vivent en symbiose, leur présence dans l'organisme humain ou animal peut s'avérer néfaste dans certaines situations. Par exemple, bien que les *Candida albicans* soient une souche de levure naturellement omniprésente dans le corps humain (muqueuse nasale, peau, intestin), elle est toutefois responsable de plusieurs infections fongiques.<sup>9</sup> Entre autres, lors d'un déséquilibre hormonal (changement de pH) ou immunitaire, ils ont la capacité de proliférer et de devenir pathogènes. Ils ont aussi la capacité de former des biofilms, ce qui leur procure une certaine résistance face aux médicaments antifongiques.<sup>9</sup> Un biofilm est en fait un agrégat de bactéries enveloppé d'un film protecteur qui permet de protéger les cellules contre les conditions fluctuantes de l'environnement. De ce fait, il est intéressant pour les chercheurs de développer de nouveaux antifongiques afin d'inhiber la prolifération et ainsi diminuer le taux d'infection lié à cette souche.

Une des stratégies utilisées afin de développer de nouveaux agents antimicrobiens est de cibler les composantes et les processus biochimiques de la membrane cellulaire des organismes pathogènes, puisqu'ils présentent certaines différences avec les membranes des cellules humaines. Une des différences les plus notables est la présence d'une paroi cellulaire externe chez les levures, dont la composition diffère grandement de celle de la membrane plasmique.<sup>10</sup> Dans notre cas, la membrane cellulaire sera donc une cible de choix pour le développement de nouveaux antibiotiques. D'où l'importance de bien connaître les différentes composantes membranaires des différents organismes.

### 1.3 Les membranes cellulaires

Chaque être vivant est constitué de cellules, unicellulaires comme les bactéries et levures, aux êtres pluricellulaires. La constitution et la morphologie des membranes peuvent cependant varier en fonction de l'espèce.

#### 1.3.1 Composition des membranes cellulaires

La membrane cellulaire est une composante structurelle fondamentale des cellules, qui permet de délimiter dans l'espace un environnement aqueux. Elle permet entre autres le bon fonctionnement le maintien de l'homéostasie de la cellule. Une membrane est un tissu organique mince et souple qui permet de compartimenter les différents organites et de protéger la cellule des éléments externes. De plus, la membrane cellulaire est semi-perméable, ce qui signifie qu'elle est sélective à son environnement et peut ainsi absorber les éléments essentiels à sa survie (certains nutriments, gaz et solutés). Elle permet également l'excrétion de différents déchets produits dans le milieu intracellulaire (comme le CO<sub>2</sub>). La membrane cellulaire est en fait un système dynamique qui permet des échanges avec son environnement extérieur.

Les membranes plasmiques des cellules sont principalement composées d'une bicouche de phospholipides, de stérols, de protéines et de glucides. Les

glycérophospholipides, principale composante des membranes cellulaires, sont des molécules amphiphiles, formées d'un glycérol lié à deux chaînes d'acide gras hydrophobes et d'un groupement phosphate hydrophile, fonctionnalisé ou non (Figure 1.2).<sup>11,12</sup>

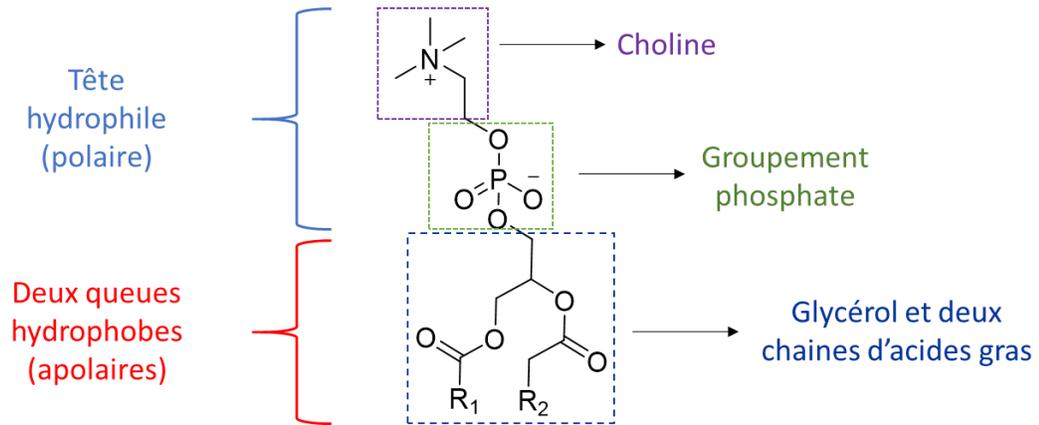


Figure 1.2: Structure d'un phospholipide : la phosphatidylcholine.

La force motrice permettant l'auto-assemblage des phospholipides en bicouche donc de la membrane plasmique est dirigée par la formation des liaisons faibles telles que les forces de Van der Waals. En effet, les têtes hydrophiles des phospholipides sont orientées des deux côtés de la bicouche de sorte que celle-ci puisse être en contact direct avec la solution aqueuse, alors que les chaînes aliphatiques sont regroupées vers l'intérieur, afin de limiter leur contact avec les molécules d'eau (Figure 1.3). Ceci est appelé l'effet hydrophobe et c'est principalement la force motrice qui permet la formation de la bicouche lipidique.<sup>4, 13</sup>

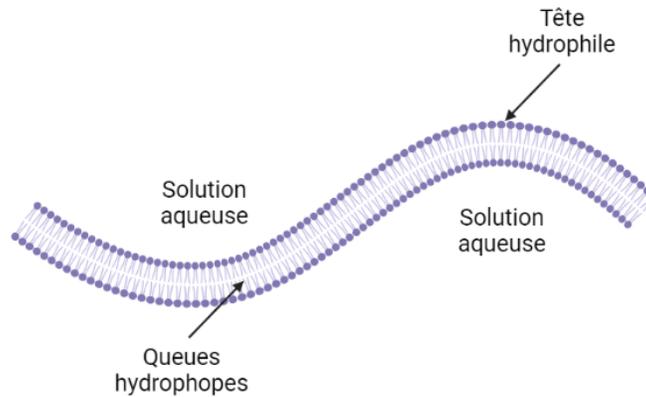


Figure 1.3: Structure d'une bicouche lipidique formée par des phospholipides.

### 1.3.2 La membrane des bactéries

Les bactéries sont classifiées en deux grandes classes: les bactéries Gram positifs et les bactéries Gram négatifs, selon la couleur qu'elles prennent après avoir subi un processus chimique appelé coloration de Gram. Les bactéries Gram positifs se colorent en bleu lorsque cette coloration est appliquée alors que les bactéries Gram négatifs se colorent en rouge. Ces deux classes de bactéries diffèrent grandement par la nature de leurs membranes : soit, par la présence ou non d'une membrane externe de phospholipides, par l'épaisseur de la couche de peptidoglycane, ainsi que par la présence ou non de lipopolysaccharides (Figure 1.4).<sup>14</sup>

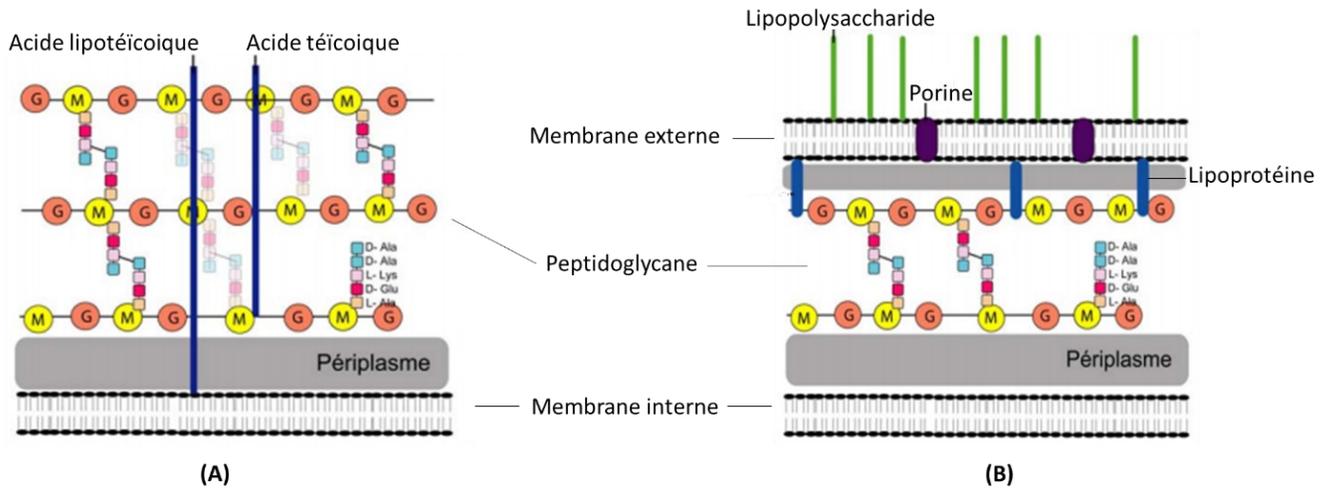


Figure 1.4: Structure d'une membrane de bactérie Gram positifs (A) et négatifs (B).

Les bactéries Gram négatifs (exemple : *E. coli*) possèdent une monocouche de peptidoglycane entre deux membranes de phospholipides : une membrane cytoplasmique et une membrane externe contenant des lipopolysaccharides chargés négativement (Figure 1.5) responsables de la fonction et du maintien de la structure de la cellule.<sup>15</sup>

Quant aux membranes des bactéries Gram positifs, celles-ci possèdent plusieurs couches de peptidoglycane séparant la cellule de son environnement extérieur et une membrane cytoplasmique de phospholipides, dépourvue de lipopolysaccharides. Bien que la membrane des bactéries Gram positifs ne contienne pas de lipopolysaccharides, elle possède cependant des acides téichoïques (Figure 1.5) attachés de façon covalente aux peptidoglycane par une liaison disaccharidique ou phosphodiester. Cet acide représente 50 % de la masse de la paroi bactérienne et joue un rôle dans l'intégrité de la structure de la membrane. Le squelette de cette macromolécule est constitué d'une chaîne polymérique de glycérol phosphate de 20 à 40 unités de répétition.<sup>14</sup>

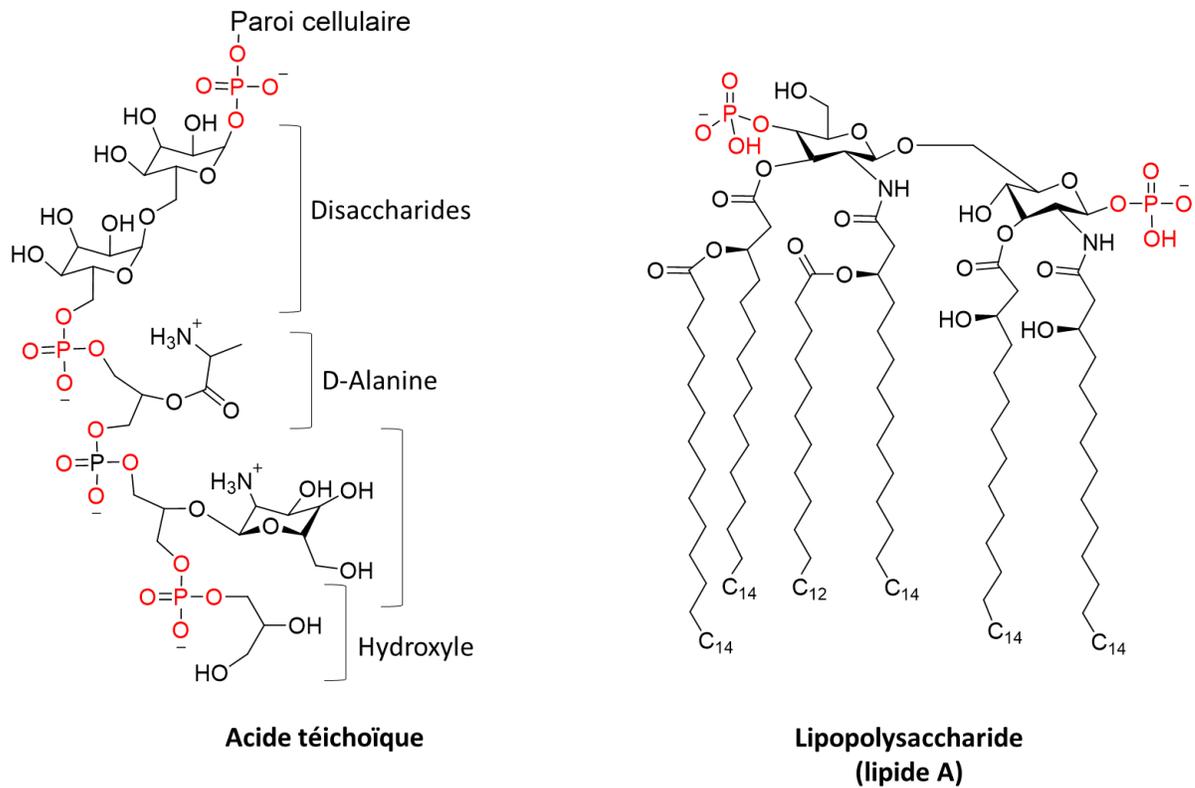


Figure 1.5: Structure de l'acide téichoïque et d'un lipopolysaccharide.<sup>15, 16</sup>

De plus, les bactéries Gram positifs possèdent aussi des acides lipotéichoïques qui ont la même fonction que l'acide téichoïque, où ceux-ci sont composés d'un ancrage glycolipidique qui lie l'acide de façon covalente à la membrane cytoplasmique, ainsi qu'une chaîne polymérique de glycérol phosphate de 20 à 40 unités de répétition.<sup>14</sup>

Par la présence de ces deux acides et des lipopolysaccharides, la membrane des bactéries Gram positifs et négatifs est chargée négativement et sont de fait de très bons candidats pour attirer des composés cationiques.

### 1.3.3 La membrane des levures

Bien que les levures soient des organismes eucaryotes tout comme que les mammifères, les composantes de leur enveloppe cellulaire diffèrent néanmoins de celles-ci, par la présence d'une paroi cellulaire leur conférant une protection supplémentaire. En effet, les levures sont entourées d'une bicouche de phospholipides, d'un espace périplasmique

et d'une paroi externe, absente chez les cellules de mammifères.<sup>17</sup> Cette structure rigide que l'on nomme la paroi cellulaire est d'une épaisseur d'environ 100 à 200 nm et constitue au total près de 25 % de la masse sèche de la cellule. Elle est composée seulement de 4 classes de macromolécules (Figure 1.6), dont les glycoprotéines glycosylées (mannoprotéines), deux types de  $\beta$ -glucane ( $\beta$ -(1,6)-glucane et  $\beta$ -(1,3)-glucane), de chitine et de divers polysaccharides. C'est principalement cette paroi qui permet à la fois de régulariser la forme et la taille de la cellule, ainsi que de contrôler les propriétés osmotiques et la perméabilité de l'enveloppe cellulaire.<sup>18</sup>

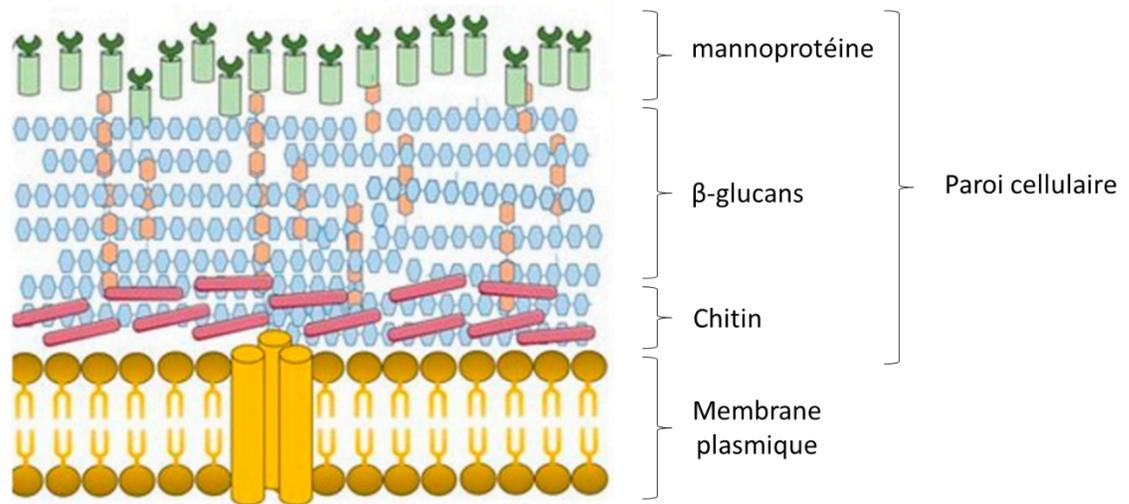


Figure 1.6: Schéma de la structure de la membrane des levures.<sup>18</sup>

Étant donné que la structure de la membrane cellulaire des levures diffère de celle des autres organismes, il serait intéressant dans un premier temps d'exploiter ces particularités afin de développer de nouveaux agents antifongiques plus sélectifs que les composés usuels qui ciblent les composantes de cette paroi. Dans un second temps, puisque la paroi cellulaire contrôle les propriétés osmotiques de la cellule, les perturbateurs membranaires seraient donc des antifongiques intéressants pour provoquer la mort cellulaire, puisqu'une simple fragilisation de cette membrane pourrait mener directement à la lyse de la cellule.<sup>19</sup>

## 1.4 Découverte des antibiotiques et facteurs influençant la résistance aux antibiotiques

Les bactéries pathogènes sont responsables de nombreuses maladies et de décès depuis plusieurs décennies. C'est grâce à la découverte d'agents antibactériens que certaines infections ont pu être complètement éradiquées. Cependant, dans les années où la découverte et le développement des antibiotiques étaient en plein essor, les scientifiques ont découvert que certaines maladies ont refait surface quelques années plus tard. Par exemple, dans les années 1930, lors de la découverte de la pénicilline (Figure 1.7 **(A)**) par Fleming qui a permis de sauver de nombreuses vies humaines<sup>20</sup>, certaines bactéries résistantes à la pénicilline ont été identifiées après seulement 3 ans.<sup>21</sup> Un scénario similaire est survenu quelques années plus tard avec un dérivé de la pénicilline, la méthicilline (Figure 1.7 **(B)**). Près d'un an après la commercialisation de cet antibiotique, les chercheurs ont découvert plusieurs souches bactériennes de type *Staphylococcus aureus* résistantes à celui-ci.<sup>22</sup>

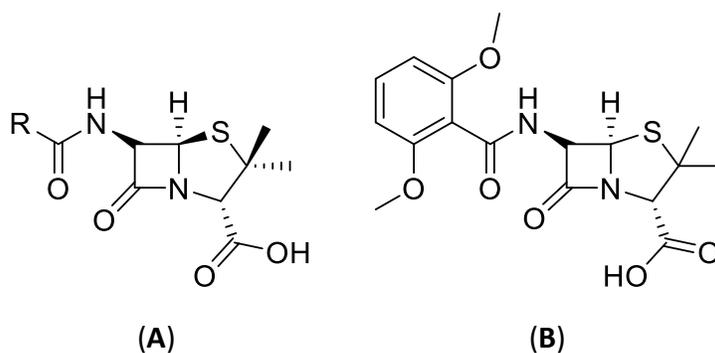


Figure 1.7 : Structure générale des pénicillines **(A)** et de la méthicilline **(B)**.

L'apparition de la résistance bactérienne aux antibiotiques est donc un sujet de plus en plus d'actualité, qui encourage les chercheurs à développer de nouveaux composés, ayant de nouveaux modes d'action. En effet, si les nouveaux composés ciblent les mêmes processus biologiques que les générations précédentes, ceci conduit à

l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes. Un très bon exemple est celui de la vancomycine (Figure 1.8), un glycopeptide qui affecte l'intégrité de la membrane bactérienne et qui est encore utilisé de nos jours.<sup>21</sup> Cet agent, développé dans les années 1950, a été l'une des avancées majeures dans le traitement des infections bactériennes, mais n'a pas été non plus à l'abri du développement de résistances; une trentaine d'années plus tard des souches de bactéries résistantes (les super-bactéries) ont été rapportées, pour lesquelles il n'existe que peu ou pas de traitements.<sup>21,20</sup>

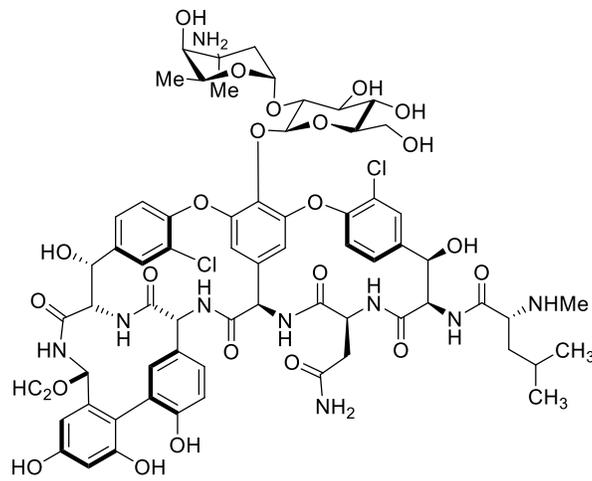


Figure 1.8: Structure de la vancomycine.

La résistance aux antibiotiques est donc devenue un enjeu considérable qui menace de plus en plus la lutte contre les maladies infectieuses. À l'origine, la plupart des bactéries résistantes sont apparues dans les hôpitaux, mais rapidement ces souches sont devenues de plus en plus fréquentes dans l'environnement, en raison de l'utilisation excessive des antibiotiques dans divers domaines, l'industrie agroalimentaire par exemple.<sup>23-25</sup>

Trois facteurs favorisant le développement de cette résistance ont été identifiés : les facteurs comportementaux, environnementaux et politiques. Les facteurs comportementaux individuels comprennent l'utilisation inappropriée d'antibiotiques,

tels que l'automédication ou la prescription abusive, un contrôle inefficace des infections dans les milieux hospitaliers et l'absence de protocoles sanitaires efficaces en cas de pandémie, ainsi que de mauvaises pratiques d'hygiène. Les facteurs politiques et environnementaux comprennent quant à eux l'utilisation excessive des antibiotiques dans la production agricole, le manque de réglementation et le manque d'investissement dans le développement de nouveaux agents antibactériens.<sup>23</sup>

### 1.5 Mécanisme d'action des antibiotiques et mode de résistance des bactéries

Afin de contrer la résistance des bactéries aux antibiotiques, il est important de bien comprendre les différents types de mécanismes d'action des antibiotiques. Il existe 5 types de mécanismes connus (Figure 1.9): l'inhibition de la synthèse de l'ADN et/ou de l'ARN, l'inhibition de la synthèse protéique et membranaire, ainsi que la perméabilisation de la membrane cellulaire.<sup>26</sup> Bien que chacun de ces modes d'action soit généralement efficace, les bactéries ont tout de même la capacité de contrer ces mécanismes via différents systèmes de défense. En effet, elles peuvent soit produire des enzymes inhibitrices, qui inactiveront l'antibiotique, soit modifier la cible des antibiotiques, la rendant insensible à la présence de celui-ci, soit utiliser des pompes à efflux afin d'expulser l'antibiotique à l'extérieur de la cellule et finalement, elles peuvent imperméabiliser leur membrane.<sup>27, 28</sup>

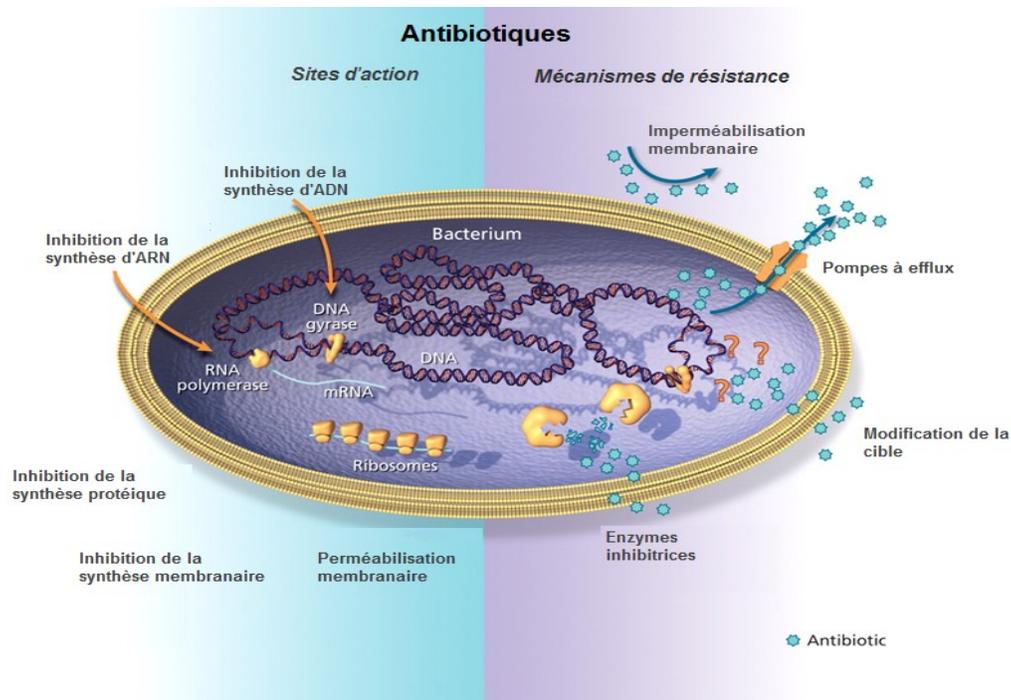


Figure 1.9 : Mécanismes de résistance des bactéries.

### 1.5.1 Inhibition de la synthèse d'ADN

Tout d'abord, le mécanisme d'action par l'inhibition de la synthèse de l'ADN concerne tout particulièrement les antibiotiques de la famille des quinolones et des fluoroquinolones.<sup>26, 29, 30</sup> Depuis maintenant plusieurs décennies, cette classe de molécules est utilisée dans plusieurs études physiologiques telles que l'inhibition de la synthèse d'ADN, comme mentionné précédemment, mais aussi comme sonde, afin d'étudier l'interaction topoisomérase-ADN lors de la réplication.<sup>31</sup> La première génération de cette famille d'antibiotique est constituée d'acide nalidixique (Figure 1.10), découvert dans les années 1960 comme un sous-produit de la synthèse des chloroquines.<sup>30</sup> Une dizaine d'années plus tard, l'acide nalidixique est remplacé par l'acide oxolinique, dû à son activité beaucoup plus accrue. Aujourd'hui, cette première génération de quinolones est rarement utilisée en raison de leur grande toxicité sur les cellules saines. La deuxième génération de cette classe de composés est arrivée dans les années 1980 avec par exemple, la norfloxacine et la ciprofloxacine qui sont des

quinolones fluorées en position C6 que l'on appelle les fluoroquinolones (Figure 1.10). La troisième et la quatrième génération sont quant à eux des analogues de la deuxième génération où certaines fonctions ont été modifiées et ajoutées dans le but d'accroître l'activité sur les bactéries Gram positifs.<sup>30, 32</sup>

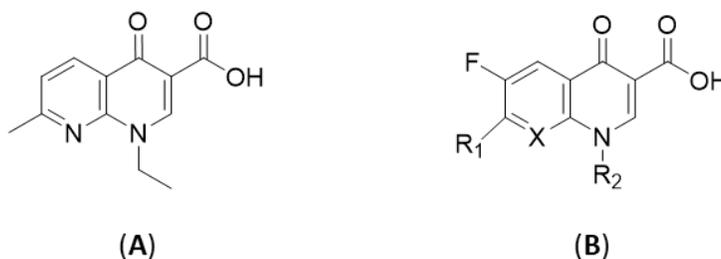


Figure 1.10 : Structure de l'acide nalidixique (A) et de la forme générale d'une fluoroquinolone (B).

Les quinolones et les fluoroquinolones sont connues pour cibler le complexe ADN-topoisomérase II et IV, où ceux-ci catalysent la rupture et la formation de la double hélice des brins chromosomiques nécessaire à la réplication de l'ADN, à la transcription de l'ARN et à la division cellulaire.<sup>33</sup> En effet, la synthèse de l'ADN chez les cellules procaryotes est contrôlée par trois enzymes, soit l'ADN gyrase ou topoisomérase II qui engendre le superenroulement négatif des brins d'ADN, l'ADN topoisomérase I qui empêche l'accumulation excessive du repliement de l'ADN et la topoisomérase IV qui permet de séparer les deux brins d'ADN mère lors de la réplication.<sup>34</sup> Ici, les topoisomérases II et IV sont connues pour avoir des fonctionnalités similaires au niveau de la réplication de l'ADN. Cependant, dépendamment de la souche de bactéries, soit les Gram négatifs ou positifs, les quinolones agissent différemment sur ces deux organismes. Dans les Gram négatifs comme chez les *E. coli*, les quinolones ciblent principalement les topoisomérases II, alors que chez les Gram positifs comme chez les *S. aureus*, elles ciblent principalement les topoisomérases IV.<sup>32</sup> La capacité des quinolones à tuer les bactéries est le résultat de la formation d'un complexe stable quinolone-topoisomérase-ADN (Figure 1.11) à la

fourche de la réplication, bloquant ainsi la séparation des brins nécessaire à sa réplication. De plus, ce complexe provoque la rupture de la double hélice de l'ADN, menant ainsi à la bactériostase et à la mort cellulaire.<sup>26, 35</sup>

Bien que l'enzyme topoisomérase II soit présente autant chez les cellules procaryotes et eucaryotes, les quinolones sont cependant très spécifiques à la topoisomérase II qui se trouve dans les bactéries. Cette spécificité est attribuée à la présence de certaines acides aminées (sérines et certains résidus acides) qui interagissent avec les quinolones chez les bactéries, mais qui sont absentes chez les cellules humaines.<sup>36</sup>

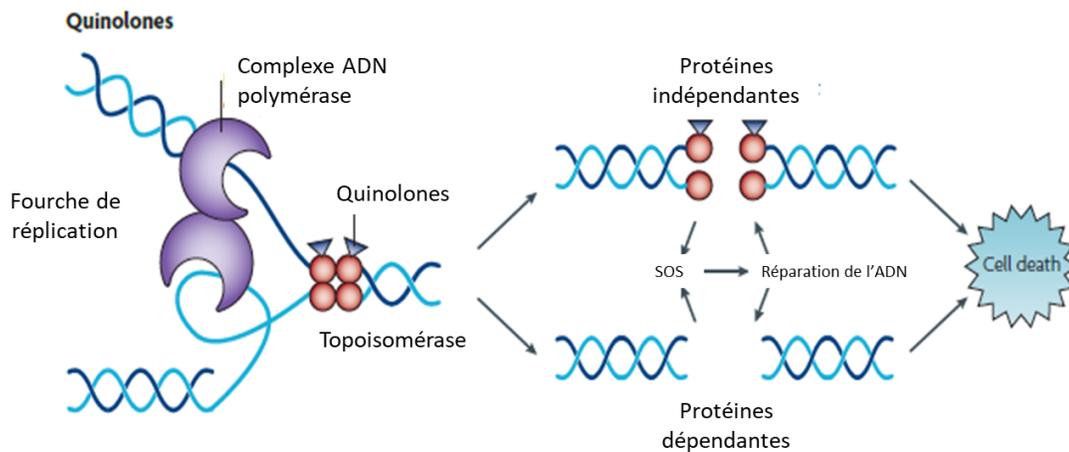


Figure 1.11 : Schéma du mécanisme d'inhibition de l'ADN gyrase (ou topoisomérase).<sup>26</sup>

L'utilisation excessive de ces antibiotiques a mené à l'apparition de plusieurs types de résistances chez les bactéries. En effet, elles ont développé soit des mutations au niveau des enzymes topoisomérase II et IV, qui altèrent la cible de l'antibiotique, soit en surexprimant des pompes à efflux qui réduisent l'accumulation du médicament en l'excrétant hors de la cellule, soit en accumulant la des plasmides supplémentaires qui protègent les cellules de la mort cellulaire.<sup>37, 38</sup>

### 1.5.2 Inhibition de la synthèse d'ARN

L'inhibition de la synthèse de l'ARN, tout comme l'inhibition de la synthèse de l'ADN a un effet délétère sur le métabolisme des acides nucléiques des bactéries, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle pour induire la mort cellulaire. En effet, la famille d'antibiotiques responsable de cette inhibition est la famille des ansamycines, mais plus particulièrement la rifamycine (Figure 1.12), un composé naturel ou semi-synthétique produit et isolé de la bactérie *Amycolatopsis mediterranei* (*A. mediterranei*) dans les années 1950.<sup>26, 39</sup>

La rifamycine est connue pour se lier fortement à l'ARN polymérase (ARNp), l'enzyme responsable de la transcription de l'ADN à l'ARN. En fait, elle se lie à la sous-unité  $\beta$  de l'ARNp située dans le canal formé par le complexe ARNp-ADN par la formation de ponts hydrogène entre les groupements hydroxyles de la molécule et les chaînes latérales des acides aminés de la protéine.<sup>40</sup> Ainsi, une fois que la molécule est liée au complexe, celle-ci inhibe la transcription par occlusion stérique. De plus, certaines études ont pu montrer que la rifamycine B n'agit pas sur la protéine responsable de l'élongation du brin d'ARN, mais seulement sur l'initiation de la synthèse de l'ARN effectuée par l'ARNp. C'est-à-dire, lorsque la transcription a progressé au-delà de 2 à 3 ribonucléotides, elle continue de progresser normalement et aucune inhibition n'est observée.<sup>26, 41, 42</sup>

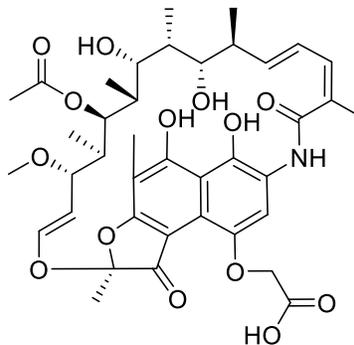


Figure 1.12 : Structure de la rifamycin B.

La rifamycine est aussi connue pour agir différemment d'une souche de bactéries à une autre. Effectivement, sur les bactéries Gram positifs, elle est considérée comme un agent bactéricide, ce qui veut dire qu'elle induit la mort cellulaire. Alors que chez les bactéries Gram négatifs, elle ne fait qu'inhiber la prolifération bactérienne (agent bactériostatique). Cette différence d'activité n'est pas attribuée à l'affinité de la sous-unité  $\beta$  de l'ARNp avec l'antibiotique, mais plutôt à une capacité d'absorption réduite du médicament des Gram négatifs, en raison de la plus grande complexité de la structure membranaire.<sup>26, 42</sup> De plus, comme l'ARNp est présente autant dans les cellules eucaryotes que procaryotes, la divergence entre la séquence des acides aminés de ces enzymes permet à la rifamycine de se lier spécifiquement aux ARNp des cellules procaryotes. En d'autres mots, les inhibiteurs actifs sur l'ARNp des cellules bactériennes ne sont pas actifs sur les ARNp des cellules humaines.<sup>43</sup>

Cet antibiotique a été largement utilisé comme antibactérien à large spectre dans les années 1960, cependant son utilisation a été ensuite limitée à la thérapie anti-tuberculose à cause du développement d'une certaine résistance. En effet, comme mentionné précédemment, les bactéries ont la capacité d'introduire des mutations dans leur code génétique permettant d'altérer l'activité d'un antibiotique. Dans ce cas-ci, c'est la présence d'une mutation dans le gène codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARNp qui permet de diminuer son affinité avec la rifamycine et donc de réduire son activité antibactérienne.<sup>40, 42</sup>

### 1.5.3 Inhibition de la synthèse des protéines

La synthèse des protéines est effectuée par le mécanisme de traduction de l'ARN messager (ARNm) par les ribosomes. Elle se réalise en trois grandes étapes soit : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Cette séquence d'événements qui permet la formation d'une protéine nécessite la présence de deux sous-unités ribonucléoprotéiques soit, les 50s et 30s qui lors de leur assemblage sur l'ARNm forme l'ARN ribosomique (ARNr), un ARN de transfert (ARNt) et plusieurs facteurs d'initiation.<sup>26</sup> Ainsi, puisque la synthèse des protéines implique plusieurs unités protéiques, les

médicaments qui inhibent cette synthèse sont parmi la plus grande classe d'antibiotiques. Cette famille peut être divisée en deux sous-classes : les inhibiteurs de la sous-unité 50s qui est responsable de l'élongation de la chaîne protéique et les inhibiteurs de la sous-unité 30s qui est impliquée dans l'initiation de la chaîne. Parmi les inhibiteurs des ribosomes 50s, on compte les macrolides, les lincosamides, les streptogramines, les amphénicols et les oxazolidinones. Ces inhibiteurs peuvent agir soit en bloquant l'initiation de la traduction ou en bloquant, par occlusion stérique, la translocation des ARNt qui permet l'élongation de la chaîne peptidique naissante. Pour ce qui est des inhibiteurs de la sous-unité 30s, ceux-ci comprennent les tétracyclines et les aminocyclitols. Les tétracyclines agissent en bloquant l'accès des ARNt au ribosome, alors que les aminocyclitols, tel que les spectinomycines et les aminoglycosides (par exemple, la streptomycine et la kanamycine) se lient au ribosome et induisent des erreurs de traduction.<sup>26, 44, 45</sup>

D'autre part, malgré des différences importantes dans la structure et dans la séquence des sous-unités ribosomiques des procaryotes et des eucaryotes, qui permettent aux antibiotiques d'être sélectif aux ribosomes bactériens, la mutation d'un seul acide aminé ou d'un nucléotide peut entraîner une répercussion directe sur la spécificité de ceux-ci. Ainsi, une analyse approfondie des mutations de résistance des bactéries est nécessaire afin de déterminer si les ribosomes des cellules procaryotes seront sélectifs à un type de médicament.<sup>46</sup>

Ainsi, comme mentionné précédemment, les bactéries ont tendance à développer naturellement des résistances contre les agents antibactériens. Dans ce cas-ci, pour contrer l'activité des inhibiteurs de la synthèse des protéines, les bactéries ont développé des mutations au niveau des sous-unités 30s et 50s qui permettent de réduire leur affinité avec ces antibiotiques et donc d'en diminuer leur activité.<sup>45, 47</sup>

#### 1.5.4 Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire

La bactérie est entourée d'une membrane cellulaire permettant de délimiter son environnement intérieur de son environnement extérieur. Bien que cette structure agît comme barrière protectrice, elle est cependant semi-perméable à certaines composantes nécessaires à la survie de la cellule. Elle est majoritairement constituée d'une bicouche lipidique à caractère amphiphile contenant des phospholipides, des glycolipides, des protéines et du cholestérol qui peuvent constamment se modifier dépendamment des stimuli externes.<sup>48</sup> Ainsi, puisque cette composante de la cellule est l'une des plus importantes pour la survie de la bactérie, il est intéressant de développer des agents antibactériens pouvant inhiber ou suspendre la synthèse de la membrane cellulaire.<sup>4</sup>

La famille des  $\beta$ -lactames et des glycopeptides fait partie des antibiotiques qui inhibent des étapes spécifiques de la biosynthèse de la paroi cellulaire. En effet, les  $\beta$ -lactamines, telles que les pénicillines, les carbapénèmes et les céphalosporines sont connues pour inhiber l'étape de la synthèse des peptidoglycanes, une composante structurelle importante de la paroi cellulaire des bactéries. Comme la composition de la membrane des cellules eucaryotes ne présente pas de peptidoglycanes, les  $\beta$ -lactames et les glycopeptides sont par le fait même très spécifiques aux cellules bactériennes.<sup>49, 50, 51</sup>

Les peptidoglycanes sont des polymères composés de longues chaînes linéaires de polysaccharides formées d'acide *N*-acétylglucosamine et d'acide *N*-acétylmuramique qui entourent généralement la membrane plasmique et qui sont réticulées entre eux par de courts peptides. Bien que la synthèse des peptidoglycanes se réalise en plusieurs étapes, Tipper and Strominger ont montré dans les années 1965 que la cible des  $\beta$ -lactamines était au niveau de l'étape de la réticulation.<sup>49</sup> En effet, en raison de la ressemblance structurale (Figure 1.13 (en rouge)) entre le substrat naturel de la transpeptidase (acyl-*D*-Ala-*D*-Ala), une enzyme bactérienne responsable de la réticulation, et le carbapénème (noyaux  $\beta$ -lactame) par exemple, cette dernière inhibe la synthèse des peptidoglycanes en se liant fortement au site actif de l'enzyme.<sup>50</sup> Ainsi, lorsque la cellule est exposée à ce type d'antibiotiques, le changement de composition membranaire résultant entraîne des

changements de forme, de taille et de rigidité de la paroi cellulaire, ce qui induit un stress et conduit finalement à la lyse de la cellule.<sup>52-53</sup>

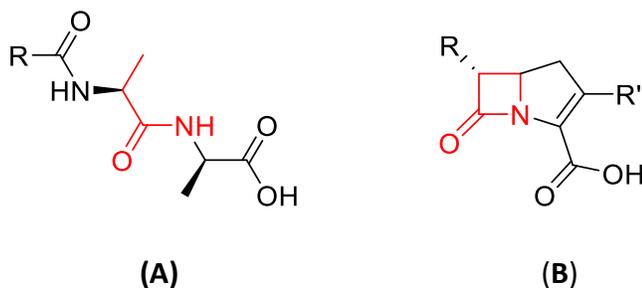


Figure 1.13 : Structure terminale d'un peptidoglycane (acyl-D-Ala-D-Ala) (A) et structure de la forme générale d'un carbapénème (B).

Cependant, les bactéries telles que les *S. aureus* sont reconnues comme étant résistantes aux  $\beta$ -lactamines. En effet, des mutations au niveau de leur code génétique ont permis une surexpression des enzymes de type  $\beta$ -lactamase, aussi présentes dans les cellules eucaryotes, limitant considérablement son activité antibactérienne.<sup>50, 51</sup>

#### 1.5.5 Inhibition bactérienne via des perturbateurs membranaires

La majorité des antibiotiques actuellement utilisés sur le marché sont principalement connus pour leur capacité à inhiber ou tuer les cellules en croissance. Cependant, les infections bactériennes persistantes, impliquant généralement des bactéries en croissance lente ou en dormance sont beaucoup plus difficiles à traiter en ciblant les processus de biosynthèse (inhibition de la synthèse protéique, membranaire, d'ARN ou d'ADN).<sup>54, 55</sup>

Lors d'un stress environnemental, les bactéries ont la capacité de se mettre en mode « survie », elles peuvent ralentir ou arrêter temporairement leur développement ou leur division cellulaire afin de conserver leur énergie latente. C'est ce qu'on appelle la croissance lente ou la dormance.<sup>56</sup> Si les bactéries sont en dormance et qu'elles n'ont que peu ou pas d'activités de synthèse de la paroi cellulaire, de traduction ou de

topoisomérase, alors les antibiotiques agiront sur leurs cibles, mais seront incapables de les dénaturer. De cette façon, la tolérance aux antibiotiques de ces bactéries persistantes pourrait empêcher la destruction des cibles cellulaires, mais au prix de la non-prolifération.<sup>54</sup>

Contrairement aux agents antibactériens mentionnés précédemment, pouvant être contrés par un mécanisme de résistance, la perméabilisation membranaire est généralement un processus rapide et irréversible, permettant la destruction totale de la bactérie, incluant les bactéries en dormance.<sup>57</sup> Ce type de mécanisme d'action implique l'utilisation des molécules amphiphiles cationiques qui peuvent interagir directement avec la bicouche lipidique en formant des pores, via des agrégats, des canaux ou des micelles (Figure 1.14), menant à la mort rapide de toutes les cellules, quel que soit l'état dans lequel se trouve la bactérie.<sup>57, 58</sup> En effet, comme la structure de la membrane bactérienne comprend une partie hydrophobe non polaire et une tête hydrophile chargée négativement, la partie cationique et la partie non polaire des perturbateurs membranaires peuvent interagir par des interactions électrostatiques et hydrophobes perturbant ainsi l'intégrité de la membrane cellulaire.<sup>55, 57</sup>

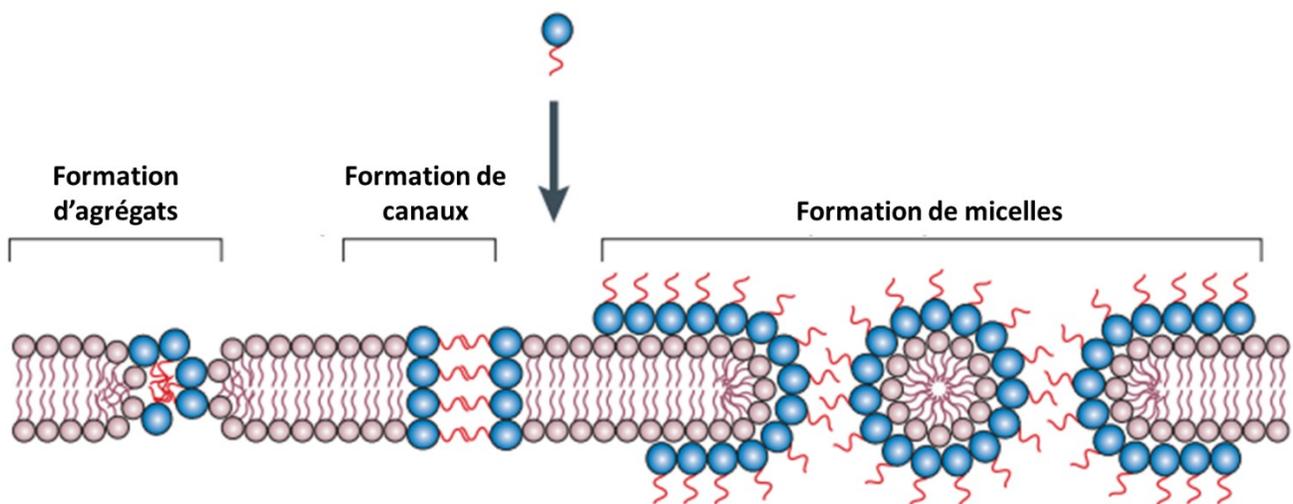


Figure 1.14 : Interactions d'un perturbateur membranaire avec la bicouche lipidique.<sup>58</sup>

Un exemple de perturbateur membranaire est la daptomycine, un peptide antimicrobien utilisé contre les souches de *S. aureus* résistants à la méthicilline (*MRSA*), les entérocoques résistants à la vancomycine (*VRE*) et d'autres souches Gram positifs. Ce type d'antibiotique est connu pour se lier spécifiquement à l'acide lipotéichoïque, une composante présente seulement dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram positifs, ce qui en fait un composé sélectif qu'à ce type d'organisme.<sup>59</sup> Cependant, bien que cet d'antibiotiques soit efficace, certaines résistances ont pu être observées à la suite de leur commercialisation, mais reste plutôt rare.<sup>60-61</sup>

## 1.6 Les biofilms

### 1.6.1 La formation de biofilms

Parmi les nombreux mécanismes de résistance développés par les bactéries au fil des années face aux antibiotiques, la formation des biofilms sera particulièrement ciblée lors de cette étude. En effet, depuis le début de la vie sur terre, il a été prouvé que les bactéries à l'état naturel sont capables de vivre librement ou en communauté.<sup>62</sup> Cependant depuis seulement les 50 dernières années, les scientifiques se sont intéressés à la présence d'agrégats de bactéries enveloppés d'une matrice extracellulaire, ce qu'on appelle aujourd'hui le biofilm.<sup>63</sup>

Comme mentionné précédemment, les bactéries peuvent se retrouver dans deux états différents : soit à l'état planctonique, c'est-à-dire qu'elles sont libres en solution, soit sous forme de biofilm, où elles vivent en communauté, protégées par une matrice. Contrairement à l'état planctonique, comme c'est le cas des bactéries présentes dans la salive, les biofilms ont depuis été signalés comme étant prédominants dans presque tous les environnements naturels et industriels, ainsi que dans tous les organismes supérieurs.<sup>62, 64</sup> Elles sont présentes dans plusieurs espèces vivantes telles que les plantes, les animaux et les humains, qui sont tous colonisés par des bactéries sous forme de biofilms.<sup>65</sup> Les biofilms sont généralement associés à plusieurs maladies dont, les

infections des implants chirurgicaux, les maladies des gencives (la gingivite), l'infection des voies urinaires, des poumons et dans certaines maladies intestinales.<sup>62,64</sup> On retrouve aussi les biofilms dans les conduits d'eau qui mènent, dans la plupart des cas, à la détérioration de la qualité de l'eau potable et à la corrosion microbienne.<sup>63</sup> Bien qu'ils soient généralement perçus comme étant nocifs pour la santé, leurs utilisations dans plusieurs applications biotechnologiques, dont la filtration d'eau potable, la dégradation des contaminants dans les eaux usées ou des déchets solides est cependant avantageuse.<sup>65</sup>

Les biofilms sont des agrégats de bactéries protégées par une matrice extracellulaire qui peuvent s'attacher soit à une surface biotique/vivante, telle que les intestins, ou sur une surface abiotique/non-vivante, par exemple, les instruments chirurgicaux.<sup>66</sup> La formation de ce film protecteur est un processus dynamique complexe permettant de maintenir l'homéostasie des microorganismes face aux conditions fluctuantes de l'environnement extérieur dont, les températures extrêmes, les changements de pH, l'exposition à la lumière ultraviolette et aux antibiotiques, ainsi que plusieurs autres facteurs.<sup>63</sup>

En plus de protéger les microorganismes de l'environnement extérieur, cette matrice assure une communication étroite entre les cellules (détection du quorum, QS), tout en stabilisant les conditions de croissance et de développement des bactéries qui y se trouvent.<sup>67</sup> En effet, elle permet l'échange par exemple de nutriments entre les cellules, de molécules de signalisation, de matériel génétique ainsi que de procurer une localisation de l'activité enzymatique comme celle de la  $\beta$ -lactamase extracellulaire présente dans la matrice.<sup>63</sup>

### 1.6.2 Composition d'un biofilm

Cet écosystème tridimensionnel organisé est composé de plusieurs couches protectrices ayant une densité cellulaire très élevée, allant de  $10^8$  à  $10^{11}$  bactéries par gramme de masse humide. Elle est principalement composée d'eau, d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques.<sup>65</sup> De part cette protection, les

bactéries présentes dans le biofilm montrent une résistance accrue aux antibiotiques courants, comparativement aux bactéries planctoniques.<sup>68</sup> Cette résistance peut d'ailleurs être diminuée par l'utilisation de perturbateurs de la matrice des biofilms et des membranes bactériennes.<sup>67, 69</sup>

### 1.6.3 Cycle de formation des biofilms

Le mécanisme de formation des biofilms bactériens peut être expliqué par la séquence de cinq évènements distincts se répétant en un cycle continu (Figure 1.15). Ces cinq évènements sont l'adhésion et l'attachement des bactéries à une surface, la prolifération cellulaire, la formation et la maturation du biofilm et finalement la dispersion des bactéries.<sup>70</sup>

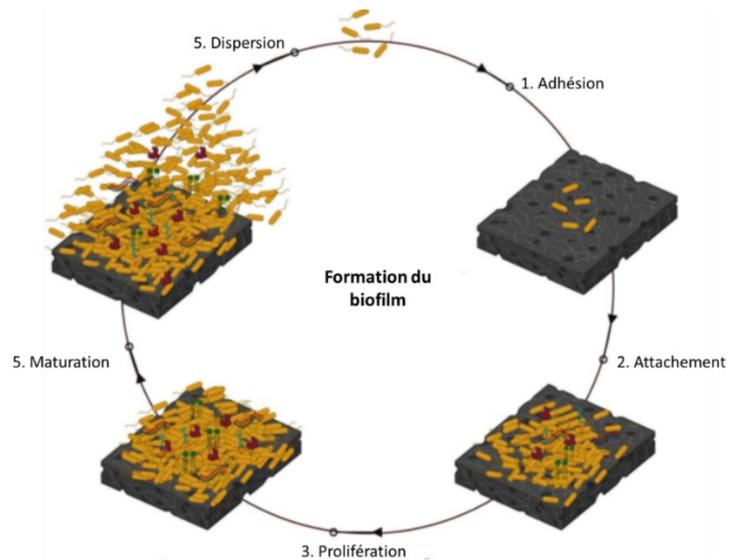


Figure 1.15 : Étape du développement des biofilms.<sup>70</sup>

Le développement et la composition du biofilm peuvent varier légèrement dépendamment de la souche de bactérie, de la force de cisaillement à laquelle le biofilm est exposé, de la disponibilité des substrats et de l'environnement dans lequel les bactéries se retrouvent. Son processus est généralement déclenché par un stress

environnemental (un manque de nutriment) par lequel les bactéries répondent en changeant l'expression de leur code génétique afin de se protéger. Une fois le biofilm formé, il est très difficile à éradiquer par les techniques classiques, c'est-à-dire par l'utilisation d'antibiotiques et de savon universel.<sup>65</sup>

Lors de la première étape de la formation du biofilm, les cellules planctoniques individuelles migrent et adhèrent de façon réversible à une surface biotique ou abiotique en utilisant leurs flagelles ou d'autres composantes situées à la surface de la membrane telles que des molécules d'adhésine. Pour que les bactéries ciblent cette surface, il faut que celle-ci soit propice à leur croissance et à leur développement afin de favoriser la formation du biofilm.<sup>63, 66</sup>

Lors de la deuxième étape, les bactéries adhérentes et commencent à produire des substances polymériques extracellulaires (SPE) composées de polysaccharides et de glycoprotéines leur permettant de se fixer de manière irréversible. Cette substance permet aussi l'agrégation d'autres cellules bactériennes et la formation de la matrice extracellulaire.<sup>68, 71</sup>

Au troisième stade, les bactéries commencent à se reproduire et à former des microcolonies afin de remplir tous les espaces libres et de former un seul biofilm. De plus, comme la structure du biofilm n'est pas une simple monocouche homogène, mais plutôt un système à plusieurs couches hétérogènes, la formation de canaux d'eau favorise le transport des nutriments essentiels et de l'oxygène vers les cellules qui se développent dans le biofilm.<sup>71</sup>

Au stade où la prolifération des bactéries atteint un certain niveau, les biofilms sont connus pour contrôler la densité de leur population à travers un mécanisme de signalisation de cellule à cellule connu sous le nom de détection du quorum (QS).<sup>66</sup> Ce processus permet entre autres au biofilm de se comporter comme un organisme multicellulaire, permettant ainsi à la communauté bactérienne de s'adapter aux conditions environnementales changeantes. Ce mécanisme de communication permet la formation du biofilm et le contrôle de la densité cellulaire est régulé par de petites

molécules de signalisation ou auto-inductrices. Ces auto-inducteurs sont constamment produits par les bactéries et donc, lorsque la densité cellulaire augmente, le niveau d'auto-inducteurs augmente également, jusqu'à atteindre un seuil critique nommé le niveau de quorum. À ce stade, les auto-inducteurs entraînent l'activation ou l'inhibition de certains gènes afin de maintenir la taille du biofilm et les phénotypes de virulence. Ce processus permet non seulement la communication entre les cellules, mais également de favoriser la propagation des mutations bénéfiques qui contribuent à la résistance aux antibiotiques.<sup>67</sup>

Finalement, au fur et à mesure que le biofilm croît, les micro-organismes qui se trouvent dans les couches internes du biofilm peuvent ne pas avoir accès aux nutriments ou peuvent être en contact direct avec une accumulation de déchets toxiques.<sup>65</sup> Ainsi, le microenvironnement dans lequel les bactéries résident devient désavantageux et donc elles répondent à ces conditions défavorables en retournant sous leur forme planctonique afin de coloniser d'autres surfaces propices à leur croissance. C'est ce qu'on appelle la dispersion. Ce processus peut être déclenché par la dégradation d'enzymes endogènes, ou par la libération d'SPE ou de protéines de liaison à la surface ou encore par la production de protéines permettant la dissolution locale de la matrice.<sup>66</sup>

Ainsi, dans le but de développer de nouveaux agents antimicrobiens, il est intéressant d'étudier les différents composés déjà connus qui sont actifs envers les organismes pathogènes.

## 1.7 Les composés cationiques comme perturbateurs membranaires

### 1.7.1 Les ammoniums quaternaires

Les composés de type ammonium quaternaire (QACs) font partie des classes de biocides, d'antimicrobiens et des désinfectants les plus couramment utilisés en raison de leur activité à large spectre. Ils sont retrouvés dans le domaine de l'industrie alimentaire, dans l'agriculture et dans le milieu hospitalier, afin de limiter la propagation dans

l'environnement des micro-organismes pathogènes, tels que les bactéries, les levures et les virus.<sup>72</sup>

Les QACs sont en fait des composés amphiphiles qui ciblent les parois des levures et les membranes des cellules bactériennes par le biais d'interactions électrostatiques entre leurs charges positives et les charges négatives des composantes de la membrane cytoplasmique discutée précédemment.<sup>73</sup> De plus, en se liant aux membranes, les chaînes latérales des QACs peuvent s'insérer dans la région intramembranaire par des interactions hydrophobes, perturbant ainsi la structure de la membrane et créant des fuites du contenu cellulaire qui pourront éventuellement provoquer la mort de la cellule.<sup>73-75</sup>

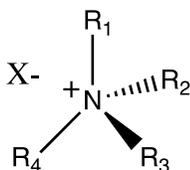


Figure 1.16 : Structure générale d'un sel d'ammonium quaternaire.

Les QACs contiennent un atome d'azote quaternaire chargé positivement et au maximum quatre substituants (Figure 1.16). Les composés contenant des QACs peuvent contenir un, deux ou plusieurs atomes d'azote chargés, y compris des composés hétérocycliques tels que les pyridines et les imidazoles, par exemple. La plupart des substituants sont généralement de longues chaînes aliphatiques.

Dans le cas des bis-QACs, des multi-QACs et des poly-QACs, la structure qui relie les atomes d'azote chargés est appelée espaceur, et les chaînes alkyles qui s'étendent à partir des têtes (QACS) sont appelées queues hydrophobes (Figure 1.17). Les QACs sont généralement stables et solubles dans l'eau. De plus, la majorité de ces composés contiennent un halogène, soit un chlorure ou un bromure comme anions qui n'affecte

généralement pas l'activité biologique, mais a souvent un impact sur la solubilité de l'agent antibactérien.<sup>72</sup>

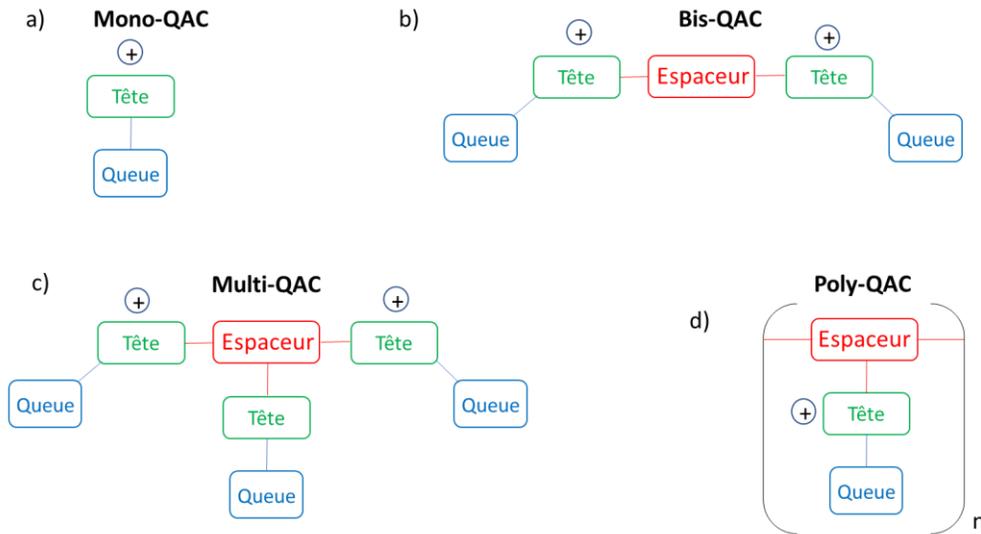


Figure 1.17 : Forme générale des différents composés contenant des ammoniums quaternaire (QACs).<sup>72</sup>

Un très bon exemple de mono-QACS sont les chlorures de benzalkonium (BACs) dans lesquels les différentes chaînes alkyles ont un effet direct sur l'activité antimicrobienne (Figure 1.18). En effet, ils sont généralement commercialisés sous la forme d'un mélange de composés dont la chaîne alkyle peut varier de 8 à 18 atomes de carbone, avec une activité biocide plus élevée pour les dérivés contenant des chaînes à 12 et 14 atomes de carbone. On retrouve les BACs dans plusieurs produits de commercialisation, dont les cosmétiques, les produits agricoles, les détergents à lessive et plusieurs autres.<sup>76</sup> Par leurs fortes utilisations, les BACs sont retrouvés en grande quantité dans l'environnement, menant ainsi à l'émergence de bactéries résistantes pouvant former des biofilms.<sup>72</sup>

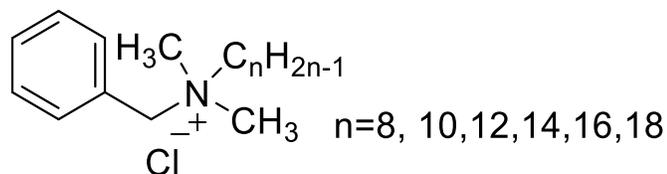


Figure 1.18 : Structure générale d'un chlorure de benzalkonium.

Plus récemment, certaines études ont démontré que la présence d'une double charge cationique espacée par une chaîne aliphatique variable, ainsi que la présence de deux queues hydrophobes augmenteraient l'activité antimicrobienne des QACs.<sup>72</sup> En effet, la double charge cationique des bis-QACs augmenterait l'efficacité de la liaison des molécules aux surfaces chargées négativement et les espaceurs et les substituants faciliterait leur insertion dans les membranes bactériennes. Ainsi, comparé au mono-QACs, l'effet biologique des bis-QACs sur les bactéries pathogènes est multiplié par trois ou quatre fois, tout particulièrement pour les souches Gram négatifs. De plus, l'ajout d'une deuxième longue chaîne aliphatique augmenterait l'activité biologique contre *S. aureus* jusqu'à 8 fois, mais augmenterait aussi la toxicité envers les globules rouges.<sup>72</sup>

De ce fait, la diversité structurale des QACs et leur activité sur les organismes pathogènes ont été prises en compte pour la conception des agents antibactériens présentés dans ce mémoire.

### 1.7.2 Les composés de type imidazole et benzimidazole

Les imidazoles et les benzimidazoles sont deux classes importantes de composés hétérocycliques azotés activement utilisés dans le domaine de la médecine et de l'industrie pharmaceutique. En effet, ils ont une activité biologique sur plusieurs souches microbiennes telles que les bactéries, les levures, les virus et les parasites.<sup>77</sup>

Ces composés ont fait l'objet d'étude pendant plus de 100 ans, lorsque des chercheurs ont découvert que leur structure était présente dans plusieurs molécules naturelles, dont l'histidine, un acide aminé essentiel, ainsi que dans celle des acides

nucléiques des purines (adénine, guanine).<sup>78</sup> Ils ont aussi découvert en 1955 que le 5,6-diméthylbenzimidazole, un dérivé du benzimidazole, faisait partie de la structure de la vitamine B12 (Figure 1.19). De ce fait, les scientifiques ont réalisé que les composés à base d'imidazole et de benzimidazole sont à la fois biocompatibles pour les humains et les animaux et efficaces pour inhiber la croissance des bactéries. En effet, en raison de leur similitude structurale avec les purines, où ceux-ci sont bien connus pour jouer un rôle important dans la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines de la paroi cellulaire bactérienne, il a été montré que les benzimidazoles pouvaient être utilisés comme agents antibactériens en tant qu'inhibiteurs compétitifs pouvant remplacer les purines et ainsi inhiber ou tuer les bactéries en croissance.<sup>79</sup>

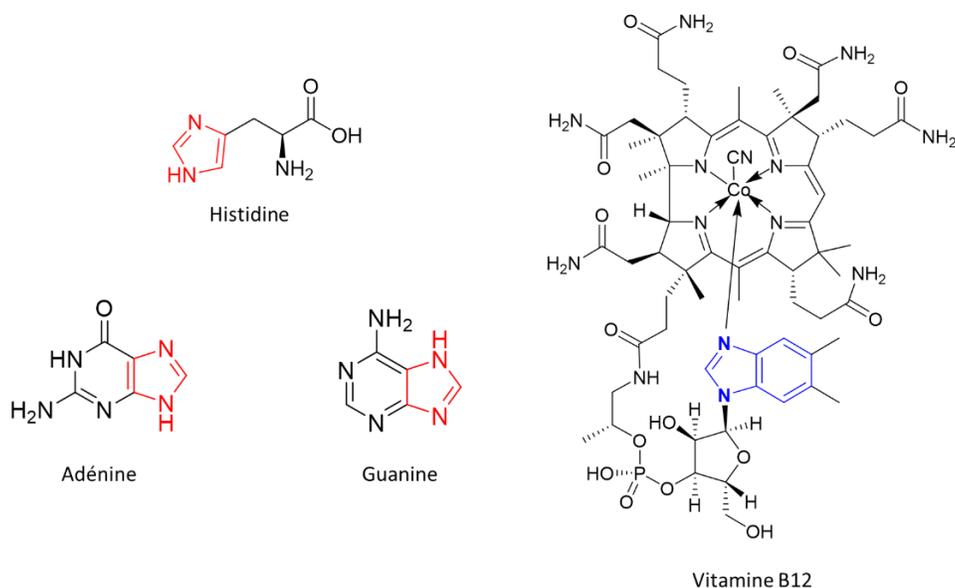


Figure 1.19 : Différents composés naturels comportant un noyaux imidazole (rouge) et benzimidazole (bleu).

Les agents antifongiques de type imidazole sont quant à eux les plus utilisés dans le milieu hospitalier dû à leur activité à large spectre. Leur mécanisme d'action principal est d'inhiber la voie de biosynthèse de l'ergostérol, une composante importante de la membrane cellulaire des levures, à partir de lanostérol. La principale cible moléculaire

des antifongiques azolés est le cytochrome P450, une enzyme qui catalyse l'élimination oxydative du 14 $\alpha$ -méthyle situé sur lanostérol par une mono-oxygénase. Cette enzyme contient un cofacteur hème situé sur son site actif où les atomes d'azote du cycle imidazole entre en compétition avec l'oxygène pour ce site de liaison inhibant ainsi son activité. L'appauvrissement en ergostérol et l'accumulation de stérols méthylés qui en résultent entraînent ainsi une altération d'un certain nombre de fonctions associées à la membrane qui mènera éventuellement à la mort cellulaire.<sup>80</sup>

Parmi les différents agents antifongiques azolés, le miconazole est l'un des médicaments le plus utilisé pour le traitement des infections au *C. albicans* et à certaines souches de bactéries Gram positifs tels que les *S. aureus*. Cependant, en raison de sa faible absorption systémique, son utilisation est limitée à des infections locales et superficielles, telles que les infections vaginales, buccales et de la peau.<sup>81</sup>

Plus récemment, les agents antifongiques systémiques se sont considérablement multipliés grâce au développement clinique des triazoles de première génération, tels que le fluconazole et l'itraconazole (Figure 1.20). En effet, ces composés triazolés sont largement utilisés pour le traitement d'une variété d'infections fongiques. Bien qu'ils soient efficaces et qu'ils aient leur place dans la thérapie contre les infections aux levures, il y a cependant des limites quant à leur utilisation. Par exemple, le fluconazole n'est pas efficace dans le traitement des infections au *Aspergillus sp* et des biofilms et présente une activité limitée contre les *C. albicans*.<sup>82</sup>

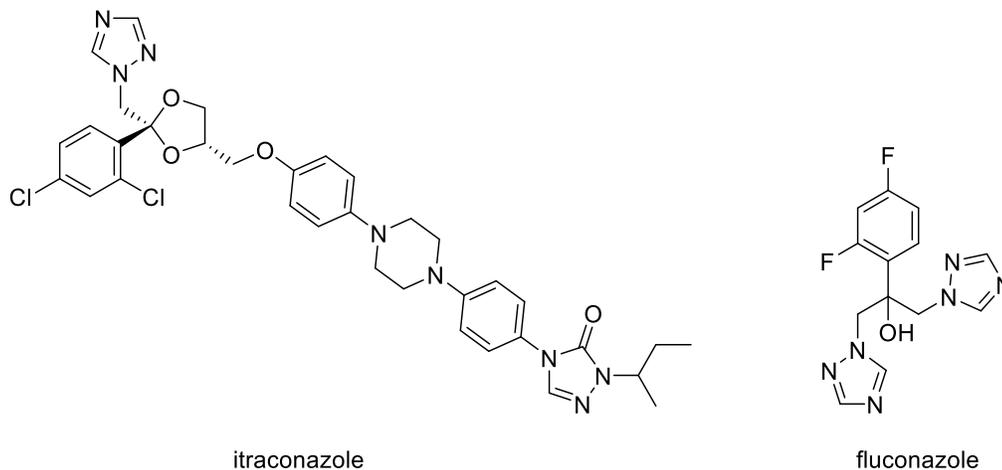


Figure 1.20 : Structure de composés antifongiques de deuxième génération à base d'imidazole.

L'incidence croissante des infections fongiques et l'augmentation signalée des infections par des espèces autres que les *C. albicans*, observées au cours des dernières décennies, ont souligné la nécessité de trouver de nouveaux composés antifongiques.<sup>81</sup>

Comme les QACs et les composés de type imidazole et benzimidazole sont des composés biocompatibles possédant une activité antimicrobienne à large spectre, la conception des molécules présentées dans ce mémoire a été basée sur leurs propriétés et caractéristiques.

Précédemment dans le groupe de la professeure Schmitzer, il a été montré que les composés à base de sels de benzimidazolium avaient une activité antibactérienne pouvant perturber l'intégrité des membranes des bactéries sous forme planctonique ou sous forme de biofilm.<sup>20, 83</sup> Ce sont aussi des molécules facilement synthétisables (Figure 1.21) à partir desquelles différents échafaudages peuvent être modifiés ou ajoutés pour augmenter ou moduler leur activité antibactérienne, en modifiant par exemple la rigidité, la flexibilité et l'hydrophobie de l'espaceur entre les cations benzimidazolium. De ce fait, la conception des molécules présentées dans ce mémoire portera deux parties

cationiques à base de sels de benzimidazoliums, différentes longueurs de chaînes hydrophobes ainsi que des échafaudages aromatiques.

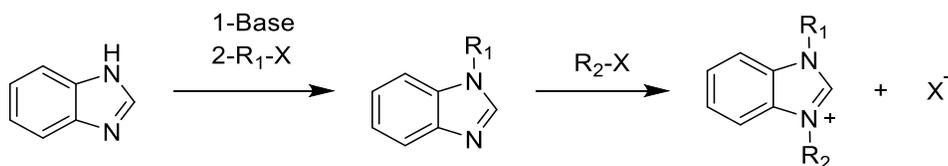


Figure 1.21 : Synthèse générale d'un sel de benzimidazolium.

## 1.8 Description du projet

Précédemment dans le groupe du professeur Schmitzer, divers composés cationiques ayant des propriétés antibactériennes ont été synthétisés et leur action sur les membranes bactériennes a été étudiée.<sup>84, 85</sup> Dans le cadre de ce travail de maîtrise, nous nous sommes penchés sur la conception de nouveaux analogues amphiphiles comportant deux cations benzimidazolium espacés par un échafaudage rigide de type phényléthynylbenzyle (PEB) développé au sein du groupe, ayant montré des propriétés d'autoassemblage. Les composés étudiés ici contiennent donc une unité phényl- ou pyridyl-phényléthynylène, deux cations benzimidazolium et sont substitués par deux chaînes apolaires variables (Figure 1.22).

L'utilisation d'un tel échafaudage devrait conduire à un accroissement de la rigidité à l'intérieur de la molécule et améliorer les propriétés d'autoassemblage par empilement  $\pi$ . Il a été démontré que des composés contenant des unités phényl- ou pyridyl-phényléthynylène formaient des assemblages de type canaux à travers la membrane bactérienne et perturbaient cette dernière de manière significative.<sup>84, 85</sup>

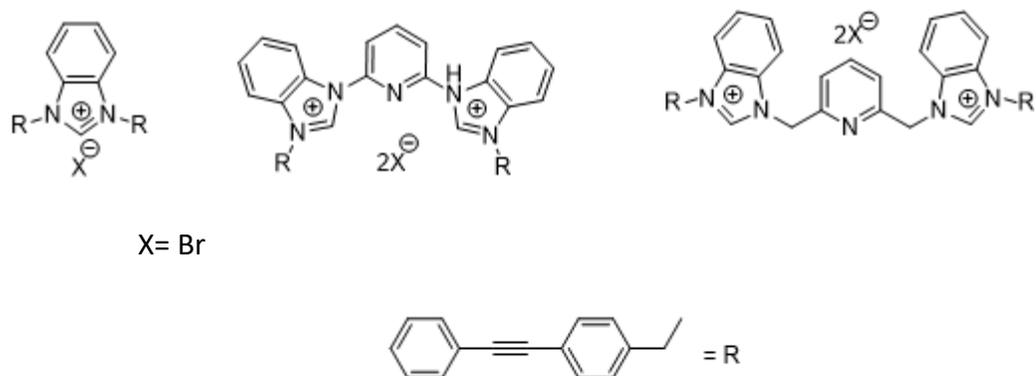


Figure 1.22 : Structure des différents composés synthétisés précédemment et ayant montré une activité antibactérienne accrue.<sup>86</sup>

Plus récemment, le groupe a montré l'intérêt de substituer les benzimidazoliums avec des chaînes aliphatiques apolaires de longueurs variables. Ces substitutions, allant de huit à seize atomes de carbone leur permettent une meilleure insertion dans la membrane plasmique, elle-même constituée de chaînes aliphatiques phospholipidiques et l'augmentation de leurs propriétés antibactériennes.<sup>84, 85, 87</sup> C'est pour cette raison que nous avons décidé d'effectuer la synthèse de six sels de benzimidazolium par couplage de Sonogashira, suivi d'une réaction d'alkylation afin d'introduire deux chaînes alkyles. Ces six analogues comportent donc, un échafaudage phényl- ou pyridyl-phényléthynylène (Figure 1.23 (bleu)) et diverses chaînes aliphatiques contenant 1, 4 ou 8 carbones (Figure 1.23 (rouge)). Les composés synthétisés ont été caractérisés par spectrométrie de masse et spectroscopie RMN, avant de procéder à différents tests biologiques afin de déterminer leurs propriétés antibactériennes et en tant qu'agents antibiofilms.

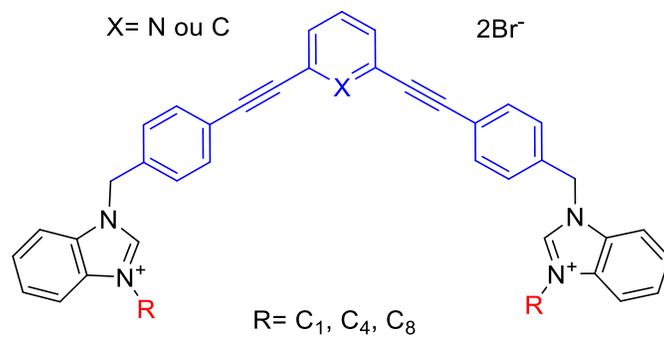


Figure 1.23 : Structure générale des composés cible. X : N ou C

## Chapitre 2 : Méthodes utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne et antibiofilm

### 2.1 Concentration minimale inhibitrice

Afin de déterminer l'activité antimicrobienne d'un antibiotique, il faut tout d'abord effectuer plusieurs mesures quantitatives que l'on obtient à partir de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette concentration minimale inhibitrice représente la plus petite concentration à laquelle un composé peut inhiber de 90 % à 100% de la croissance bactérienne. L'utilisation de cette méthode comporte plusieurs avantages dont la rapidité de l'expérience, la reproductibilité, la visibilité et le traitement des résultats.<sup>88</sup> Pour ce faire, on prépare une solution mère de bactéries à partir de bactéries en dormance gardées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  que l'on ajoute à une solution stérile riche en nutriments appelée LB (*Lysogeny Broth*).<sup>89</sup> Cette solution est composée en général de sel (NaCl), de tryptone, d'extrait de levure et d'eau distillée. Lorsque les bactéries entrent en contact avec cette solution contenant tous les nutriments nécessaires pour croître, elles commencent à se multiplier jusqu'à atteindre la concentration voulue. Cette concentration est déterminée à partir de la densité optique de la solution, mesurée à une longueur d'onde de 600 nm. La valeur de la concentration désirée est choisie de sorte à obtenir des bactéries saines et en pleine croissance. En effet, en dessous d'une densité optique de 0,1 du milieu de culture, les bactéries sont en phase de latence, alors qu'au-dessus de 0,3, elles sont en phase stationnaire.<sup>90</sup> La phase de latence est considérée comme étant la période où la bactérie s'adapte à son environnement en lui permettant de synthétiser les composantes cellulaires nécessaires à sa croissance.<sup>91</sup> De l'autre côté, la phase stationnaire est la période où les bactéries cessent de croître et meurent tout simplement (phase de décroissance) en raison d'un manque de nutriment (Figure 2.1).<sup>92</sup>

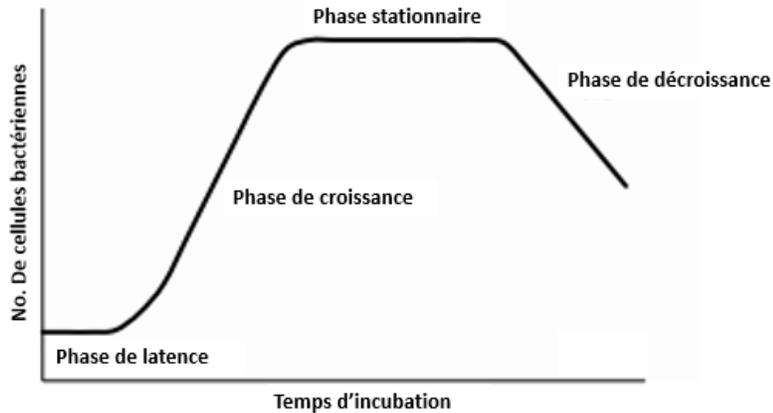


Figure 2.1 : Représentation graphique d'une courbe de croissance d'une culture bactérienne.

La valeur de la longueur d'onde utilisée est quant à elle choisie pour la simple raison que les cellules bactériennes peuvent absorber à cette longueur sans en être affectées.<sup>90</sup> La solution mère préalablement préparée est ensuite répartie uniformément sur une plaque 96 puits stérile où l'on va ajouter des concentrations croissantes d'antibiotiques dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée à 37 °C pour une durée de 24 heures. À la suite de la période d'incubation, les puits sont analysés par spectrophotométrie afin d'obtenir les valeurs de la CMI pour chaque antibiotique.

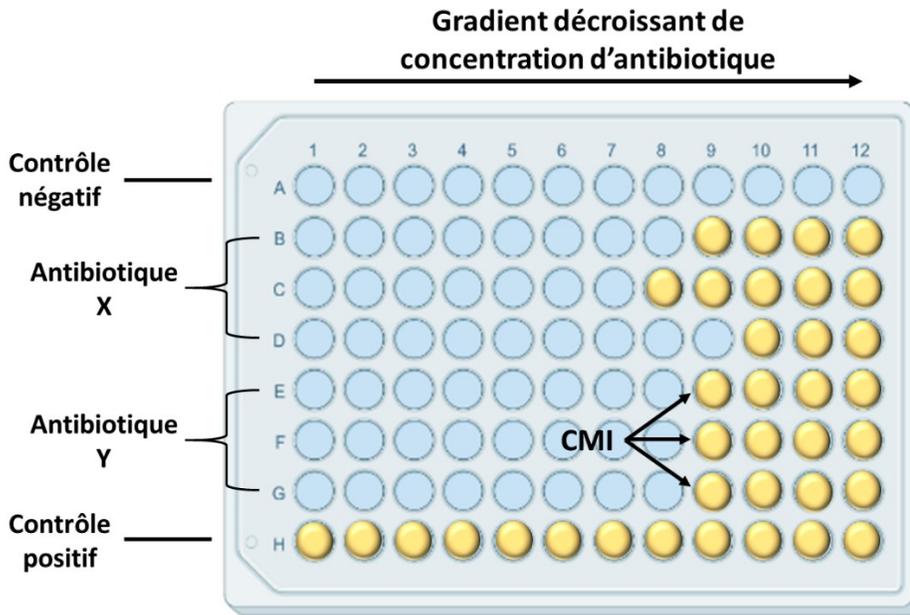


Figure 2.2 : Schéma d'une plaque 96 puits utilisée lors de la détermination de la CMI.

Pour chaque expérience, la première rangée de la plaque 96 puits est dédiée aux tests de stérilité ou contrôle négatif, où l'on ajoute seulement le milieu de croissance sans inoculer de bactéries. Ce test permet de confirmer que le milieu de croissance est bien stérile et que seules les bactéries étudiées pourront se multiplier. À l'opposé, dans la dernière rangée de la plaque, on effectue un test positif, également appelé test de croissance, où l'on ajoute les bactéries sans antibiotiques (Figure 2.2). Lorsque les deux tests sont concluants, on peut dès lors évaluer les valeurs de la CMI des antibiotiques. Il est toujours utile d'effectuer un test de comparaison avec un antibiotique dont on connaît sa CMI afin de situer l'activité antimicrobienne de nouveaux composés étudiés et d'évaluer si ceux-ci sont intéressants ou non.

D'autre part, dans le but d'obtenir des valeurs exactes et précises, on effectue un triplicata de mesures pour chaque antibiotique. Si les valeurs obtenues sont précises, les trois rangées de puits pour un même antibiotique donnent la même concentration à laquelle la croissance bactérienne est interrompue (antibiotique Y, Figure 2.2). Au

contraire, si les valeurs des 3 puits ne sont pas les mêmes (antibiotique X), les résultats sont considérés comme exacts, mais imprécis et l'expérience doit être répétée.

## 2.2 Étude de l'activité des agents antibiofilms

Afin de déterminer l'activité anti-biofilm des molécules synthétisées, un modèle d'inhibition et de destruction des biofilms est utilisé. Le modèle d'inhibition consiste à incuber des bactéries planctoniques en présence d'un antibiotique pendant 48 heures et d'analyser leur capacité à inhiber la formation du biofilm. Pour ce qui est du modèle de destruction, on incube d'abord les bactéries pour une durée de 48 heures, soit jusqu'à l'obtention d'un biofilm mature et on ajoute ensuite les antibiotiques pour 24 heures afin d'étudier leur capacité à le détruire ou à le réduire. Les bactéries pathogènes qui sont généralement utilisées pour former les biofilms sont les *MRSA* puisqu'elles sont reconnues pour former des biofilms lorsqu'elles sont dans un environnement propice à leur développement.

Lorsqu'on effectue ce type d'essai dans une plaque 8 puits, il est primordial d'effectuer des contrôles positifs et négatifs. Le contrôle négatif se fait en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO), un solvant organique polaire, simplement puisque les composés étudiés sont préalablement dissous dans celui-ci. Il est donc important de vérifier que le DMSO n'a aucun effet sur le biofilm, afin de valider l'exactitude de ce test. Pour ce qui est du test positif, du Triton-X ou de l'éthanol sont utilisés, ceux-ci étant connus pour tuer les bactéries présentes dans les biofilms.<sup>93</sup>

### 2.2.1 Détection des biofilms

Afin d'évaluer les résultats des deux essais présentés précédemment, soit le test d'inhibition et de destruction des biofilms, un test de viabilité (rapport mort/vivant) (BaLight®)<sup>85</sup> des bactéries est utilisé comme mode de détection. Ce test quantitatif permet entre autres de déterminer rapidement la capacité d'un agent antibactérien à

détruire les biofilms, mais permet aussi d'étudier l'intégrité des membranes bactériennes des microorganismes qui y se trouvent.

Cette méthode consiste à mélanger deux marqueurs fluorescents avec les bactéries, soit le SYTO9 et l'iodure de propidium (IP). Ces deux sondes fluorescentes sont connues comme étant des agents intercalant de l'ADN. Elles diffèrent grandement par leurs caractéristiques spectrales et par leur capacité à pénétrer les membranes des bactéries perméabilisées ou intactes. En effet, le SYTO9 est un marqueur fluorescent vert et perméable aux membranes bactériennes, tandis que l'iodure de propidium est un marqueur fluorescent rouge imperméable aux membranes intactes.<sup>94</sup> Ainsi, lorsque l'on rajoute ce mélange de marqueurs à des bactéries en santé, avec des membranes intactes, seul le SYTO9 s'insère entre les bases nucléiques de l'ADN et conduit à l'observation d'une fluorescence verte. Toutefois, si la membrane bactérienne est perturbée ou endommagée, l'iodure de propidium peut alors s'insérer à son tour dans l'ADN et il est possible d'observer une fluorescence rouge.<sup>95</sup> Comme le SYTO9 peut s'insérer autant à l'ADN des bactéries vivantes ou mortes, il est à noter que la fluorescence du PI est nettement supérieure à celle du SYTO9, de 20 à 30 fois plus intense, ce qui permet d'atténuer la fluorescence verte du SYTO9.<sup>96</sup> Ainsi, il est possible de distinguer les bactéries saines qui fluorescent vert et les bactéries mortes qui fluorescent rouge (Figure 2.3).

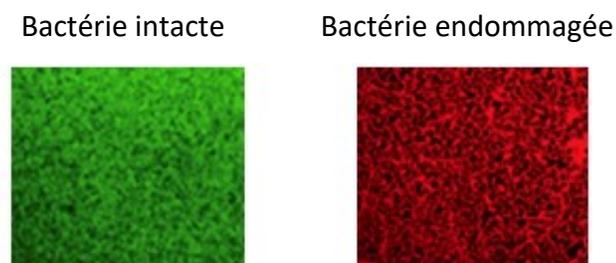


Figure 2.3 : Test mort/vivant (BaLight®).<sup>95</sup>

### 2.3 Détermination de la biocompatibilité

Dans le but de déterminer si les antibiotiques étudiés sont biocompatibles avec les cellules saines de l'organisme humain, on étudie l'effet des nouveaux composés sur les globules rouges, en faisant un test d'hémolyse. Celui-ci consiste à incuber les molécules étudiées aux concentrations auxquelles elles présentent une activité antibactérienne, en présence de globules rouges (RBCs) afin d'en déterminer leur toxicité sur ces cellules eucaryotes saines. Les RBCs sont en fait des cellules contenant une forte concentration d'hémoglobine, une biomolécule contenant du fer qui fixe l'oxygène et qui est responsable de la couleur rouge de ces cellules.<sup>97</sup> Lorsque celle-ci sont lysées, généralement par l'action d'une substance qui perturbe l'intégrité des membranes des RBCs, elles libèrent leur hémoglobine dans le plasma qui est principalement composé d'eau et fait changer sa couleur d'incolore à une teinte rouge. Le taux d'hémolyse est ensuite mesuré en séparant le plasma des cellules RBCs intactes par centrifugation et la quantité d'hémoglobine est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont ensuite comparés à un test positif (100% hémolyse) et à un test négatif (RBCs intactes dans le PBS) afin de déterminer le taux d'hémolyse causé par les composés étudiés (Figure 2.4).<sup>98</sup>

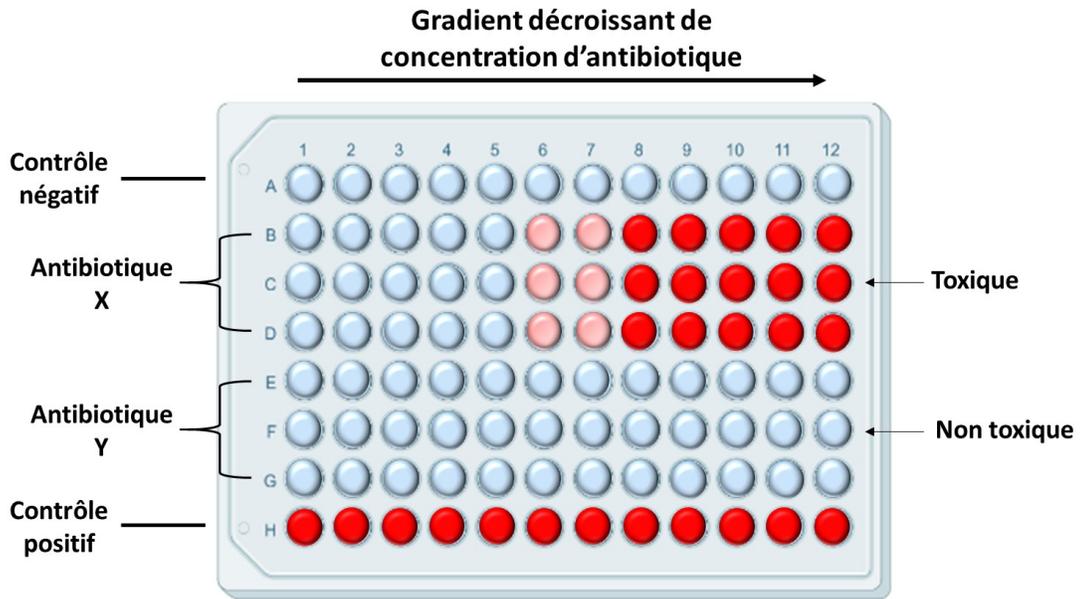


Figure 2.4 : Schéma d'une plaque 96 puits lors d'un test d'hémolyse.

## 2.4 Références bibliographiques

1. Liang, S. T.; Liang, L. T.; Rosen, J. M., *Postgrad Med J* **2021**, 97 (1147), 273-274.
2. Manohar, P.; Loh, B.; Nachimuthu, R.; Hua, X.; Welburn, S. C.; Leptihn, S., *Front Med (Lausanne)* **2020**, 7, 1-8.
3. Manohar, P.; Loh, B.; Leptihn, S., *Infectious Microbes and Diseases* **2020**, 2 (3), 87-88.
4. Yeagle, P. L., *The Membranes of Cells*, 3<sup>nd</sup> ed.; **2016**, 1-25.
5. Gaur, A. and al, *Encyclopedia Britannica*, **2016**, Accessed 23 September 2021.
6. Maicas, S., *Microorganisms* **2020**, 8 (8), 1-8.
7. Feldmann, H., *Yeast*, 2<sup>nd</sup> ed.; **2012**, 1-3.
8. Santos, A. X.; Riezman, H., *FEBS Lett* **2012**, 586 (18), 2858-2867.
9. Wingard, J. R.; Anaissie, E., *Fungal Infections in the Immunocompromised Patient*, 1<sup>nd</sup> ed.; **2005**, 149-183 .
10. Feldmann, H., *Yeast*, 2<sup>nd</sup> ed.; **2012**, 5-24.
11. Stillwell, W., *Introduction to Biological Membranes*, 2<sup>nd</sup> ed.; **2016**, 3-15.
12. GM., C., *The Cell: A Molecular Approach.*, 2<sup>nd</sup> ed.; **2000**, 10-25.
13. Marsh, D., *Biophys J* **2012**, 102 (5), 1079-1087.
14. Auer, G. K.; Weibel, D. B., *Biochemistry* **2017**, 56 (29), 3710-3724.
15. Zamyatina, A., *Beilstein J Org Chem* **2018**, 14, 25-53.
16. Rice\*, C. V.; J. R. W.; Eastman, M. A.; Harrison, W.; Pereira, M. P.; Brown, E. D., *The International Society for Optical Engineering* **2008**, 7097, 1-32.
17. Botstein, D.; Chervitz, S. A.; Cherry, J. M., *Science* **1997**, 277 (5330), 1259-1260.
18. Vilela, A., *Fermentation* **2020**, 6 (2), 1-16.
19. Rojas, E. R.; Huang, K. C., *Curr Opin Microbiol* **2018**, 42, 62-70.
20. Gravel, J.; Schmitzer, A. R., *Org Biomol Chem* **2017**, 15 (5), 1051-1071.
21. Palumbi, S. R., *Science* **2001**, 293 (5536), 1786-1790.
22. Hiramatsu, K.; Cui, L.; Kuroda, M.; Ito, T., *Trends in Microbiology* **2001**, 9 (10), 486-493.

23. Larson, E., *Annu Rev Public Health* **2007**, *28*, 435-447.
24. Levy, S. B.; Marshall, B., *Nat Med* **2004**, *10* (12), S122-129.
25. Furuya, E. Y.; Lowy, F. D., *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4* (1), 36-45.
26. Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J., *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8* (6), 423-435.
27. Tenover, F. C., *Am J Med* **2006**, *119* (6), S3-10.
28. Davies, J.; Smith, D. I., *PAnnu Rev Microbiol* **1978**, *32*, 469-518.
29. Dixit, S. K.; Yadav, N.; Kumar, S.; Good, L.; Awasthi, S. K., *Medicinal Chemistry Research* **2014**, *23* (12), 5237-5249.
30. Andriole, V. T., *Clin Infect Dis* **2005**, *41* (2), S113-119.
31. Drlica, K.; Zhao, X., *Microbiol Mol Biol Rev* **1997**, *61* (3), 377-392.
32. Levine, A. M.; DiBona, J. R., *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **2002**, *10* (1), 1-4.
33. Sharma, P. C.; Jain, A.; Jain, S.; Pahwa, R.; Yar, M. S., *J Enzyme Inhib Med Chem* **2010**, *25* (4), 577-589.
34. Chen, C. R.; Malik, M.; Snyder, M.; Drlica, K., *J Mol Biol* **1996**, *258* (4), 627-637.
35. Hooper, D. C., *Emerg Infect Dis* **2001**, *7* (2), 337-341.
36. Aldred, K. J.; Schwanz, H. A.; Li, G.; McPherson, S. A.; Turnbough, C. L., Jr.; Kerns, R. J.; Osheroff, N., *ACS Chem Biol* **2013**, *8* (12), 2660-2668.
37. Jacoby, G. A., *Clin Infect Dis* **2005**, *41*(2), S120-126.
38. David C. Hoper, E. R., *Quinolone Antimicrobial Agents*. 3rd ed.; **2003**, 1177.
39. Wehrli, W., *Rev Infect Dis* **1983**, *5*(3), S407-411.
40. Campbell, E. A.; Korzheva, N.; Mustaev, A.; Murakami, K.; Nair, S.; Goldfarb, A.; Darst, S. A., *Cell* **2001**, *104* (6), 901-912.
41. Feklistov, A.; Mekler, V.; Jiang, Q.; Westblade, L. F.; Irschik, H.; Jansen, R.; Mustaev, A.; Darst, S. A.; Ebright, R. H., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (39), 14820-14825.
42. Artsimovitch, I.; Chu, C.; Lynch, A. S.; Landick, R., *Science* **2003**, *302* (5645), 650-654.
43. Mosaei, H.; Zenkin, N., *EcoSal Plus* **2020**, *9* (1), 1-16.

44. Moazed, D.; Noller, H. F., *Nature* **1987**, 327 (6121), 389-394.
45. Vannuffel, P.; Cocito, C., *Drugs* **1996**, 51 (1), 20-30.
46. Bottger, E. C.; Springer, B.; Prammananan, T.; Kidan, Y.; Sander, P., *EMBO Rep* **2001**, 2 (4), 318-323.
47. Cundliffe, E., *Biochimie* **1987**, 69 (8), 863-869.
48. Goni, F. M., *Biochim Biophys Acta* **2014**, 1838 (6), 1467-1476.
49. Waxman, D. J.; Yocum, R. R.; Strominger, J. L., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **1980**, 289 (1036), 257-271.
50. Cochrane, S. A.; Lohans, C. T., *Eur J Med Chem* **2020**, 194, 112262.
51. Diene, S. M.; Pinault, L.; Keshri, V.; Armstrong, N.; Khelaifia, S.; Chabriere, E.; Caetano-Anolles, G.; Colson, P.; La Scola, B.; Rolain, J. M.; Pontarotti, P.; Raoult, D., *Sci Rep* **2019**, 9 (1), 1-7.
52. Lobanovska M, Pilla G. *Yale J Biol Med.*, **2017**, 90 (1), 135-145.
53. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J. A.; Charlier, P., *FEMS Microbiol Rev* **2008**, 32 (2), 234-258.
54. Lewis, K., *Nat Rev Microbiol* **2007**, 5 (1), 48-56.
55. Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I.; Lee, R. E., *Nat Rev Microbiol* **2011**, 9 (1), 62-75.
56. Eisenreich, W.; Rudel, T.; Heesemann, J.; Goebel, W., *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, 10, 1-25.
57. Marie, E.; Sagan, S.; Cribier, S.; Tribet, J *Membr Biol* **2014**, 247 (9-10), 861-881.
58. Brogden, K. A., *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3 (3), 238-250.
59. Canepari, P.; Boaretti, M.; Lleo, M. M.; Satta, G., *Antimicrob Agents Chemother* **1990**, 34 (6), 1220-1226.
60. Silverman JA, Oliver N, Andrew T, Li T. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, 45 (6), 1799-1802.
61. Tedesco, K. L.; Rybak, M. J., *Pharmacotherapy* **2004**, 24 (1), 41-57.
62. Motta, J. P.; Wallace, J. L.; Buret, A. G.; Deraison, C.; Vergnolle, N., *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2021**, 18 (5), 314-334.

63. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P., *Nat Rev Microbiol* **2004**, 2 (2), 95-108.
64. Parsek, M. R.; Singh, P. K., *Annu Rev Microbiol* **2003**, 57, 677-701.
65. Flemming, H. C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S., *Nat Rev Microbiol* **2016**, 14 (9), 563-575.
66. Karatan, E.; Watnick, P., *Microbiol Mol Biol Rev* **2009**, 73 (2), 310-347.
67. Verderosa, A. D.; Totsika, M.; Fairfull-Smith, K. E., *Front Chem* **2019**, 7, 1-17.
68. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A. U., *Antimicrob Resist Infect Control* **2019**, 8, 1-10.
69. Koo, H.; Allan, R. N.; Howlin, R. P.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L., *Nat Rev Microbiol* **2017**, 15 (12), 740-755.
70. Srinivasan, R.; Santhakumari, S.; Poonguzhali, P.; Geetha, M.; Dyavaiah, M.; Xiangmin, L., *Front Microbiol* **2021**, 12, 1-19.
71. Donlan, R. M., *Clin Infect Dis* **2001**, 33 (8), 1387-1392.
72. Vereshchagin, A. N.; Frolov, N. A.; Egorova, K. S.; Seitkalieva, M. M.; Ananikov, V. P., *Int J Mol Sci* **2021**, 22 (13), 1-82.
73. Hora, P. I.; Pati, S. G.; McNamara, P. J.; Arnold, W. A., *Environmental Science & Technology Letters* **2020**, 7 (9), 622-631.
74. C. P. Chauret, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2 ed.; **2014**, 360-364.
75. Xiao Fang Zhao, Y. H. L., Hao Yuan, *ATLANTIS PRESS*, 3<sup>rd</sup> ed.; **2015**, 417-420.
76. Merchel Piovesan Pereira, B.; Tagkopoulos, I., *Appl Environ Microbiol* **2019**, 85 (13), 1-13.
77. Rani, N.; Sharma, A.; Gupta, G. K.; Singh, R., *Mini Rev Med Chem* **2013**, 13 (11), 1626-1655.
78. Beltran-Hortelano, I.; Alcolea, V.; Font, M.; Perez-Silanes, S., *Eur J Med Chem* **2020**, 206, 1-14.
79. Song, D.; Ma, S., *ChemMedChem* **2016**, 11 (7), 646-659.
80. Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R., *Trends in Microbiology* **2003**, 11 (6), 272-279.

81. Dignani, M. C., In *Fungal Infection in the Immunocompromised Patient*, 1<sup>nd</sup> ed.; **2005**, 215-256.
82. Francois, I.; Cammue, B.; Borgers, M.; Ausma, J.; Dispersyn, G.; Thevissen, K., *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, 5 (1), 3-13.
83. Tessier, J.; Schmitzer, A. R., *RSC Advances* **2020**, 10 (16), 9420-9430.
84. Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R., *J Med Chem* **2015**, 58 (5), 2358-2366.
85. Yu, Z.; van Veldhoven, J. P.; Louvel, J.; t Hart, I. M.; Rook, M. B.; van der Heyden, M. A.; Heitman, L. H.; AP, I. J., *J Med Chem* **2015**, 58 (15), 5916-5929.
86. Tessier, J.; Lecluse, M.; Gravel, J.; Schmitzer, A. R., *ChemMedChem* **2018**, 13 (23), 2567-2572.
87. Tessier, J.; Golmohamadi, M.; Wilkinson, K. J.; Schmitzer, A. R., *Org Biomol Chem* **2018**, 16 (23), 4288-4294.
88. Andrews, J. M., *J Antimicrob Chemother* **2001**, 48 (1), 5-16.
89. Grawe, A.; Ranglack, J.; Weyrich, A.; Stein, V., *Methods Enzymol* **2021**, 647, 231-255.
90. Sezonov, G.; Joseleau-Petit, D.; D'Ari, R., *J Bacteriol* **2007**, 189 (23), 8746-8749.
91. Allen, R. J.; Waclaw, B., *Rep Prog Phys* **2019**, 82 (1), 1-28.
92. Kolter, R.; Siegele, D. A.; Tormo, A., *Annu Rev Microbiol* **1993**, 47, 855-874.
93. Seo, Y.; Bishop, P. L., *Environ Sci Technol* **2007**, 41 (20), 7107-7113.
94. Stiefel, P.; Schmidt-Emrich, S.; Maniura-Weber, K.; Ren, Q., *BMC Microbiol* **2015**, 15, 1-9.
95. Boulos, L.; Prévost, M.; Barbeau, B.; Coallier, J.; *Journal of Microbiological Methods* **1999**, 37 (1), 77-86.
96. ThermoFisher, LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy & quantitative assays
97. Shou, K.; Sarter, M.; de Souza, N. R.; de Campo, L.; Whitten, A. E.; Kuchel, P. W.; Garvey, C. J.; Stadler, A. M., *R Soc Open Sci* **2020**, 7 (10), 1-20.
98. Han, V.; Serrano, K.; Devine, D. V., *Vox Sang* **2010**, 98 (2), 116-123.

## Chapitre 3: (Article) Synthesis and activity of novel bis-benzimidazolium salts against biofilms

Amélie Dubreuil and Andreea R. Schmitzer\*

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

*Ready to be submitted*

Ma contribution à cet article présenté dans ce chapitre a été l'élaboration du projet et des procédures, la totalité du travail expérimental ainsi que la rédaction de la première version du manuscrit. Julien Desloges a effectué les calculs de logP.

Prof. Andreea R. Schmitzer a contribué à cet article dans l'élaboration du projet, l'élaboration des procédures expérimentales et a finalisé la rédaction du manuscrit.

### 3.1 Abstract

For decades, bacterial resistance has been a significant threat to the efficiency of modern treatments of many serious illnesses and requires the continuous development of new strategies and antibiotics. One of the most common mechanisms used by microorganisms to develop resistance is the formation of biofilms. In this study, we developed new compounds able to prevent the formation of biofilms and to disrupt mature formed biofilms. We have synthesized compounds containing benzimidazolium cations, a hydrophobic scaffold, and different apolar side groups. Their ability to prevent the formation of Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) biofilms and to disrupt mature MRSA biofilms identifies them as promising candidates in the search of new avenues to fight microbial resistance.

**Keywords:** antimicrobial agents, bacterial biofilm, antibiotic resistance

### 3.2 Introduction

Bacterial infections with resistant microorganisms are one of the biggest challenges in hospitals as they are responsible for a significant number of complications during and after hospitalization.<sup>1</sup> Development of new antibacterial agents without previous use and fast activity can limit the spread of bacterial infections. Penicillin's discovery by Fleming in 1939 made possible the complete eradication of some bacterial infections but, strains resistant to this antibiotic were identified shortly after its extensive commercialization. This scenario was repeated a few years later with methicillin, a penicillin analogue, when *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) rapidly developed resistance to this antibiotic.<sup>1-2</sup> The rise of bacterial resistance to antibiotics is therefore a major concern that is becoming increasingly topical, which requires the constant development of new antibacterial agents, with old or new modes of action.<sup>3</sup> Biofilm formation is one of the most common mechanisms developed by microorganisms to survive in hostile environments and is responsible for many chronic infections.<sup>4-6</sup> New compounds able to

interfere with the bacterial biofilm formation cycle, inhibiting biofilm formation or dispersing pre-formed biofilm are constantly needed.

Previously, various organic cationic compounds demonstrated strong antibacterial and antibiofilm properties.<sup>7-9</sup> The amphiphilic nature of these compounds (Figure 3.1 a)) is brought by the presence of two benzimidazolium cations substituted with two phenylethynylbenzyl groups. These compounds have shown a higher activity against *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA) and against biofilms than commercial cationic compounds, which is attributed to their ability to self-assemble in phospholipid membranes and induce membrane permeability. Herein, we designed and studied compounds containing phenylphenylethylene or pyridylphenylethylene scaffolds (Figure 3.1 b)).

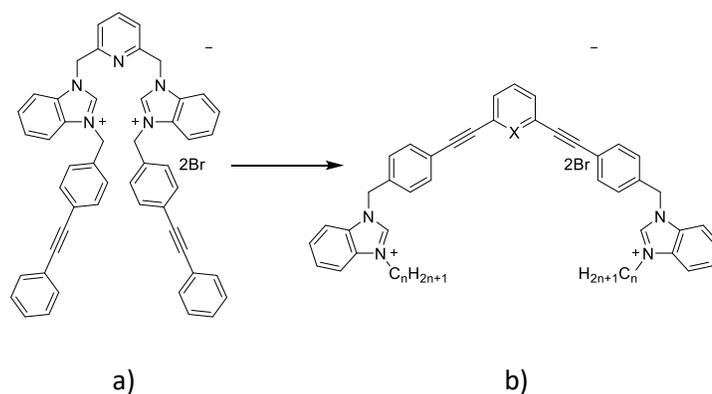


Figure 3.1: Structure of a) previously reported compounds and b) those presented in this study.

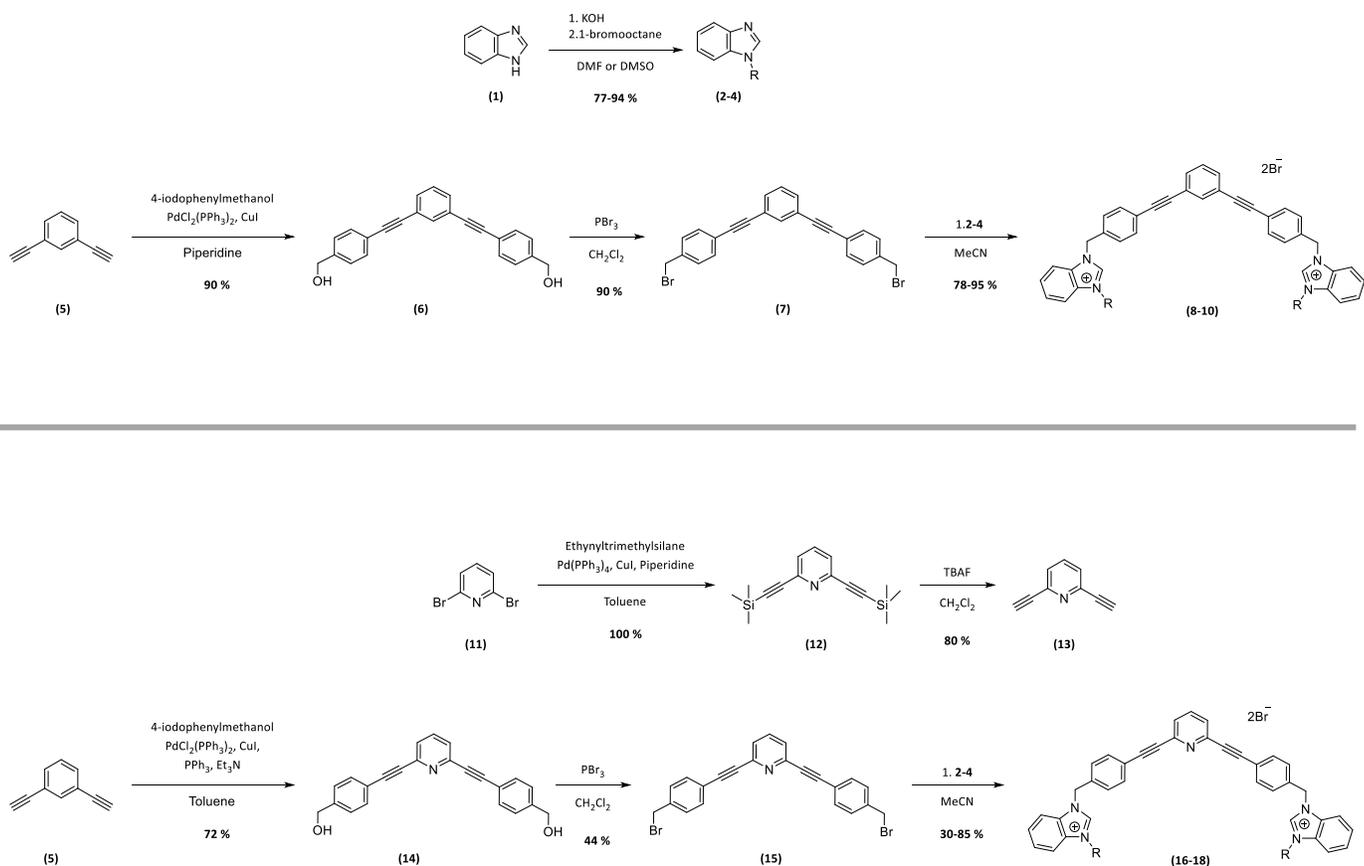
The new amphiphilic compounds contain two benzimidazolium cations, which are linked through a rigid scaffold and possess different alkyl side chains. The use of a rigid conjugated scaffold between the two benzimidazolium cations may improve their ability to self-assemble through  $\pi$  stacking and enhance their compatibility with the apolar environment of phospholipid bilayers.<sup>10-11</sup> Various biological tests were carried out to determine their antibiofilm properties.

This was achieved by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds on planktonic bacteria. We then used this concentration as well as twice that concentration (2xMIC) to assess the lowest concentration at which the compounds can inhibit or destroy biofilm.<sup>12</sup>

### 3.3 Results and Discussion

The general procedure for the synthesis of the new compounds is shown in Figure 3.2. The first step of the synthesis is the functionalization of benzimidazole (**1**) through nucleophilic substitution under basic conditions to obtain alkyl benzimidazole compounds (**2-4**). A Sonogashira cross coupling is then carried out between 1,3-diethylbenzene and 4-iodobenzylalcohol (**5**), followed by a bromination reaction, to achieve the dibromo intermediate (**7**). Finally, compounds **8-10** are obtained after nucleophilic substitution with benzimidazoles (**2-4**).<sup>9</sup>

In order to obtain the pyridyl analogs **16-18**, diethynylpyridine (**13**) was prepared by a Sonogashira cross coupling reaction between ethyltrimethylsilane and dibromopyridin (**11**), followed by a deprotection step. Analogs **16-18** were then prepared using the method described above.<sup>13-14</sup>



**2, 8, 16** (R = CH<sub>3</sub>), **3, 9, 17** (R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>), **4, 10, 18** (R = C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)

Figure 3.2: Synthesis of the bis-dibenzimidazolium salts.

### 3.3.1 Antimicrobial activity

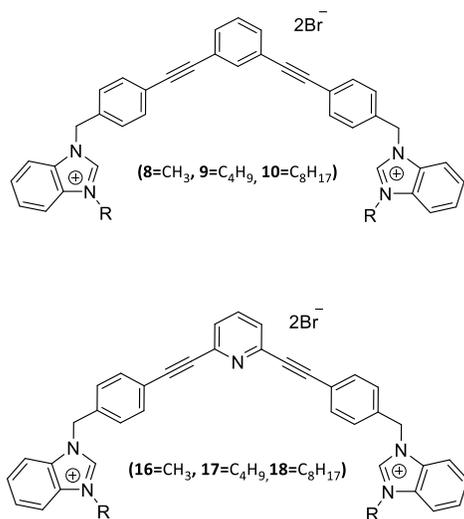
The ability to inhibit 90 % of bacterial growth for compounds **8-10** and **16-18** was studied on Gram-positive *Methicillin-resistant S. aureus* (ATCC 43300) (MRSA), *Vancomycin-resistant E. faecium* (BAA-2316) (VRE), Gram-negative *E. coli* (SK039), and yeasts *C. albicans* (SC5314) (see annexe 1.3).

The results summarized in Table 3.1 show that all compounds present antimicrobial activities against Gram-positive bacteria (MRSA and VRE) and *C. albicans* which are higher than commercial compounds. However, compound **16** is a little bit less active against these strains. The lack of activity of compound **16** could be related to its

higher hydrophilicity (calculated logP 0.51), compared to the other compounds that may penetrate the phospholipid bilayer more easily.

For Gram-negative bacteria *E. coli* (SK039), we observed a stronger antibacterial activity for compounds **9** and **17** with MICs below 10 µg/ml (see Figure A1.3.2). Gram-negative bacteria possess an additional external phospholipid bilayer compared to Gram-positive bacteria, which may explain why the other compounds are less able to disturb their membranes.<sup>15</sup> The lack of activity of compounds **8** and **16** is probably due to their more hydrophilic character and inability to pass through both external and internal membranes, while compounds **10** and **18** may be too hydrophobic to insert into the external membrane or may accumulate in it. Compounds **9** and **17** seem to have the right hydrophobic properties (log P around 4) for insertion into both membranes, which results in membrane perturbation and ability to kill these microorganisms.

Table 3.1: Minimum inhibitory concentration (MIC) in  $\mu\text{g/ml}$  on different microorganisms, haemolytic activity on Human Red Blood cells ( $\text{HC}_5$ ) in  $\mu\text{g/ml}$  and calculated Log P



Antimicrobial	MRSA	VRE	E. Coli	C. albicans	HC <sub>5</sub>	Log P
<b>8</b>	2 ± 0.02	2 ± 0.02	100 ± 0.03	10 ± 0.03	0.03	1.03
<b>9</b>	1 ± 0.02	0.5 ± 0.006	5 ± 0.01	5 ± 0.02	0.8	4.23
<b>10</b>	2 ± 0.03	4 ± 0.01	>100	10 ± 0.003	1	6.61
<b>16</b>	12.5 ± 0.01	100 ± 0.03	200 ± 0.03	50 ± 0.02	N. D	0.51
<b>17</b>	2.5 ± 0.006	5 ± 0.02	10 ± 0.02	10 ± 0.03	N. D	3.72
<b>18</b>	2 ± 0.03	2 ± 0.01	>100	12.5 ± 0.07	1	6.10
<b>Penicillin</b>	>400	>400	100 ± 0.02	>100	N. D	N. D
<b>Kanamycin</b>	>400	>400	>100	>100	N. D	N. D
<b>Ampicillin</b>	>400	50 ± 0.006	<12.5	N. D	N. D	N. D
<b>Streptomycin</b>	>400	>400	<12.5	N. D	N. D	N. D
<b>Trimethoprim</b>	50 ± 0.02	>400	>40	>100	N. D	N. D
<b>BAC</b>	>100	N. D	10	50	N. D	N. D

MRSA = Methicillin-resistant *S. aureus* (ATCC 43300), VRE = vancomycin-resistant *E. faecium* (BAA-2316), *E. Coli* (SK037), *C. albicans* (SC5314),  $\text{HC}_{50}$ : concentration of antimicrobial at which 5 % of Human Red Blood cells are lysed, log P: the partition coefficient (octanol/water), calculate with consensus 3D model.<sup>16</sup>

### 3.3.2 Antibiofilm activity

The ability of the new compounds to inhibit the formation and disrupt mature *S. aureus* biofilms was studied using commercially available fluorescent markers (Baclight Live/Dead).<sup>17</sup> The results obtained are summarized in Figures 3.3 and 3.4 for the inhibition and in Figures 3.5 and 3.6 for the destruction studies.

#### 3.3.2.1 Ability to inhibit the formation of MRSA biofilms

Confocal imaging of untreated *MRSA* biofilms (Figure 3.3) shows the formation of living and homogeneous bacterial biofilms. Once treated with compounds **8** and **9** at their MICs or 2xMIC, an inhibition of 50 % of the biofilm can be observed. The use of compound **9** at its 2xMIC shows the formation of a thinner biofilm, suggesting a higher capacity of inhibition for this compound at this concentration. Compound **10** induces 60% inhibition of the biofilm formation when used at its MIC and 2xMIC. Compounds **16** and **17** show a similar ability to inhibit the formation of the biofilm at their MICs (38%) and a greater activity at their 2xMICs (60%). When the biofilm is treated with compound **18** at 2xMIC, a significant inhibition can be observed (77%).

We can conclude that compounds **10** and **18** bearing octyl chains possess higher inhibition activity at 2xMICs (Figure 3.3). These results suggests that the most lipophilic compounds possess better inhibition activity for the biofilm formation. We have already observed this trend with octyl-functionalized imidazolium or benzimidazolium salts.<sup>9</sup> Moreover, when the activity of these salts on the inhibition of *MRSA* biofilm formation is compared to those commercially and widely used benzalkonium chloride (*BAC*) or Ampicillin, it should be noted that it is significantly higher.

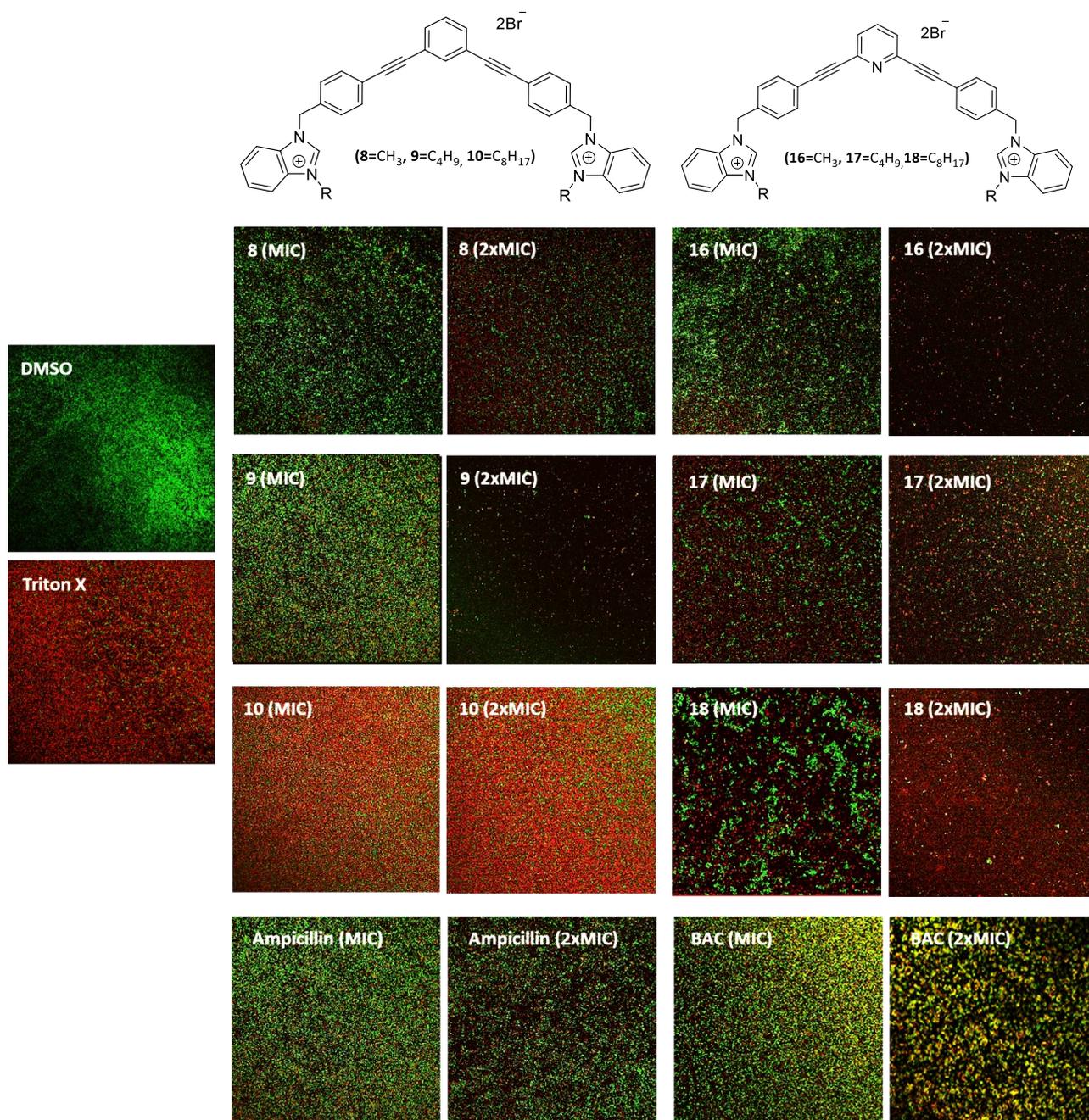


Figure 3.3: Representative images inhibition of *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials. DMSO 10 % (Negative control); Triton X (Positive control); Compound **8** (MIC: 2 µg/ml, 2xMIC: 4 µg/ml); Compound **9** (MIC: 1 µg/ml, 2xMIC: 2 µg/ml); Compound **10** (MIC: 2 µg/ml, 2xMIC: 4 µg/ml); Compound **16** (MIC: 12.5 µg/ml, 2xMIC: 25 µg/ml); Compound **17** (MIC: 2.5 µg/ml, 2xMIC: 5 µg/ml); Compound **18** (MIC: 2 µg/ml, 2xMIC: 4 µg/ml); **Ampicillin** (1: 200 µg/ml; 2: 400 µg/ml); **BAC** (1: 100 µg/ml, 2: 200 µg/ml).

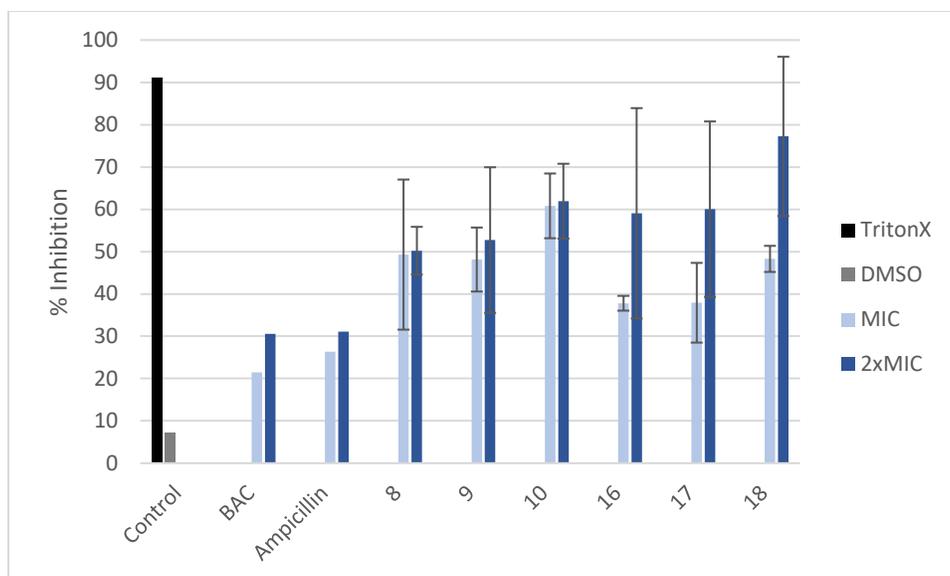


Figure 3.4: Average of three images of the inhibition of *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials calculated with ImageJ software. Negative control (DMSO 10 %) and positive control (Triton X).

### 3.3.2.2 Ability to destroy the formation of *MRSA* biofilms

All compounds have a better ability to disrupt mature biofilms when compared to the biofilm inhibition. This difference in activity is probably because the compounds have a better ability to kill bacteria that does not growing in the mature biofilm than to killing bacteria that are growing with a full enzymatic activity when they form the biofilm.

Thereby, it can be seen that all studied compounds possess a good capacity to disrupt mature biofilms at their MIC and very good destruction activity at 2xMIC. However, compounds **9**, **16** and **18** are very efficient to disrupt mature biofilms at 2xMIC (Figure 3.5) compared to the other compounds. Compound **9** is the best biofilm disruptor by completely destroying mature biofilms at a 2xMIC concentration. Moreover, in contrast to the commercial compounds, BAC for example at its 2xMIC, (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), a better capacity to disrupt *MRSA* mature biofilms can be noted at lower concentrations for all the salts.

In terms of toxicity, the compounds show haemolytic activity, except for compound **8**. As they possess a good capacity to disrupt mature biofilms, these should find application in the treatment of topical biofilms.

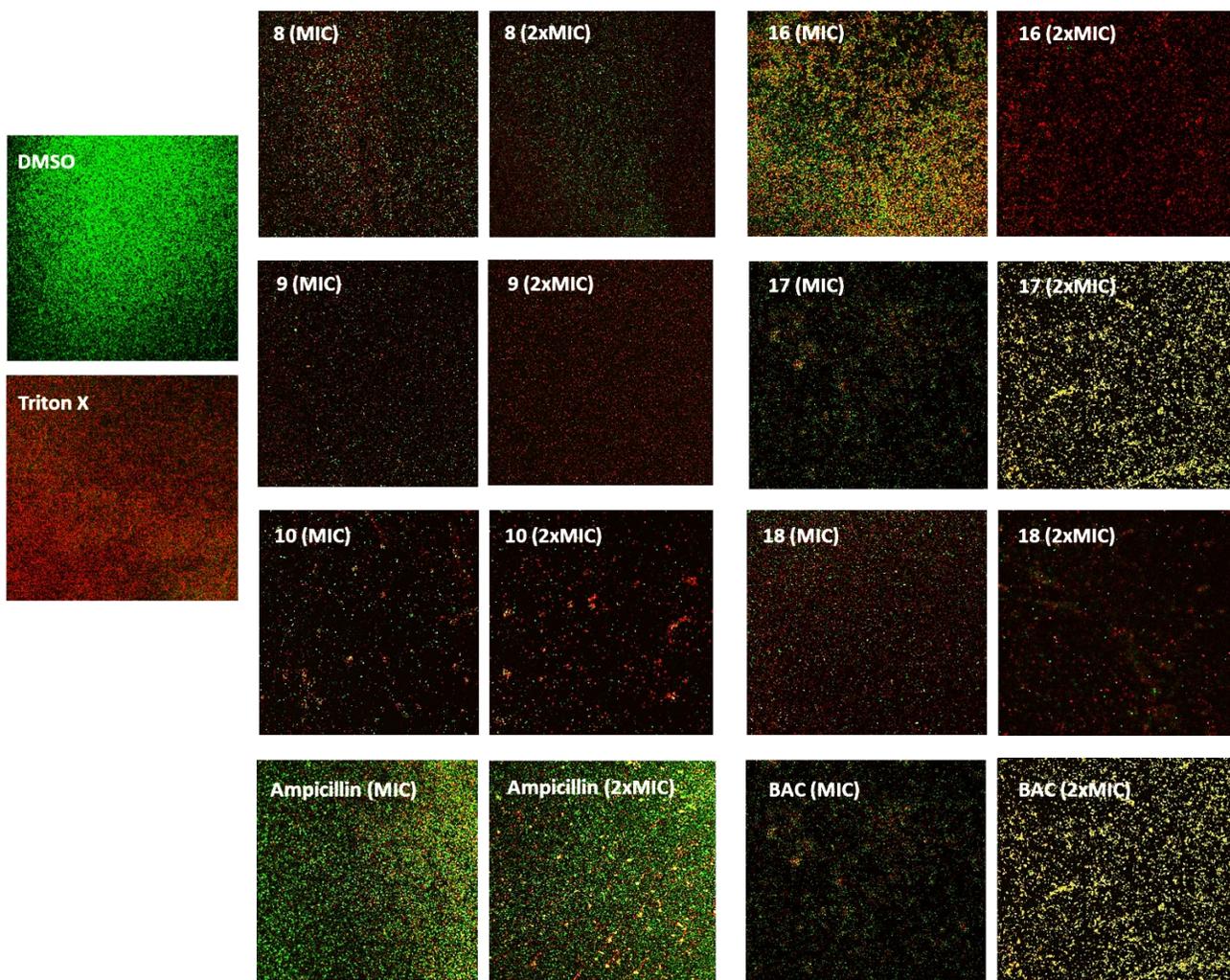
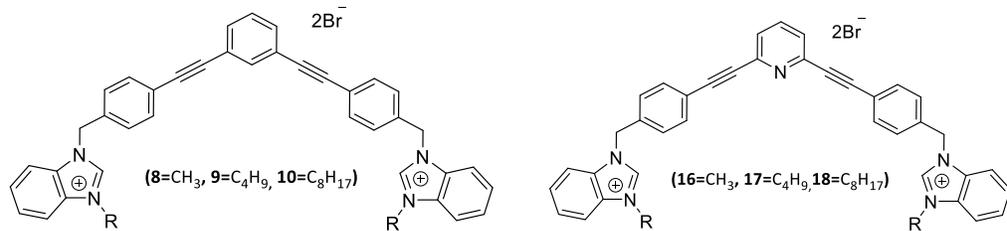


Figure 3.5: Representative images of the destruction of mature *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials. DMSO 10 % (Negative control); Triton X (Positive control); Compound **8** (MIC: 2 µg/ml, 2xMIC: 4 µg/ml); Compound **9** (MIC: 1 µg/ml, 2xMIC: 2 µg/ml); Compound **10** (MIC: 2 µg/ml, 2xMIC: 4 µg/ml); Compound **16** (MIC: 12.5 µg/ml, 2xMIC: 25 µg/ml); Compound **17** (MIC: 2.5 µg/ml, 2xMIC: 5 µg/ml); Compound **18** (MIC: 2 µg/ml, 2xMIC: 4 µg/ml); **Ampicillin** (MIC: 200 µg/ml; 2xMIC: 400 µg/ml); **BAC** (MIC: 100 µg/ml, 2xMIC: 200 µg/ml).

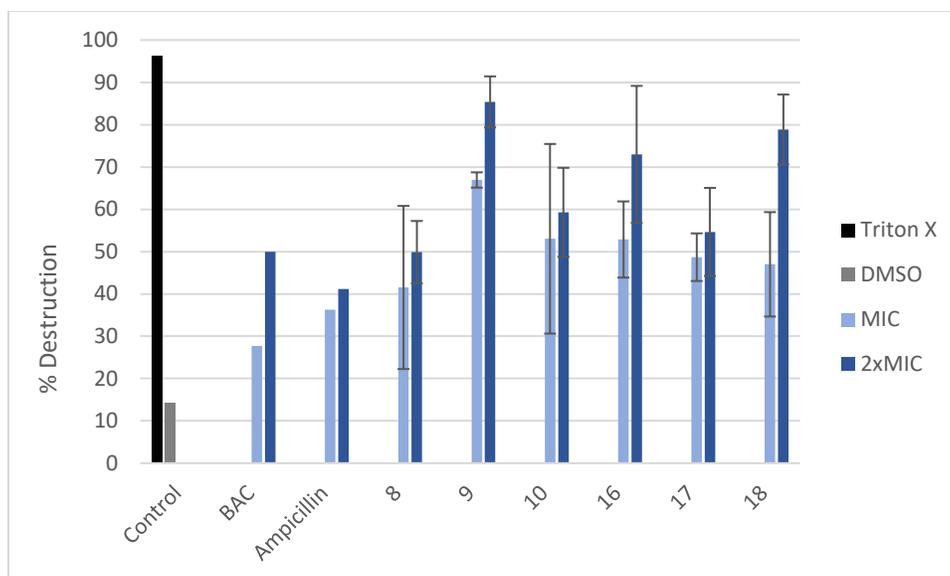


Figure 3.6: Average of three images of the destruction of mature *MRSA* biofilms labeled with *Live/Dead* stains after 48 h incubation at the MIC and 2xMIC concentration of the antimicrobials calculated with ImageJ software. Negative control (DMSO 10 %) and positive control (Triton X).

### 3.4 Conclusion

In conclusion, the new compounds presented here have a better ability to inhibit the proliferation of planktonic bacteria and yeasts than most antibiotics commercially available. In addition, we were able to determine that all compounds are better at disrupting mature biofilms than inhibiting their formation. Nevertheless, our new compounds are stronger antibiofilm agent than compounds such as BAC and ampicillin already available.

Finally, the most unexpected results are those which show that the presence of a rigid or more flexible scaffolding between the two benzimidazolium cations does not affect the antibiofilm properties of these compounds. These results, together with those obtained previously in the group, show that the cation benzimidazolium, used in combination with different lengths of alkyl chains leads to compounds that can insert into the bacterial membrane and to disturb it significantly.<sup>9</sup>

### 3.5 Reference

1. Levy, S. B.; Marshall, B., *Nat Med* **2004**, *10* (12), S122-129.
2. Palumbi, S. R., *Science* **2001**, *293* (5536), 1786-1790.
3. Furuya, E. Y.; Lowy, F. D., *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4* (1), 36-45.
4. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A. U., *Antimicrob Resist Infect Control* **2019**, *8*, 76-86.
5. Flemming, H. C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S., *Nat Rev Microbiol* **2016**, *14* (9), 563-575.
6. Donlan, R. M., *Clin Infect Dis* **2001**, *33* (8), 1387-1392.
7. Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R., *J Med Chem* **2015**, *58* (5), 2358-2366.
8. Tessier, J.; Lecluse, M.; Gravel, J.; Schmitzer, A. R., *ChemMedChem* **2018**, *13* (23), 2567-2572.
9. Tessier, J.; Schmitzer, A. R., *RSC Advances* **2020**, *10* (16), 9420-9430.
10. Hebert, A.; Parisotto, M.; Rowell, M. C.; Dore, A.; Fernandez Ruiz, A.; Lefrancois, G.; Kalegari, P.; Ferbeyre, G.; Schmitzer, A. R., *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 1-11.
11. Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R., *Org Biomol Chem* **2013**, *11* (6), 923-928.
12. Yasir, M.; Dutta, D.; Willcox, M. D. P., *Antibiotics (Basel)* **2021**, *10* (10), 1-17.
13. Allampally, N. K.; Daniliuc, C. G.; Strassert, C. A.; De Cola, L., *Inorg Chem* **2015**, *54* (4), 1588-1596.
14. Li, Q.; Huang, F.; Fan, Y.; Wang, Y.; Li, J.; He, Y.; Jiang, H., *European Journal of Inorganic Chemistry* **2014**, *2014* (20), 3235-3244.
15. Zamyatina, A., *Beilstein J Org Chem* **2018**, *14*, 25-53.
16. <https://docs.chemaxon.com/display/docs/logp-plugin.md> (Accessed 15 november 2021)
17. ThermoFisher, LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy & quantitative assays.

## Chapitre 4: Conclusion et perspective

### 4.1 Conclusion

Tout d'abord, les travaux présentés dans ce mémoire avaient pour but de montrer que les composés contenant deux cations benzimidazolium substitués par différentes chaînes aliphatiques ou aromatiques et d'un échafaudage phényl- ou pyridylphényléthynylène, avaient la capacité d'inhiber la croissance des bactéries Gram positif ou négatif et des levures. Les résultats obtenus ont montré que tous les composés avaient une meilleure activité contre les bactéries Gram positif. Cependant, nous avons tout de même constaté que les composés possédant des chaînes aliphatiques à quatre carbones avaient une meilleure activité contre les bactéries Gram négatifs que les autres composés. Ces résultats peuvent être expliqués par la balance hydrophilie/hydrophobie des composés et par le fait que les bactéries Gram négatif possèdent une deuxième membrane phospholipidique externe, ce qui les rend plus résistantes à ces composés.<sup>1</sup> En effet, les composés trop hydrophiles avec un log P inférieur à 1 ont probablement une capacité plus faible à passer les membranes phospholipidiques, alors que les composés hydrophobes (log P>5) s'accumulent probablement dans celle-ci.

Nous avons aussi montré que les composés étudiés avaient la capacité d'inhiber et de détruire la formation des biofilms *S. aureus*, avec une meilleure activité que les antibiotiques déjà existants sur le marché. Les composés possédant des chaînes à 8 carbones ont quant à eux montré la plus grande capacité à inhiber la formation des biofilms. Ces résultats ne sont pas surprenants, car notre groupe de recherche avait déjà montré que les sels d'imidazole et de benzimidazole substitué par des chaînes à 8 carbones avaient une bonne capacité inhibitrice des biofilms.<sup>2</sup> Les résultats les plus inattendus sont ceux qui montrent que la présence d'un échafaudage rigide ou plus flexible entre les deux cations benzimidazolium ne joue aucunement sur les propriétés antibiofilm de ces composés. Ces résultats, aux côtés de ceux obtenus précédemment dans le groupe

montrent que le cation benzimidazolium, utilisé en combinaison avec différentes longueurs de chaînes alkyles conduit à l'obtention de composés qui ont la capacité de s'insérer dans la membrane bactérienne et de la perturber de manière significative. Nous n'avons pas encore de preuve que l'introduction d'un espaceur rigide entre les deux cations benzimidazolium a conduit à l'obtention d'un autre type d'agrégats à l'intérieur de la membrane, mais l'obtention des cristaux dans le chloroforme, qui mime l'intérieur hydrophobe de la bicouche phospholipidique est en cours. Lorsque des cristaux de qualité seront obtenus, l'analyse par rayons X nous confirmera si des autoassemblages différents sont obtenus pour ces nouveaux composés. D'autre part, des études sur la résistance des bactéries développée face à ces nouveaux composés nous permettront de valider leur potentiel d'utilisation comme agents antimicrobiens à long terme.

## 4.2 Perspective

Pour la poursuite du projet, nos composés pourraient être testés sur des biofilms en utilisant la méthode en flux continu. En effet, les cuves à flux continu devraient nous permettre de former un biofilm bactérien à l'interface solide-liquide dans des conditions hydrodynamiques constantes et d'un approvisionnement continu d'éléments nutritifs. Ce système pourrait reproduire assez bien les conditions environnementales auxquelles sont exposés les biofilms. De plus, il serait possible de visualiser facilement et en temps réel le biofilm sous un microscope confocal. Ceci permettrait également d'étudier la possibilité d'un éventuel traitement contre les maladies pulmonaires et buccales, car, le système en flux continu reproduit assez bien l'environnement des poumons et de la cavité buccale.<sup>3-</sup>

5

### 4.3 Référence

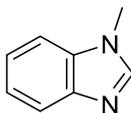
1. Zamyatina, A., *Beilstein J Org Chem* **2018**, *14*, 25-53.
2. Tessier, J.; Schmitzer, A. R., *RSC Advances* **2020**, *10* (16), 9420-9430.
3. Zaquen, N.; Yeow, J.; Junkers, T.; Boyer, C.; Zetterlund, P. B., *Macromolecules* **2018**, *51* (14), 5165-5172.
4. Teodosio, J. S.; Simoes, M.; Melo, L. F.; Mergulhao, F. J., *Biofouling* **2011**, *27* (1), 1-11.
5. Pamp, S. J.; Sternberg, C.; Tolker-Nielsen, T., *Cytometry A* **2009**, *75* (2), 90-103.

## Annexe 1:

### A1.1 Materials and methods

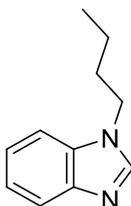
$^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded on 400 and 75 MHz spectrometers, respectively, in the indicated solvent. Chemical shifts are reported in ppm with internal reference to TMS, and J values are given in Hertz. The purity of final compounds used in biological assays was determined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

### A1.2 Synthesis and characterization

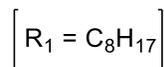
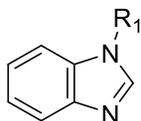


**1-Methylbenzimidazole (2):** To a solution of benzimidazole (3.00 g, 25.4 mmol) in 12.7 mL of DMF, KOH (2.85 g, 50.8 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at 20 °C and iodomethane (3.96 g, 27.9 mmol) was added dropwise under vigorous stirring. After 12 h at 80 °C, the mixture was diluted with 50 mL of water and the organic layer was extracted with ethyl acetate (3 x 25 mL). The organic layers were combined and washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography (100 % ethyl acetate) to obtain 1-methylbenzimidazole as a brown oil in 94 % yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.18 (s, 1H), 7.66 (dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H), 7.58 – 7.51 (m=dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz 1H), 7.27 (td,  $J 7.6, 1.3$  Hz, 1H), 7.21 (td,  $J = 7.2, 1.3$  Hz, 1H), 3.83 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  162.78,

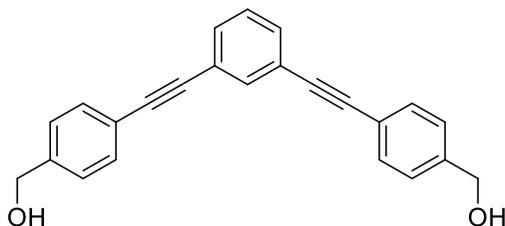
145.00, 143.78, 135.04, 122.68, 121.88, 119.73, 110.61, 31.08. LCMS (ESI): calcd. for  $[M+H]^+$   $C_8H_8N_2$ : 133.0760, found 133.0759.



**1-butylbenzimidazole (3):** To a solution of benzimidazole (3.00 g, 25.4 mmol) in 11.5 mL of DMSO, KOH (2.85 g, 50.8 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at 20 °C and 1-bromobutane (3.83 g, 27.9 mmol) was added dropwise under vigorous stirring. After 12 h at 80 °C, the mixture was diluted with 50 mL of water and the organic layer was extracted with ethyl acetate (3 x 25 mL). The organics layers were combined and washed with brine and dried over  $Na_2SO_4$ . The solvent was removed under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography (100 % ethyl acetate) to obtain 1-butylbenzimidazole as a brown oil in 83 % yield.  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.22 (s, 1H), 7.65 (dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H), 7.58 (dt,  $J = 7.8, 1.0$  Hz, 1H), 7.24 (td,  $J = 7.6, 1.3$  Hz, 1H), 7.19 (td,  $J = 7.1, 1.3$  Hz, 1H), 4.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.82 – 1.70 (p,  $J = 7$  Hz, 2H), 1.31 – 1.17 (h,  $J = 7$  Hz, 2H), 0.87 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  144.47, 143.95, 134.29, 122.63, 121.98, 121.80, 119.89, 110.83, 44.25, 31.92, 19.83, 13.88. ; LCMS (ESI): calcd. for  $[M+H]^+$   $C_{11}H_{14}N_2$ : 175.1230, found 175.1227.

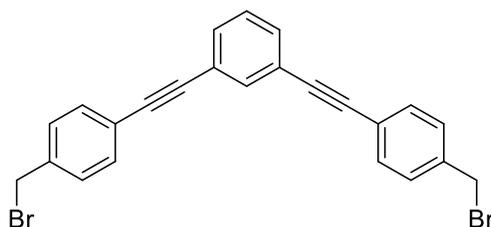


**1-Octylbenzimidazole (4):** To a solution of benzimidazole (6.00 g, 50.8 mmol) in 23.0 mL of DMSO, KOH (5.70 g, 102 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min at 20 °C and 1-bromooctane (10.8 g, 55.9 mmol) was added dropwise under vigorous stirring. After 12 h at 80 °C, the mixture was diluted with 50 mL of water and the organic layer was extracted with ethyl acetate (3 x 25 mL). The organic layers were combined and washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography (100 % ethyl acetate) to obtain 1-octylbenzimidazole as a brown oil in 77 % yield.<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.21 (s, 1H), 7.65 (dt, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.58 (dt, 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.23 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.76 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.28 – 1.14 (m, 11H), 0.81 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 144.44, 143.98, 134.27, 122.59, 121.76, 119.89, 110.76, 44.52, 31.63, 29.84, 29.05, 28.94, 26.58, 22.51, 14.34.; LCMS (ESI): calcd. for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>: 231.1856, found 231.1855.

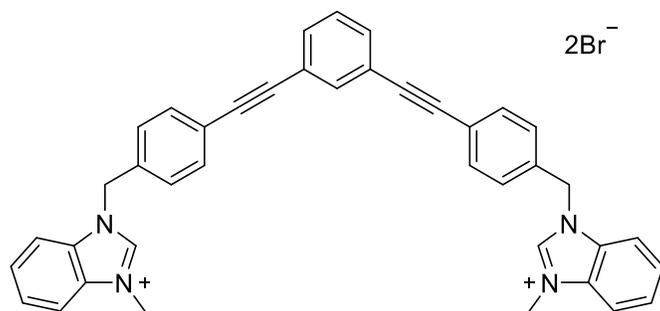


**((1,3-phenylenebis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))dimethanol (6) :** To a solution of 4-iodobenzyl alcohol (2.56 g, 10.09 mmol) in degassed piperidine (15 mL, copper iodide (I) (16.3 mg, 85.6 μmol), bis(triphenylphosphine) palladium (II) chloride (57.8 mg, 82.3 μmol) were added. The solution was cooled down to 0 °C under nitrogen and 1,3-

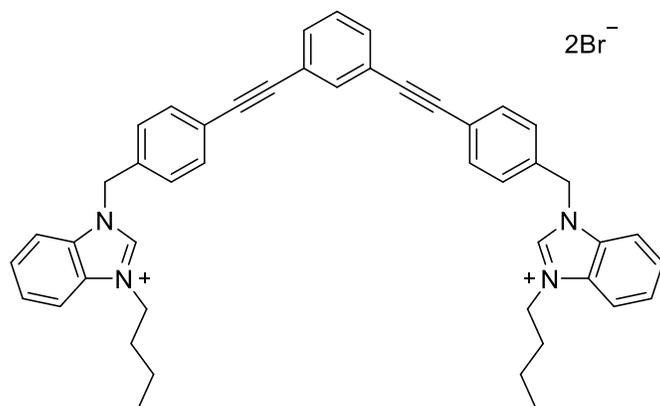
diethynylbenzene (600 mg, 4.76 mmol) was added dropwise over 5 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 3h. The crude was dissolved in acetone and precipitated in water. The product was isolated by filtration to afford the diol as white powder in 100 % yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.71 (t,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.60 – 7.51 (m, 6H), 7.47 (t,  $J$ =8Hz, 1H), 7.39 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 4H), 5.31 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 4.54 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  144.23, 134.30, 131.82, 131.76, 129.84, 127.11, 123.54, 120.60, 90.80, 88.35, 62.97; LCMS (ESI): calcd. for  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{O}_2$ : 361.1199, found 361.1197.



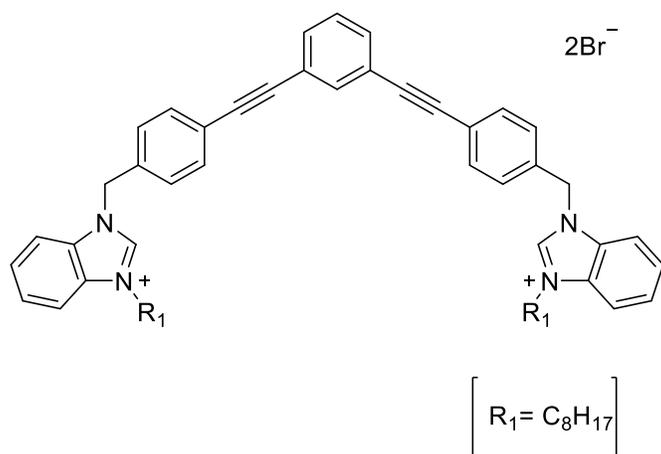
**1.3-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)benzene (7):** To a solution of ((1.3-phenylenebis(ethyne-2.1-diyl))bis(4.1-phenylene))dimethanol (500 mg, 1.48 mmol) in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.00 mL), phosphorus tribromide (694  $\mu\text{L}$ , 7.39 mmol) was added dropwise at 0 °C. The reaction was warmed to room temperature. After 2h, the solution was slowly quenched with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x 20 mL). The organic layers were combined and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure and the crude reaction mixture was purified on silica gel (1:99 ethyl acetate / hexane) to yield the dibromide as a yellow powder with 68 % yield.;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  7.80 – 7.73 (m, 1H), 7.64 – 7.47 (m, 11H), 4.76 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO)  $\delta$  138.94, 134.00, 132.36, 132.17, 131.76, 129.71, 122.79, 121.81, 89.78, 88.93, 33.81. It was impossible to determine the exact mass because the compound does not ionize.



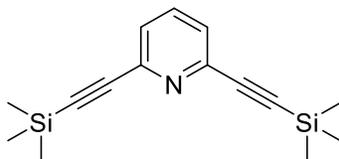
**1,1'-(((1,3-phenylenebis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))bis(methylene))bis(3-methyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium) dibromide (8):** To a solution of 1,3-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)benzene (100 mg, 215  $\mu\text{mol}$ ) in acetonitrile (1.15 mL), 1-methylbenzimidazole (71.2 mg, 539  $\mu\text{mol}$ ) was added and the solution was stirred 48 h at 80  $^{\circ}\text{C}$ . The reaction mixture was diluted in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and precipitated in hexane. The product was dried under vacuum to obtain 95 % yield as white-grey powder. Purity 100 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  9.86 (s, 2H), 8.05 (dd,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 2H), 7.92 (dd,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 2H), 7.74 – 7.53 (m, 15H), 7.50 (t,  $J = 8$  Hz 1H), 5.83 (s, 4H), 4.11 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  143.15, 134.87, 133.93, 132.08, 131.97, 131.73, 130.69, 128.63, 126.69, 126.62, 122.70, 122.25, 113.81, 113.62, 89.53, 88.91, 49.41, 33.43.; LCMS (ESI): calcd. for  $[\text{M}+2]$   $\text{C}_{40}\text{H}_{32}\text{N}_4$ : 284.1308, found 284.1297; IR (neat  $\text{cm}^{-1}$ ) 3384, 2925, 1608, 1509, 1450, 1274, 1092; Melting point: 292-294  $^{\circ}\text{C}$



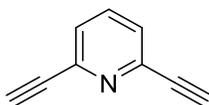
**1,1'-(((1,3-phenylenebis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))bis(methylene))bis(3-butyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium) dibromide (9):** To a solution of 1,3-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)benzene (80 mg, 172  $\mu\text{mol}$ ) in acetonitrile (1 mL), 1-butylbenzimidazole (75.1 mg, 431  $\mu\text{mol}$ ) was added and the solution was stirred 48 h at 80  $^{\circ}\text{C}$ . The reaction mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and precipitated in hexane. The product was dried under vacuum to obtain 78 % yield as white-grey powder. Purity 100 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 10.01 (s, 2H), 8.11 (d,  $J = 8$  Hz, 2H), 7.92 (d,  $J = 8$  Hz, 2H), 7.68-7.55 (m, 16H), 5.82 (s, 4H), 4.51 (t,  $J = 8$  Hz, 4H), 1.90 (m, 4H), 1.35 (m, 4H), 0.92 (t,  $J = 8$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 142.58, 134.87, 133.97, 132.01, 131.75, 131.37, 130.87, 129.53, 128.68, 126.77, 126.71, 122.71, 122.27, 113.97, 113.84, 89.55, 88.94, 49.55, 46.64, 30.46, 19.14, 13.44; LCMS (ESI): calcd. for  $[\text{M}+2]$   $\text{C}_{46}\text{H}_{44}\text{N}_4$ : 326.1777, found 326.1765; IR (neat  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400, 2956, 1607, 1557, 1445, 1272, 1112; Melting point: 253-258  $^{\circ}\text{C}$



**1,1'-(((1,3-phenylenebis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))bis(methylene))bis(3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium) dibromide (10):** To a solution of 1,3-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)benzene (150 mg, 323  $\mu$ mol) in acetonitrile (1.65 mL), 1-octylbenzimidazole (186 mg, 808  $\mu$ mol) was added and the solution was stirred 24 h at 80  $^{\circ}$ C. The reaction mixture was diluted with  $CH_2Cl_2$  and precipitated in hexane. The product was dried under vacuum to obtain 95 % yield as white-grey powder. Purity 99.21 %.  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  10.00 (s, 2H), 8.13 (dd,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 2H), 7.95 (dd,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 2H), 7.76 – 7.63 (m, 5H), 7.63 – 7.54 (m, 10H), 7.49 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 5.83 (s, 4H), 4.52 (t,  $J = 7.3$  Hz, 4H), 1.93 (q,  $J = 7.1$  Hz, 4H), 1.42 – 1.11 (m, 21H), 0.84 (t,  $J = 6.6$  Hz, 6H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  142.55, 134.89, 133.92, 131.98, 131.73, 131.33, 130.86, 129.51, 128.64, 126.77, 126.70, 122.69, 122.26, 113.95, 113.82, 89.51, 88.92, 49.52, 46.86, 31.13, 28.50, 28.39, 25.77, 22.05, 13.93. LCMS (ESI): calcd. for  $[M+2]$   $C_{54}H_{60}N_4$ : 382.2403, found 382.2420; IR (neat  $cm^{-1}$ ) 3121, 3009, 2952 1605, 1557, 1452, 1219, 1060; Melting point: 232-237  $^{\circ}$ C

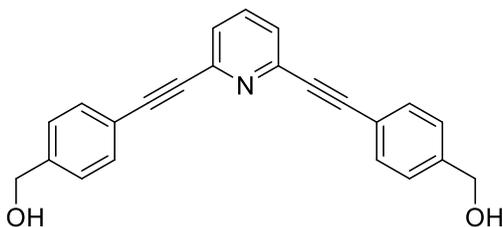


**2.6-bis((trimethylsilyl)ethynyl)pyridine (12):** To a solution of 2.6-dibromopyridine (300 mg, 1.27 mmol) in degassed toluene (6.00 mL), copper (I) iodide (24.10 mg, 127  $\mu$ mol), tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0) (146 mg, 127  $\mu$ mol) and piperidine (751  $\mu$ L, 7.60 mmol) was added. After 5 minutes stirring, ethynyltrimethylsilane (526  $\mu$ L, 3.80 mmol) was slowly added and the reaction was stirred overnight under nitrogen. The reaction was quenched with water and the organic layer was extracted 3x with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic layer was washed with saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The reaction mixture was concentrated on a rotavap and the product was purified by flash chromatographic. (25:75 hexane/DCM) in 100 % yield as a pink-brown powder.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 7.83 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8$  Hz, 2H), 0.27 (s, 18H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  142.69, 138.17, 127.51, 103.87, 95.10, 0.04. LCMS (ESI): calcd. for  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NSi}_2$ : 272.1285, found 272.1285.

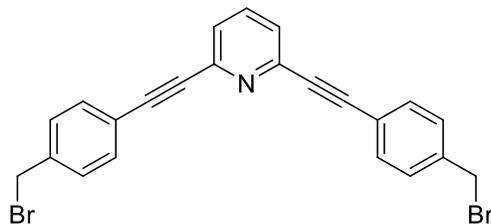


**2.6-diethynylpyridine (13):** To a solution of 2.6-bis((trimethylsilyl)ethynyl)pyridine (1.50 g, 5.52 mmol) in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (27.6 mL), TBAF (3.61 g, 13.8 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature for 3-4 h. The reaction was quenched with water and the organic layer was extracted 3x with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under pressure and the crude reaction mixture was purified on silica gel (50:50 ethyl acetate / hexane) to afford 2.6-diethynylpyridine as white-brown powder in 80 % yield.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 7.81 (t,  $J = 10$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 10$  Hz, 2H), 4.36 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$

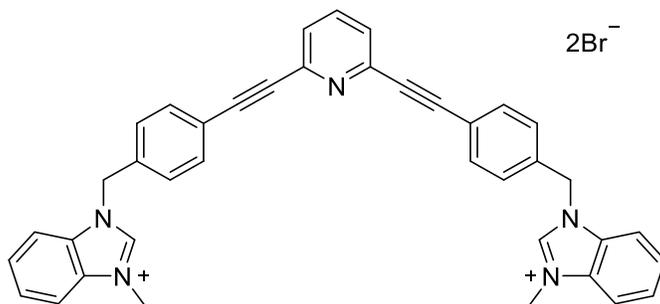
142.10, 137.78, 127.40, 82.31, 80.85. LCMS (ESI): calcd. for  $[M+H]^+$   $C_9H_5N$ : 128.0495, found 128.0495.



**((pyridine-2,6-diylbis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))dimethanol (14)**: To a solution of 4-iodobenzyl alcohol (1.24 g, 5.31 mmol) in degassed toluene (9.83 mL), triphenylphosphine (77.4 mg, 295  $\mu$ mol), copper(I) iodide (37.4 mg, 197  $\mu$ mol), bis(triphenylphosphine) palladium(II) chloride (138 mg, 197  $\mu$ mol) and triethylamine (0.726 mL, 11.8 mmol) was added. After 5 minutes stirring, 2,6-diethynylpyridine was slowly added and the mixture was stirred 24 h under nitrogen at ambient temperature. The reaction was quenched with water and the organic layer was extracted 3x with  $CH_2Cl_2$ . The combined organic layer was washed with a 1M aqueous  $NH_4Cl$  solution and dried over  $Na_2SO_4$ . The reaction mixture was concentrated on a rotavap and the product was obtained by flash chromatographic (80:20 hexane/ethyl acetate and 10:35:55 methanol/hexane/ethyl acetate) in 72 % yield as a yellow-orange powder.  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.92 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.68 – 7.58 (m, 6H), 7.43 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 4H), 5.35 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 4.56 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 4H).  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  144.92, 143.28, 138.12, 132.07, 127.18, 127.09, 119.69, 89.62, 88.39, 62.93. LCMS (ESI): calcd. for  $[M+H]^+$   $C_{23}H_{17}NO_2$ : 340.1332, found 340.1344.

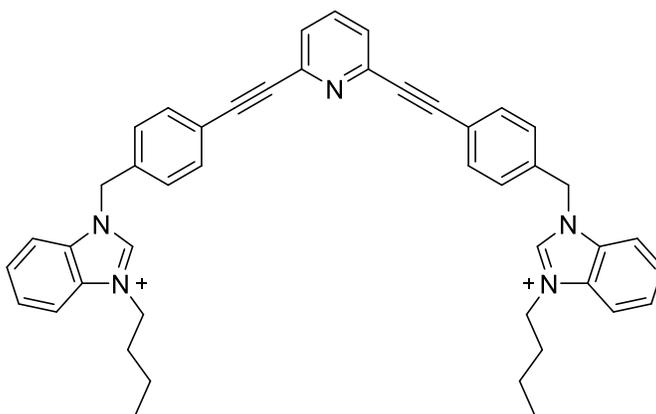


**2,6-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)pyridine (15):** To a solution of ((pyridine-2,6-diylbis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))dimethanol (330 mg, 972  $\mu\text{mol}$ ) in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.00 mL), phosphorus tribromide (274  $\mu\text{L}$ , 2.92 mmol) was added drop wise to the solution at 0 °C. The reaction was warmed to room temperature. After 2h, the solution was slowly quenched with saturate aqueous  $\text{NaHCO}_3$  and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x 20 mL). The organic layers were combined and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under pressure and the crude reaction mixture was purified on silica gel (70:30 ethyl acetate / hexane) to obtain dibromide as yellow powder in 44 % yield.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  7.92 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.70 – 7.59 (m, 6H), 7.54 (d,  $J = 8.3$  Hz, 4H), 4.75 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  144.53, 142.70, 137.83, 131.81, 131.63, 126.73, 119.20, 89.37, 87.82, 62.46. LCMS (ESI): calcd. for  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{Br}_2\text{N}$ : 465.9625, found 465.9644.



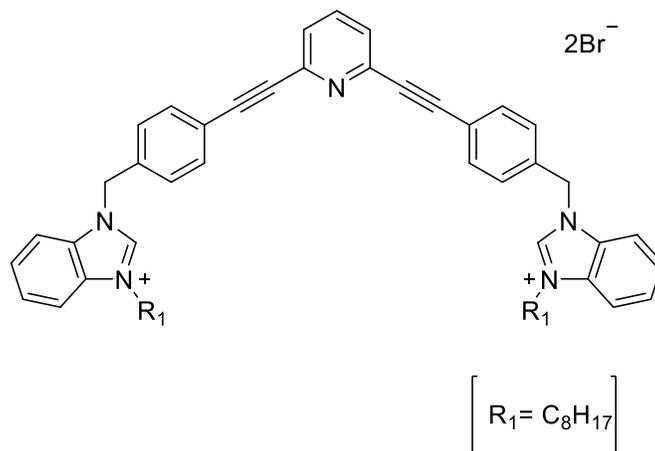
**1,1'-(((pyridine-2,6-diylbis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))bis(methylene))bis(3-methyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium) dibromide (16):** To a solution of 1,3-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)pyridine (130 mg, 279  $\mu\text{mol}$ ) in acetonitrile (1.40 mL), 1-methylbenzimidazole (77.6 mg, 587  $\mu\text{mol}$ ) was added and the solution was stirred 48 h at

80 °C. The reaction mixture was diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and crashed in hexane. The product was dried under vacuum to obtain 85 % yield as pale-brown powder. Purity 99.15 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.94 (s, 2H), 8.08 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz 2H), 7.99 – 7.90 (m, 3H), 7.76 – 7.63 (m, 10H), 7.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 5.88 (s, 4H), 4.13 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 143.17, 142.52, 137.84, 135.59, 132.28, 132.06, 130.68, 128.70, 126.69, 126.61, 121.35, 113.82, 113.62, 88.79, 88.27, 49.33, 33.46; LCMS (ESI): calcd. for [M+2] C<sub>39</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>: 284.6284, found 284.6287; IR (neat cm<sup>-1</sup>) 3406, 2904, 2211, 1618, 1556, 1509, 1444, 1230, 1091; Melting point: 236-238 °C.



**1,1'-(((pyridine-2,6-diylbis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))bis(methylene))bis(3-butyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium) dibromide (17):** To a solution of 1,3-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)pyridine (210 mg, 451 μmol) in acetonitrile (1 mL), 1-butylbenzimidazole (165 mg, 948 μmol) was added and the solution was stirred 48 h at 80 °C. The reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and crashed in hexane. The product was dried under vacuum to obtain 60 % yield as pink powder. Purity 95.98 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.04 (s, 2H), 8.14 (dt, *J* = 8.2, 1.7 Hz 2H), 7.94 (dt, *J* = 8.2, 1.7 Hz 2H), 7.74 – 7.60 (m, 8H), 7.58 (m, 7H), 7.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.84 (s, 4H), 4.53 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.98 – 1.88 (p, *J* = 7.4 Hz 4H), 1.43 – 1.32 (h, *J* = 7.4 Hz 4H), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO) δ 142.58, 134.86, 133.97, 132.01, 131.75, 131.37, 130.87, 129.52, 128.68, 126.77, 126.71, 122.70, 122.27, 113.97, 113.84, 89.54, 88.94, 49.55, 46.64, 30.46,

19.14, 13.43.; LCMS (ESI): calcd. for [M+2] C<sub>45</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>: 326.6754, found 326.6769; IR (neat cm<sup>-1</sup>) 3402, 2904, 2213, 1609, 1556, 1510, 1441, 1287, 1113; Melting point: 262-266 °C.



**1.1'-(((pyridine-2,6-diylbis(ethyne-2,1-diyl))bis(4,1-phenylene))bis(methylene))bis(3-octyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium) dibromide (18):** To a solution of 1,3-bis((4-(bromomethyl)phenyl)ethynyl)pyridine (109 mg, 234 μmol) in acetonitrile (1.20 mL), 1-octylbenzimidazole (124 mg, 539 μmol) was added and the solution was stirred 48 h at 80 °C. The reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and precipitated in hexane. The product was dried under vacuum to obtain 30 % yield as pink powder. Purity 90.69 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.00 (s, 2H), 8.13 (dd, *J* = 7.1, 1.9 Hz, 2H), 7.96 (dd, *J* = 7.1, 1.9 Hz, 2H), 7.92 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.74 – 7.63 (m, 9H), 7.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 5.85 (s, 4H), 4.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.93 (p, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.35 – 1.23 (m, 18H), 0.84 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 143.08, 143.01, 138.32, 136.07, 132.80, 131.82, 131.36, 129.16, 127.53, 127.27, 127.19, 121.87, 114.44, 114.28, 89.28, 88.73, 49.96, 47.35, 31.62, 28.97, 28.87, 26.26, 22.52, 14.42; LCMS (ESI): calcd. for [M+2] C<sub>53</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>: 382.7380, found 382.7391; IR (neat cm<sup>-1</sup>) 3375, 2921, 2212, 1608, 1554, 1509, 1439, 1165, 1113; Melting point: 239-243 °C.

## A1.3 Methods for biology assays

### A1.3.1 Culture conditions and viability tests for bacteria and yeast

MICs were determined in 96-well cell culture plates. The tests were carried out in a growing Luria Broth (LB) medium at 37°C in triplicate. The optical density of bacterial cells (OD 0.1 to 600 nm) was measured with a Fischer Scientific 40 cell density meter model and UV-vis spectroscopy experiments were performed on a Tecan Infinite M200 microplate reader.

### A1.3.2 Biofilm inhibition assay

The *S. aureus* were incubated in a 37° C LB medium for 12 h and re-diluted in the LB medium to be incubated again. After 2 h incubation, the cells were re-diluted at the final concentration (DO 600nm = 0.1-0.15). The biofilms of *S. Aureus* were marked with a Live/Dead stain after 48 h incubation with antibiotics in a growing medium (LB) in an 8-well glass plate. Negative control: DMSO (final concentration 5 % volume). Positive control: 20% Triton X.

### A1.3.3 Biofilm disruption assay

The *S. aureus* were incubated in a 37° C LB medium for 12 h and re-diluted in the LB medium to be incubated again. After 2 h incubation, the cells were re-diluted at the final concentration (DO 600nm = 0.1-0.15). After an incubation of 48 h in 8-well chambers, the growth media was removed and the biofilms were washed two times with PBS solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, in 200 µL of distilled water) to remove planktonic cells. The *S. aureus* biofilms were incubated with antibiotics for 24 h in PBS solution. Negative control: DMSO (final concentration 5 % volume). Positive control: 20% triton.

### A1.3.4 Biofilm staining and confocal laser scanning microscopy (LSM) analysis

Biofilms stained with FilmTracer™ LIVE / DEAD® Biofilm viability Kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd.). A fluorescent marker solution was prepared by adding 1

$\mu\text{L}$  of SYTO<sup>®</sup> 9 dye and 1  $\mu\text{L}$  of PI dye in 1 ml of filter-sterilized water. One hundred  $\mu\text{L}$  of staining solution were added to each well of an 8-well glass plate containing the mature biofilm. After 30 min at room temperature in the dark, the samples were washed with a saline phosphate buffer (PBS) solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, in 200  $\mu\text{L}$  of distilled water). The biofilms were then observed with a confocal laser microscope (model Leica TCS SP5; Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Germany) using a 20x lens (HC PL FLUOTAR 20.0 x 0.70 DRY). A 483 nm laser was used to excite SYTO<sup>®</sup> 9, while fluorescent emission was detected from 500 to 540 nm. The PI was excited with a laser at 535 nm and its fluorescent emission was detected from 600 to 695 nm.

#### A1.3.5 Haemolytic assay

The red blood cells (RBCs) in Alserver's solution were diluted in PBS buffer and centrifuged 10 min. at 2000 rpm. The RBCs were washed two more times with PBS buffer until the surface liquid was crystal clear and were resuspended in PBS at 2% v/v. In a 96 wells plate was added 195  $\mu\text{L}$  of red blood cells solution and 5  $\mu\text{L}$  of compound in DMSO. The plate was incubated with light agitation (25 rpm) for 1 h at 37 °C. The plate was then centrifuged for 10 min. at 2000 rpm and 100  $\mu\text{L}$  of the supernatant was transferred to another plate to analyse the absorbance ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) with a Tecan Infinite M200 microplate reader.

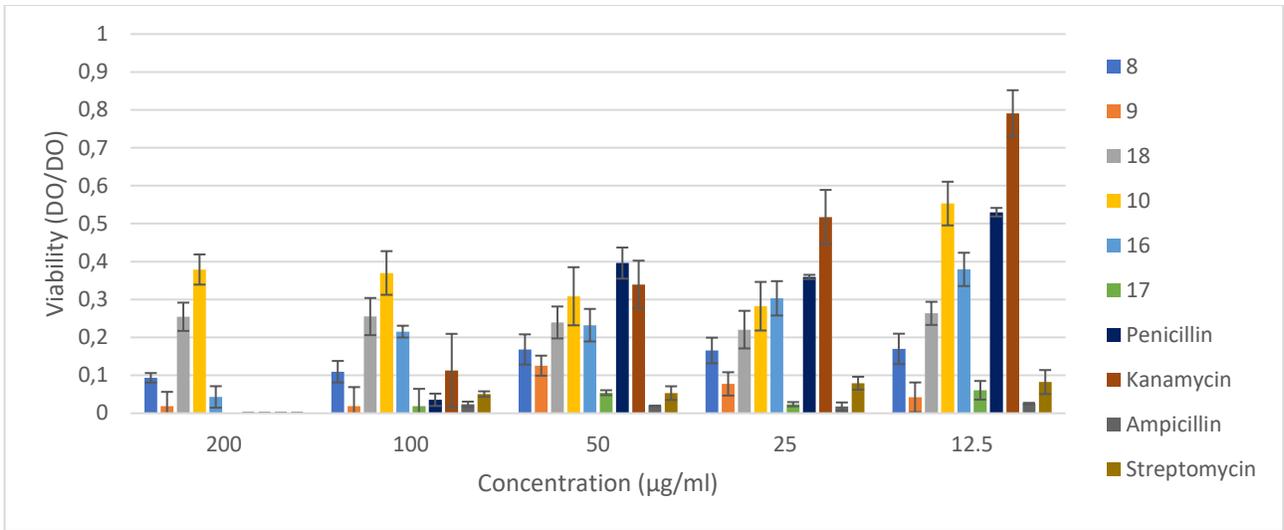


Figure A1.3.1: Average percent viability in triplicate for *E. Coli* (SK037).

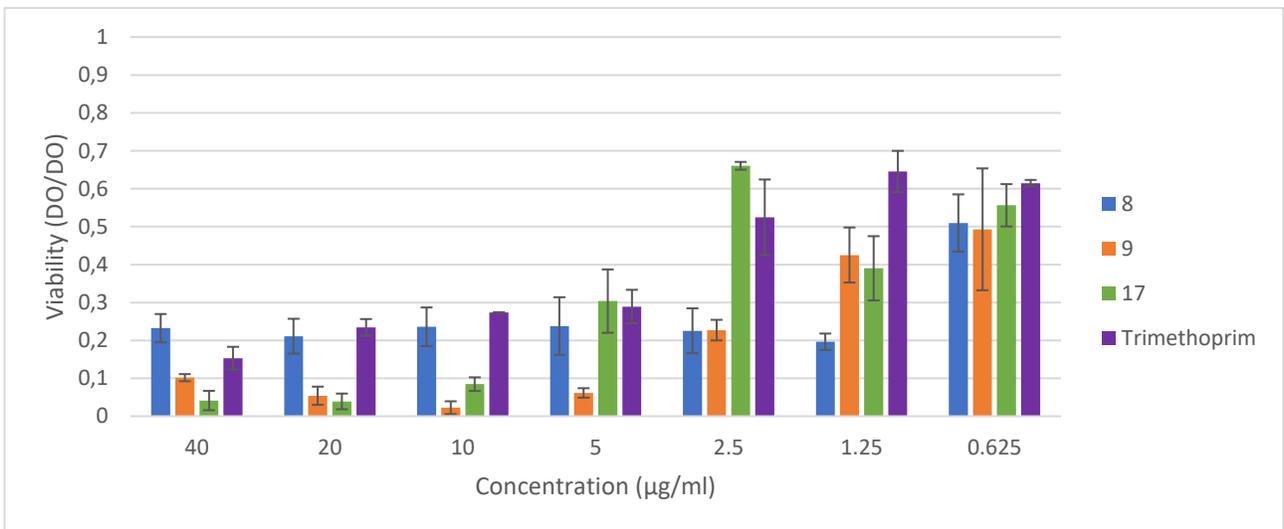


Figure A1.3.2: Average percent viability in triplicate for *E. Coli* (SK037).

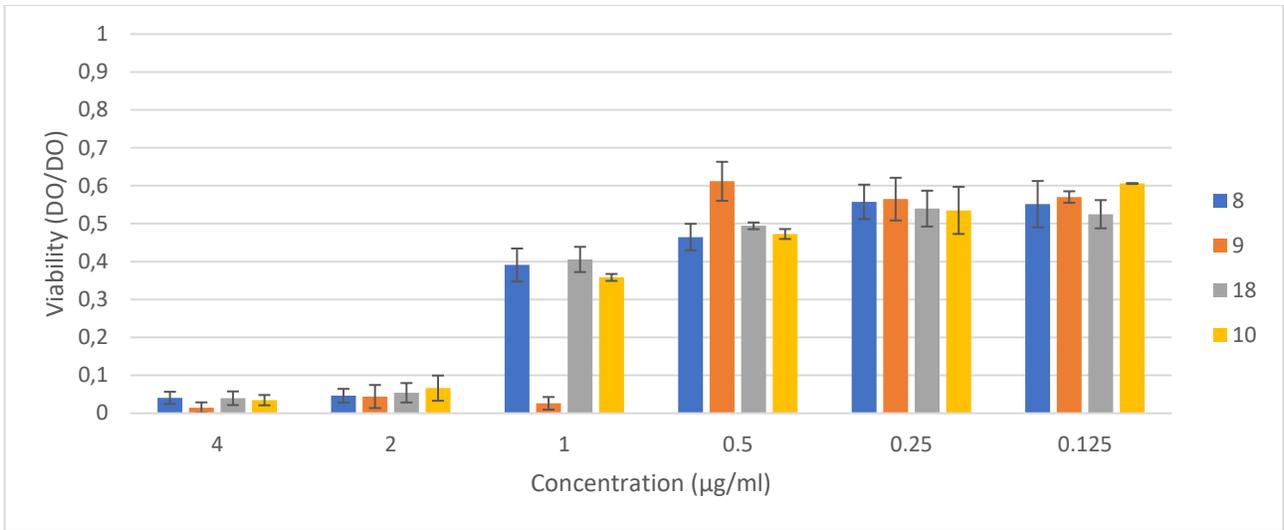


Figure A1.3.3: Average percent viability in triplicate for *MRSA = Methicillin-resistant S. aureus* (ATCC 43300).

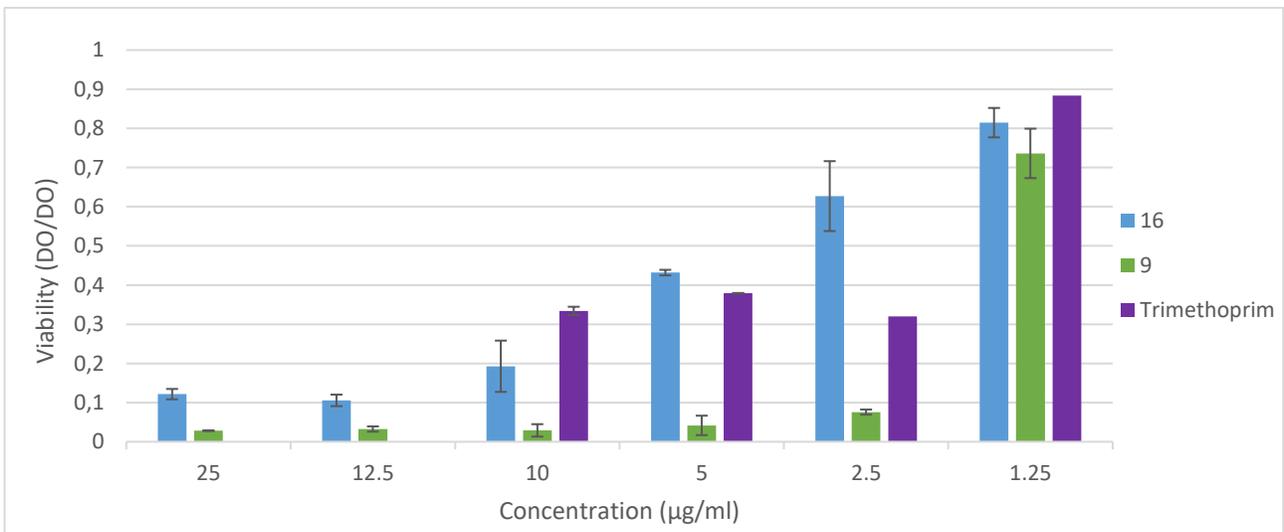


Figure A1.3.4: Average percent viability in triplicate for *MRSA = Methicillin-resistant S. aureus* (ATCC 43300).

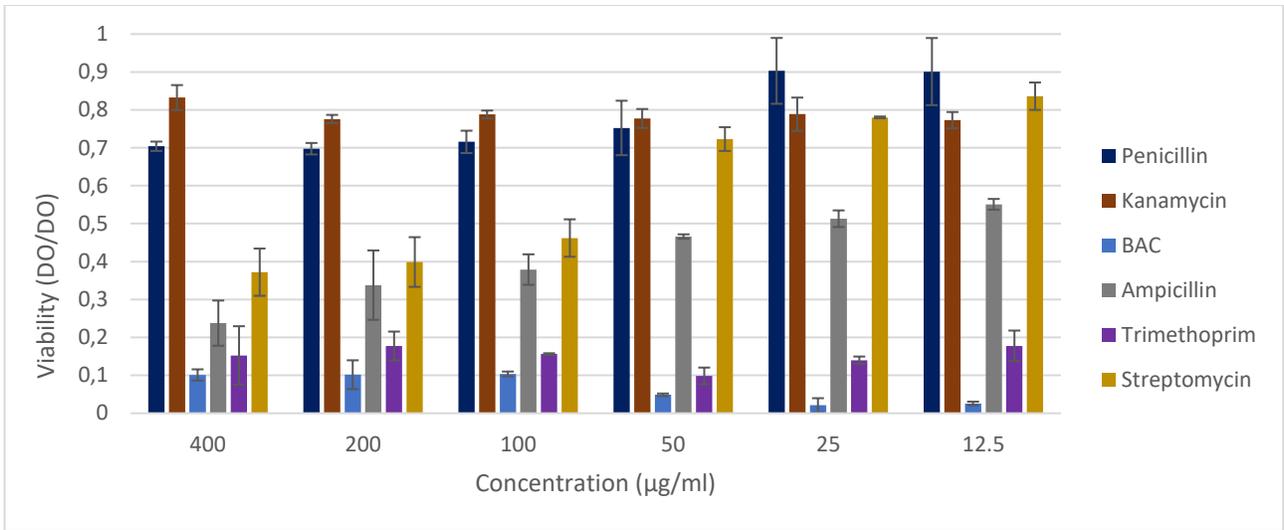


Figure A1.3.5: Average percent viability in triplicate for MRSA = Methicillin-resistant *S. aureus* (ATCC 43300).

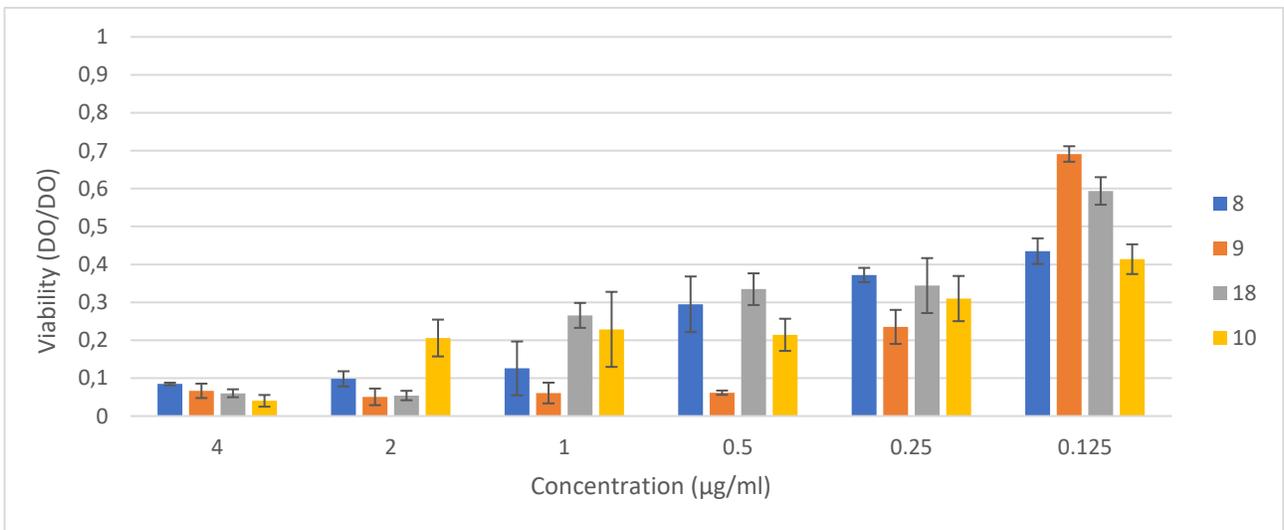


Figure A1.3.6: Average percent viability in triplicate for VRE = vancomycin-resistant *E. faecium* (BAA-2316).

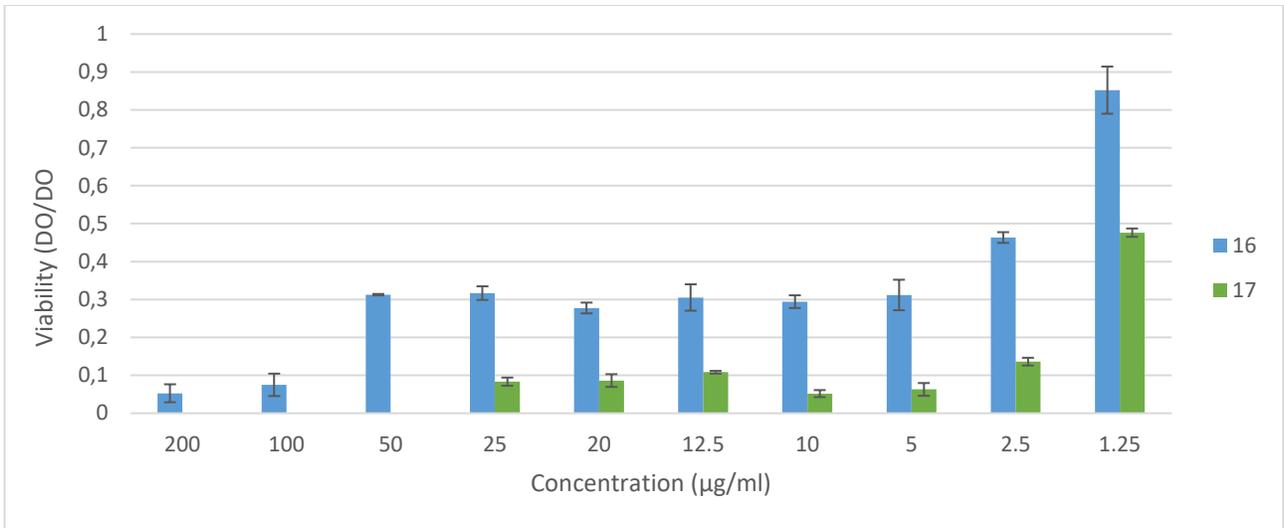


Figure A1.3.7: Average percent viability in triplicate for VRE = vancomycin-resistant *E. faecium* (BAA-2316).

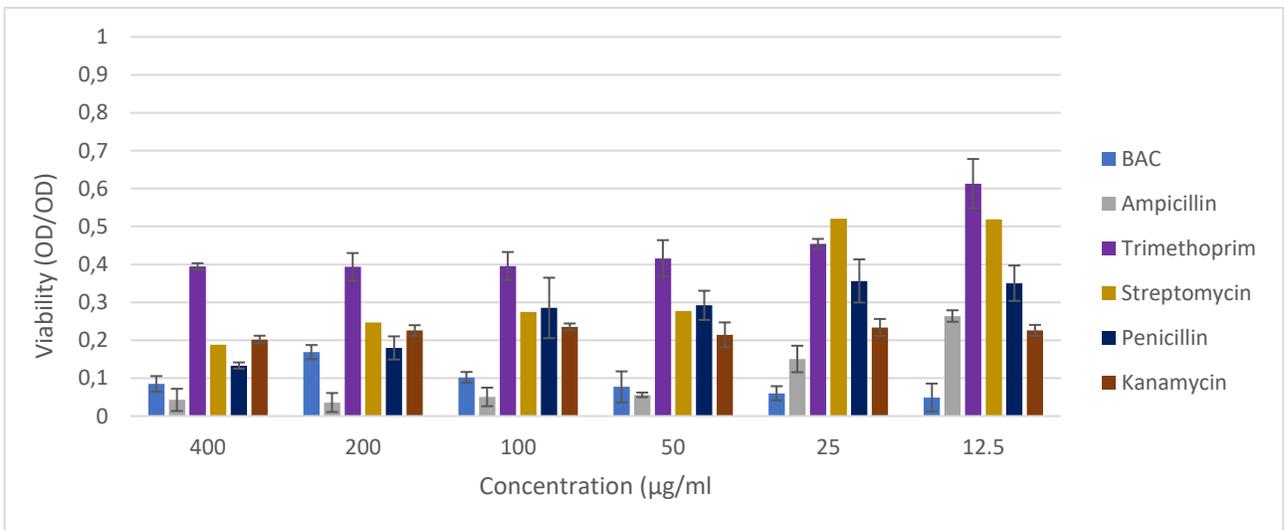


Figure A1.3.8: Average percent viability in triplicate for VRE = vancomycin-resistant *E. faecium* (BAA-2316).

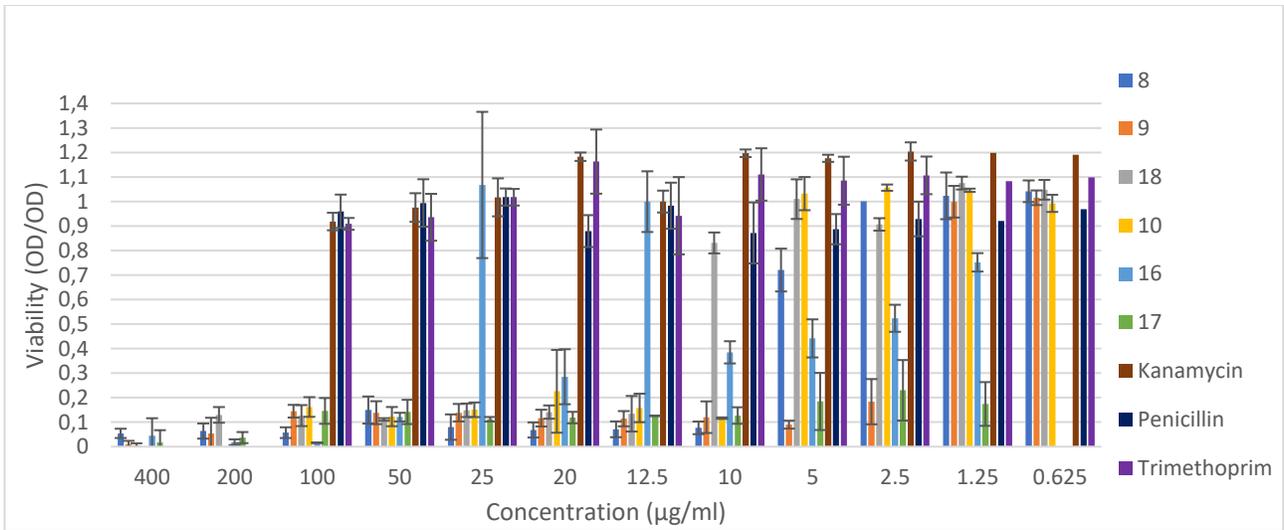


Figure A1.3.9: Average percent viability in triplicate for *C. albicans* (SC5314).

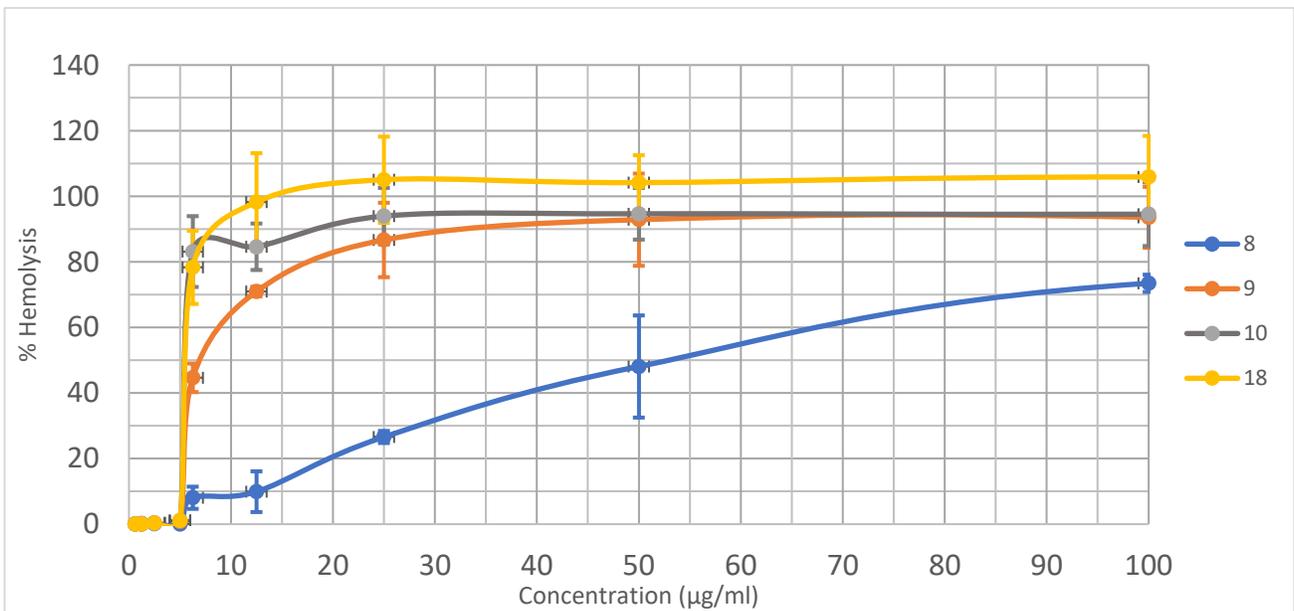
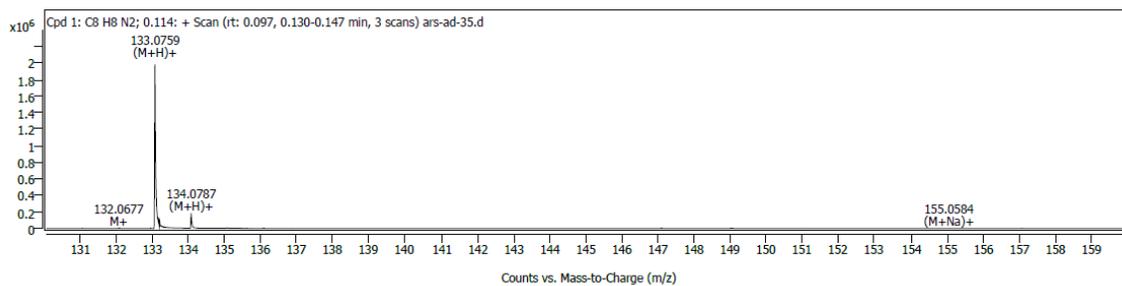
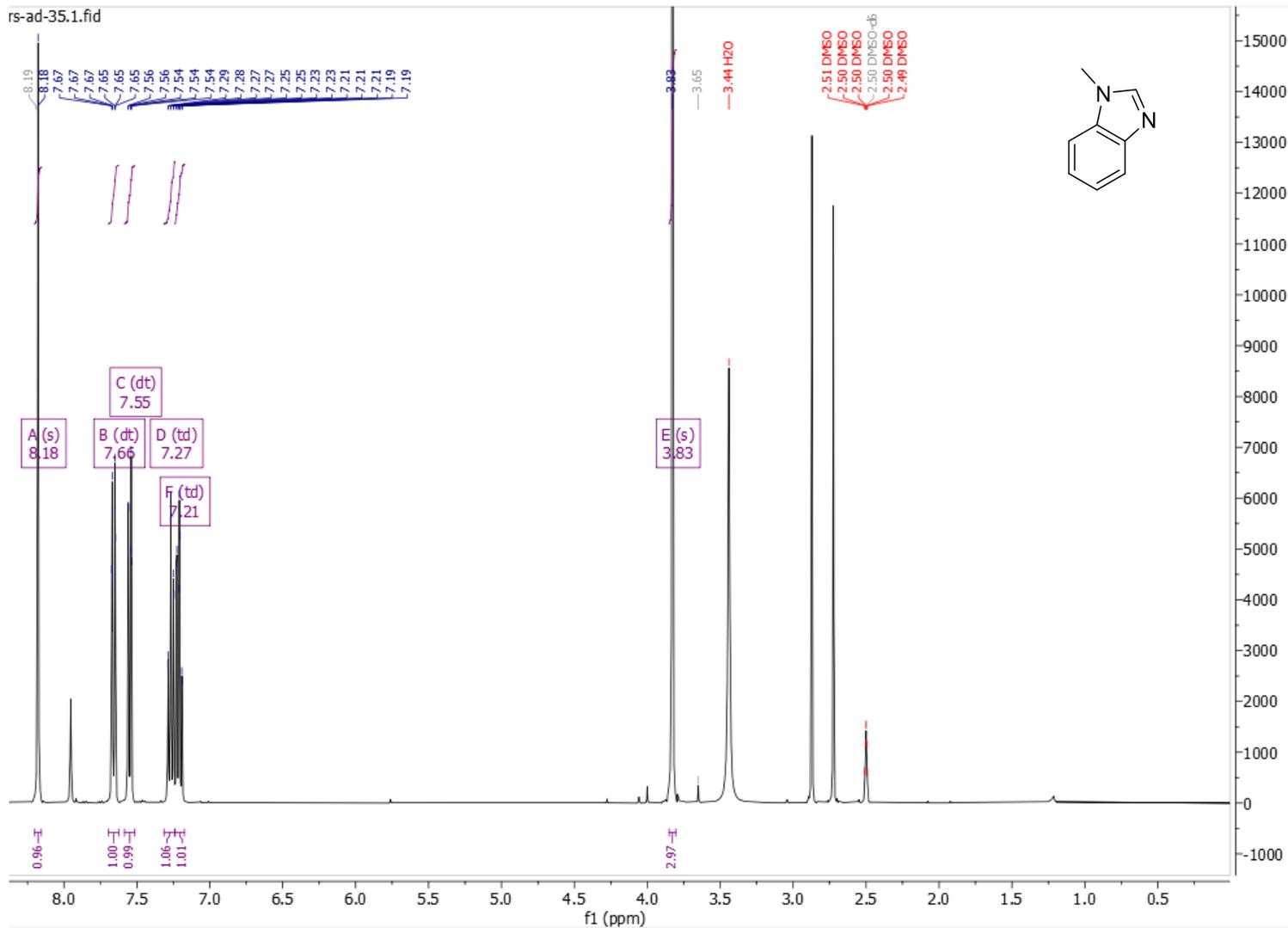


Figure A1.3.10: Average percent hemolysis in triplicate for benzimidazolium salts.

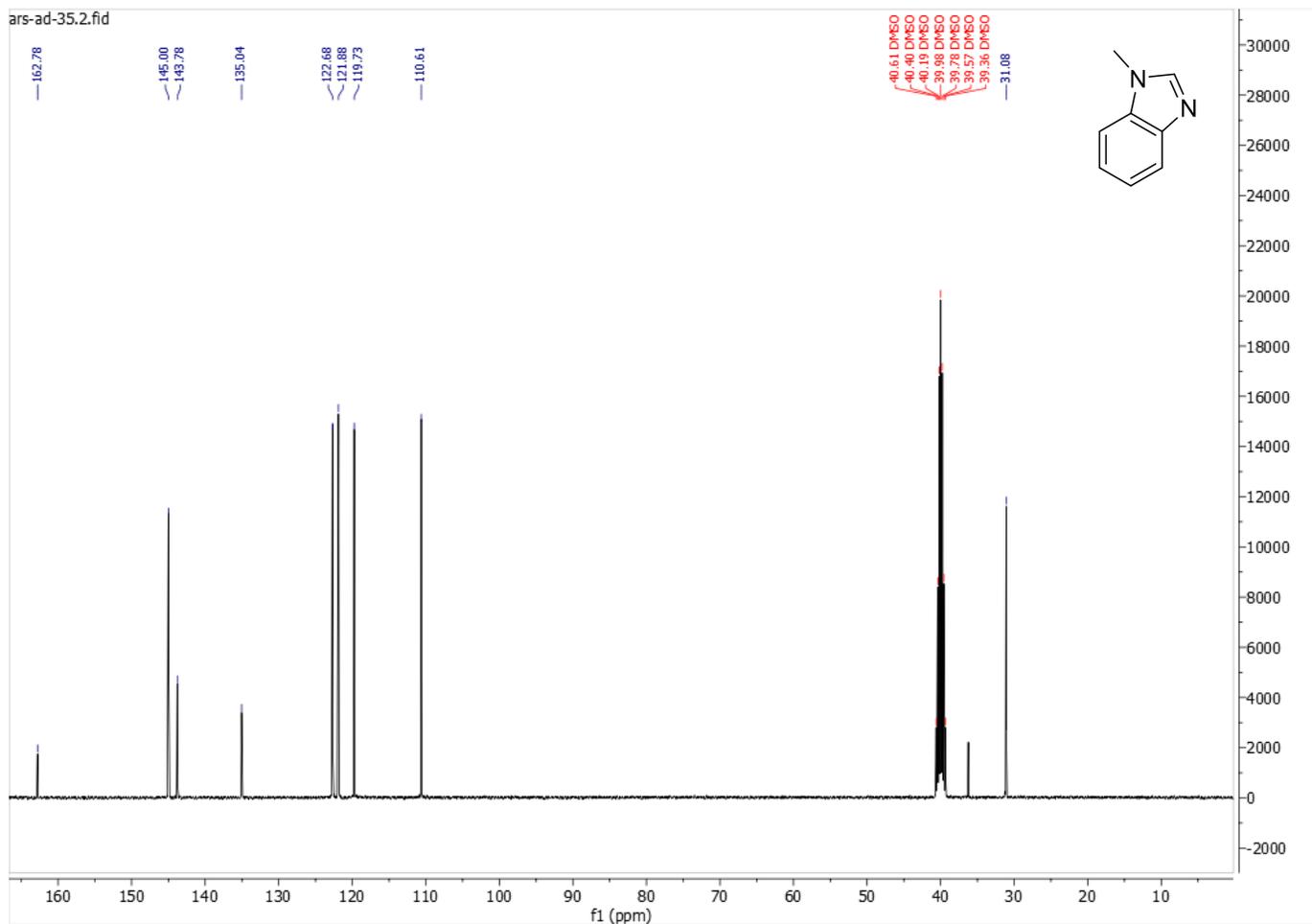
# A1.4 NMR spectra and LCMS of the synthesized compounds

## Compound (2):

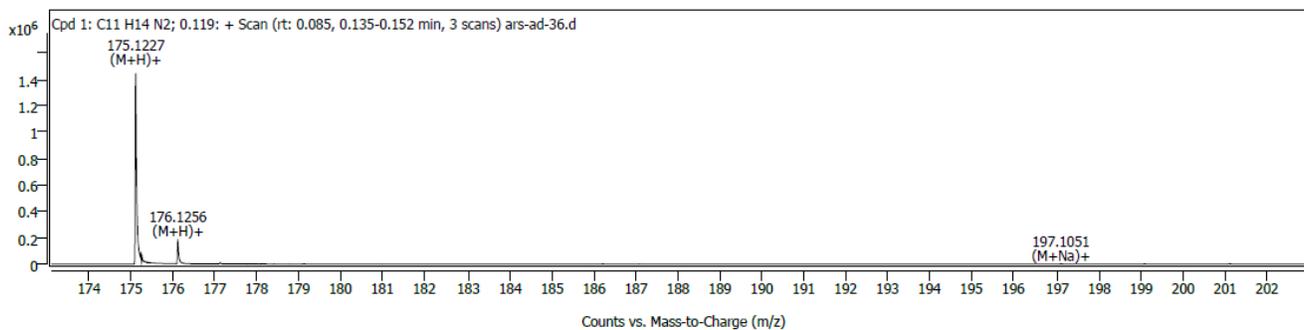
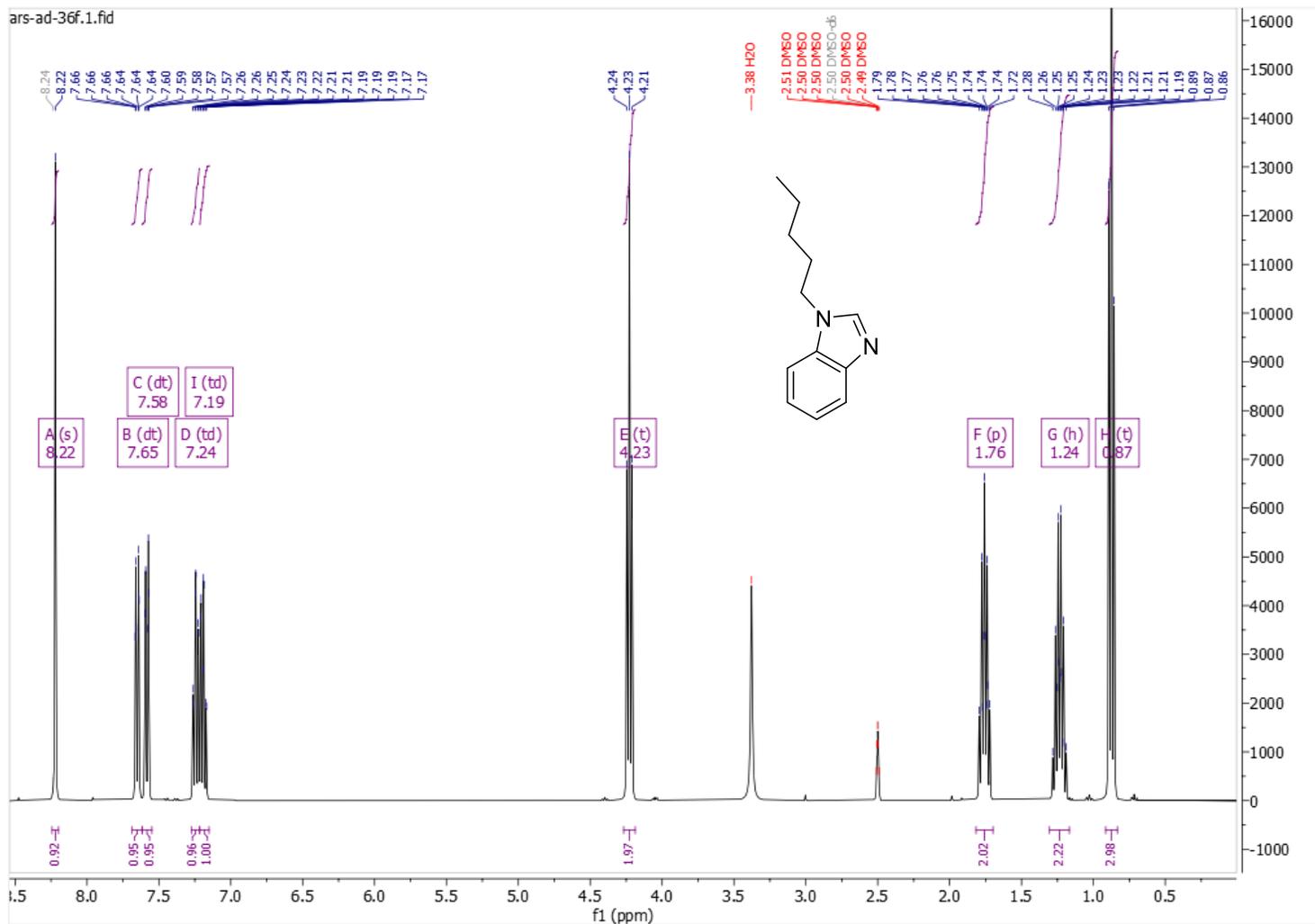


Spectrum Peaks (Max. 1)

Ion Species	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
(M+H) <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	2048607	133.07588	133.07602	-1.09



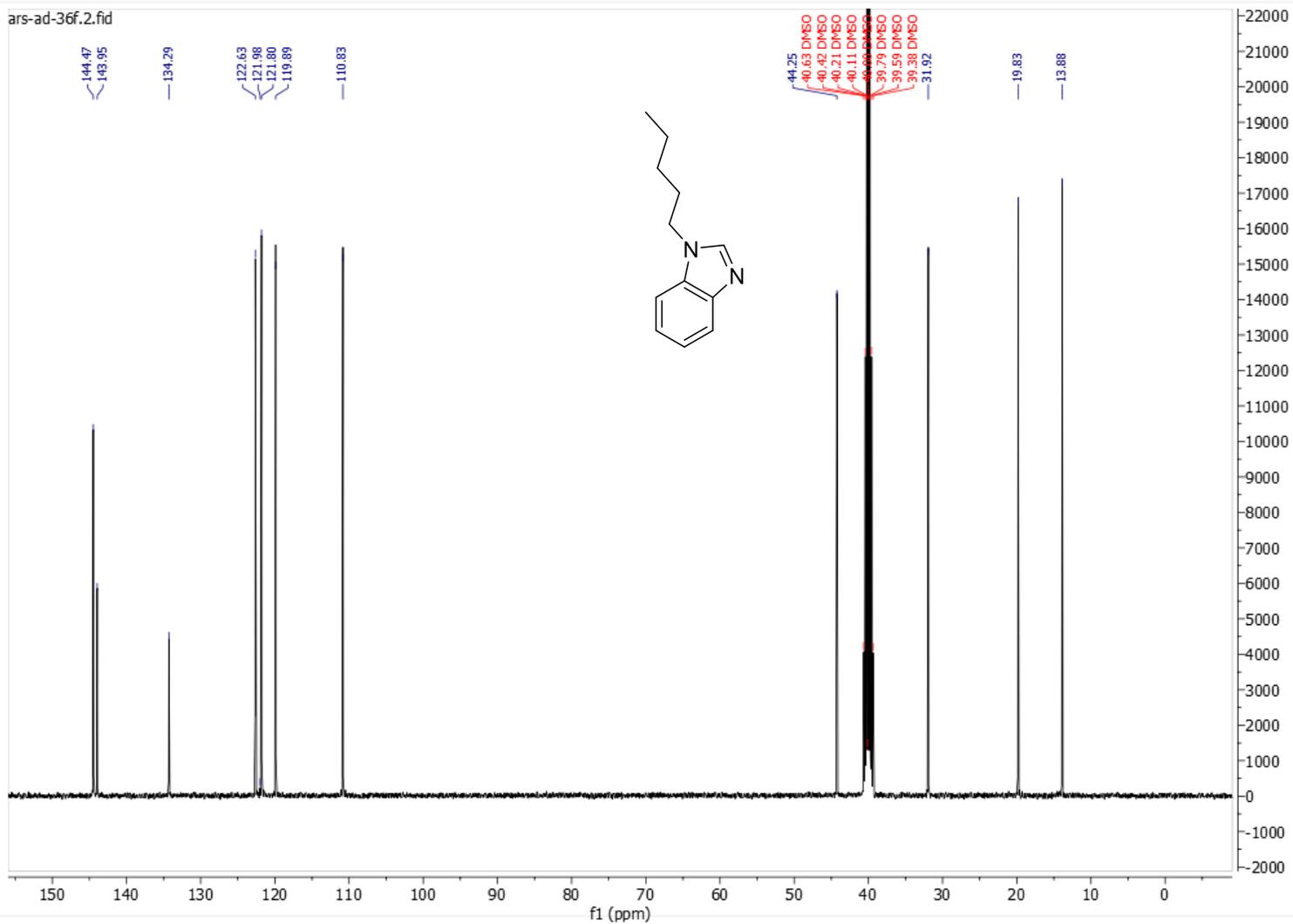
Compound (3):



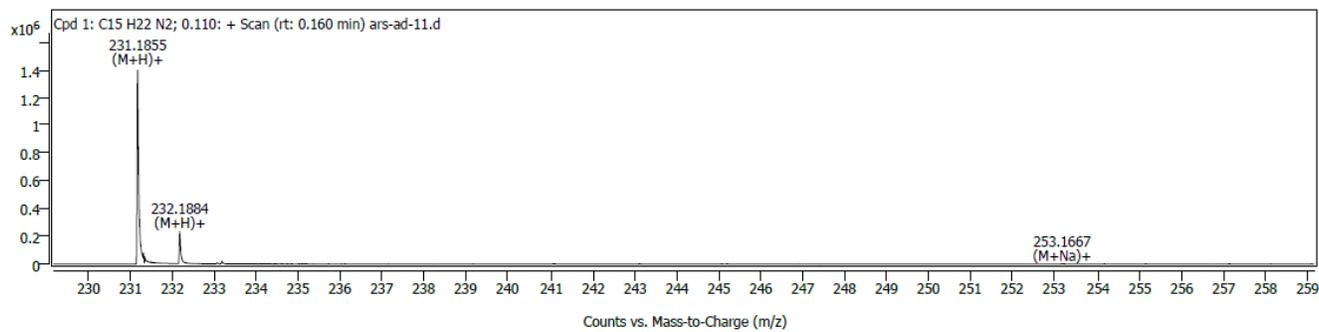
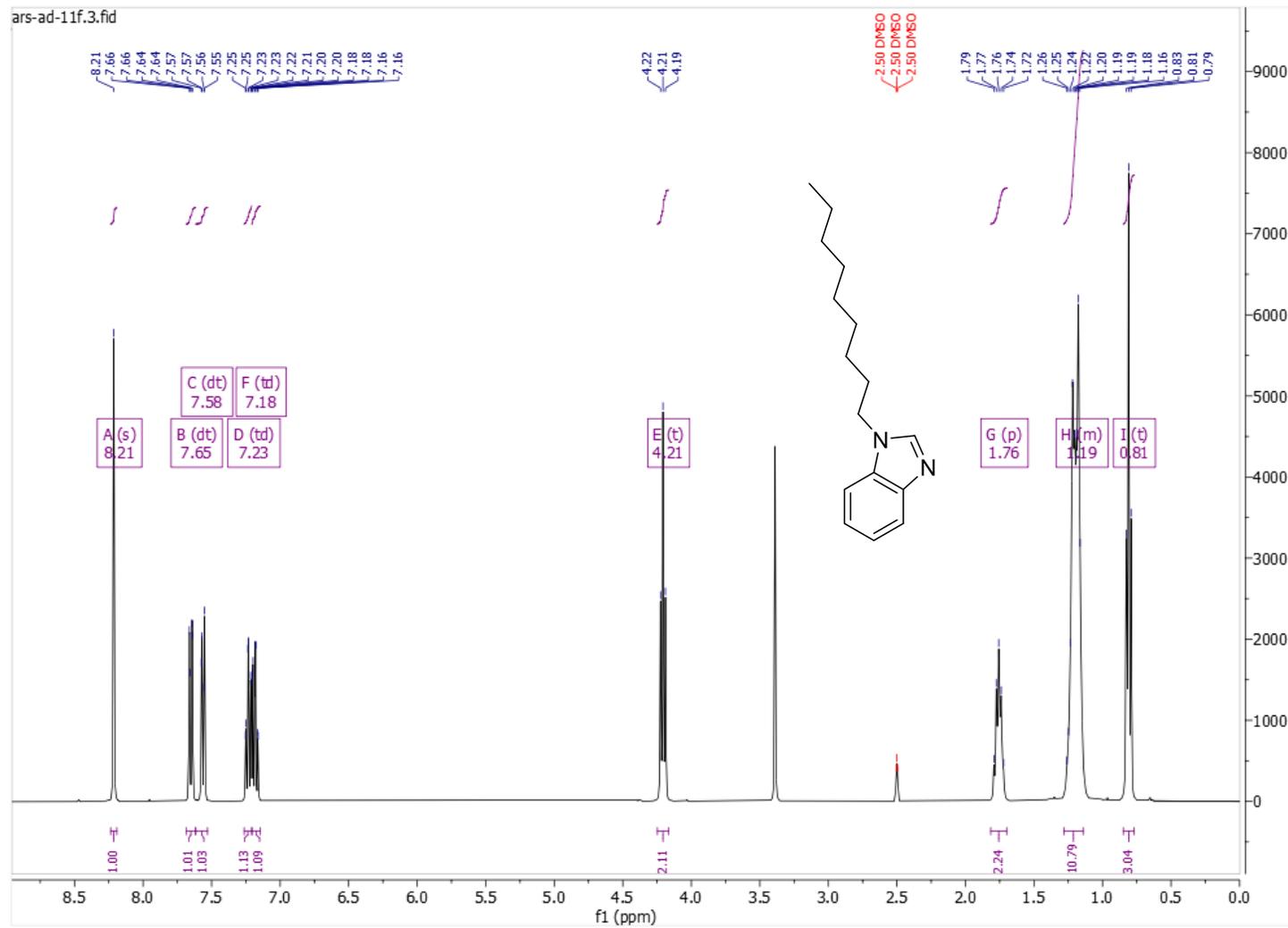
Spectrum Peaks (Max. 1)

Ion Species (M+H)+	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
(M+H)+	C11H14N2	1490740	175.12271	175.12297	-1.50

ars-ad-36f.2.fid



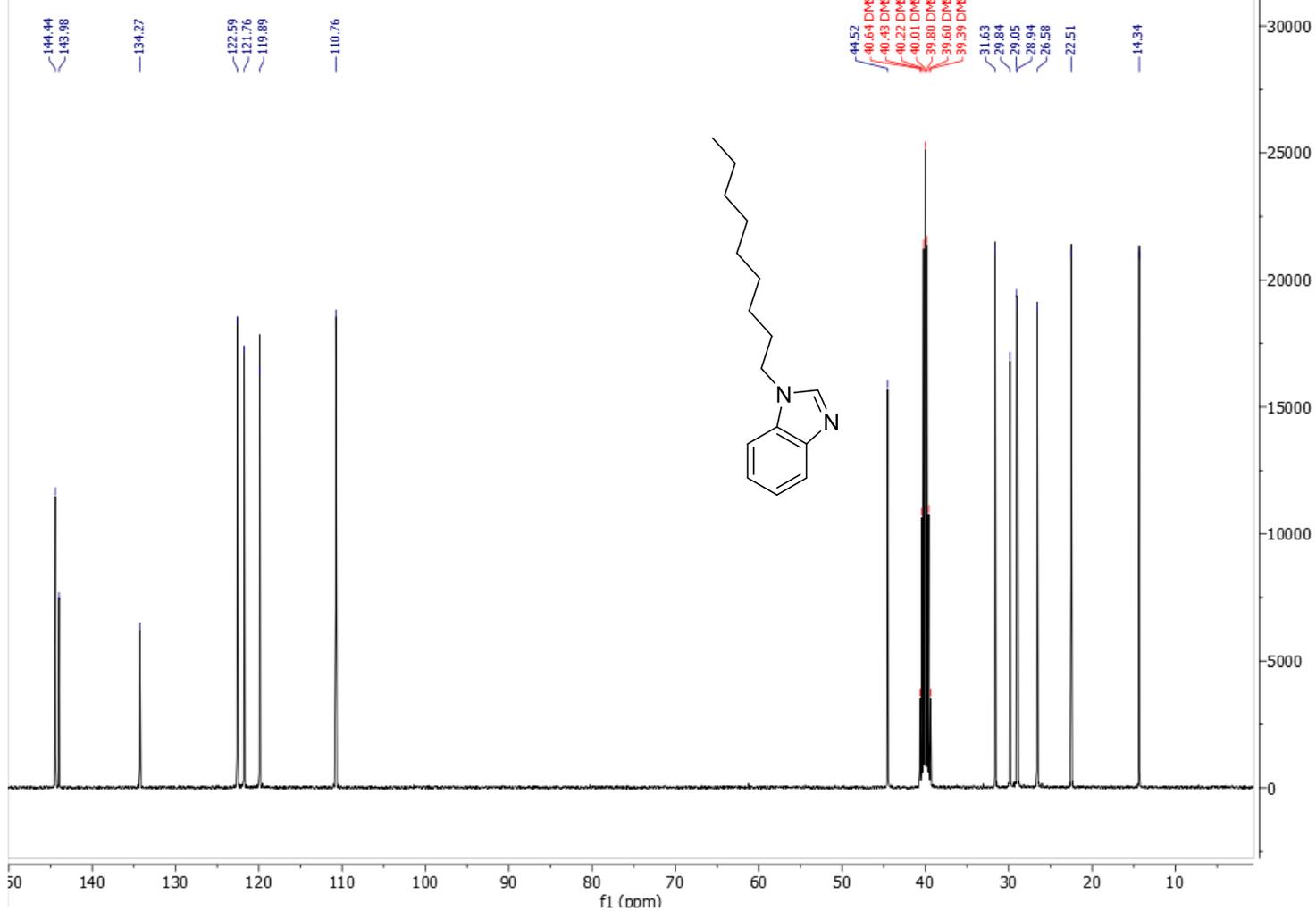
Compound (4):



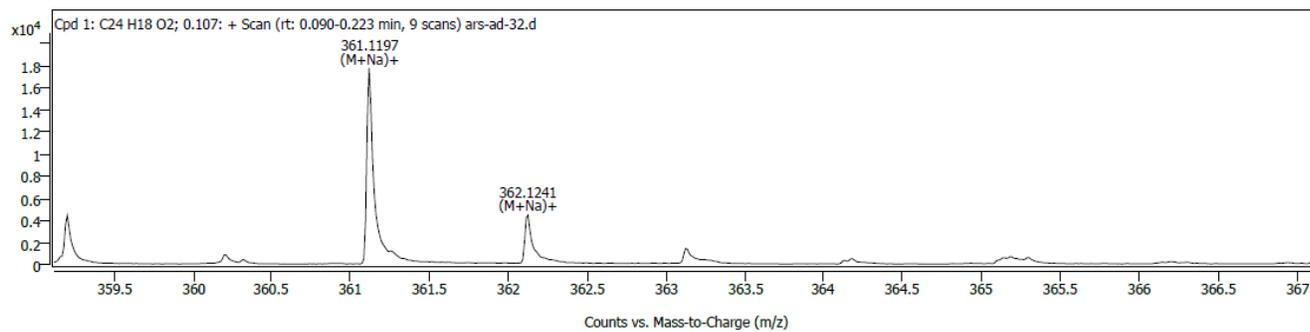
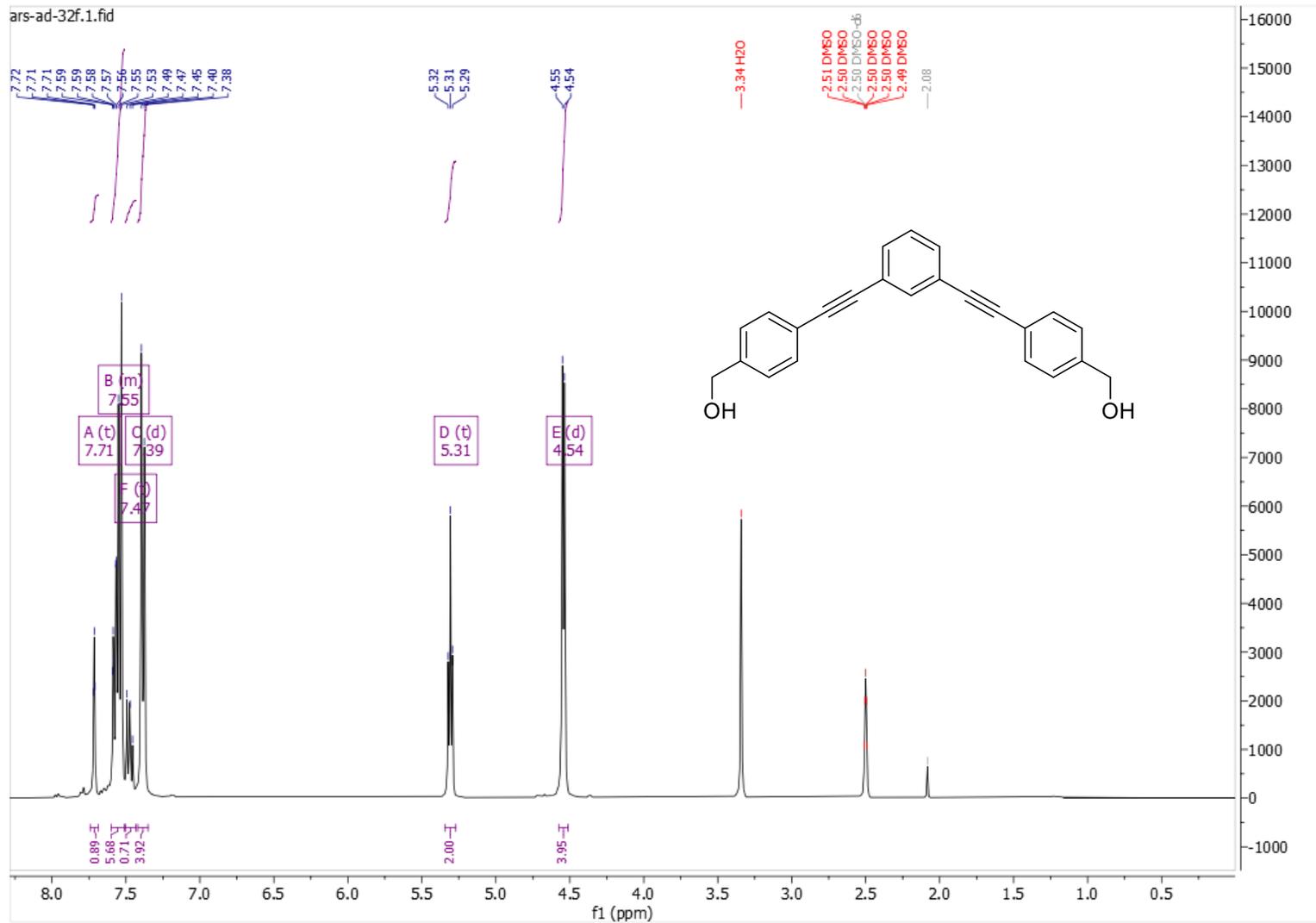
Spectrum Peaks (Max. 1)

Ion Species (M+H) <sup>+</sup>	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
(M+H) <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub>	1418443	231.18548	231.18558	-0.42

ars-ad-11f/carbone



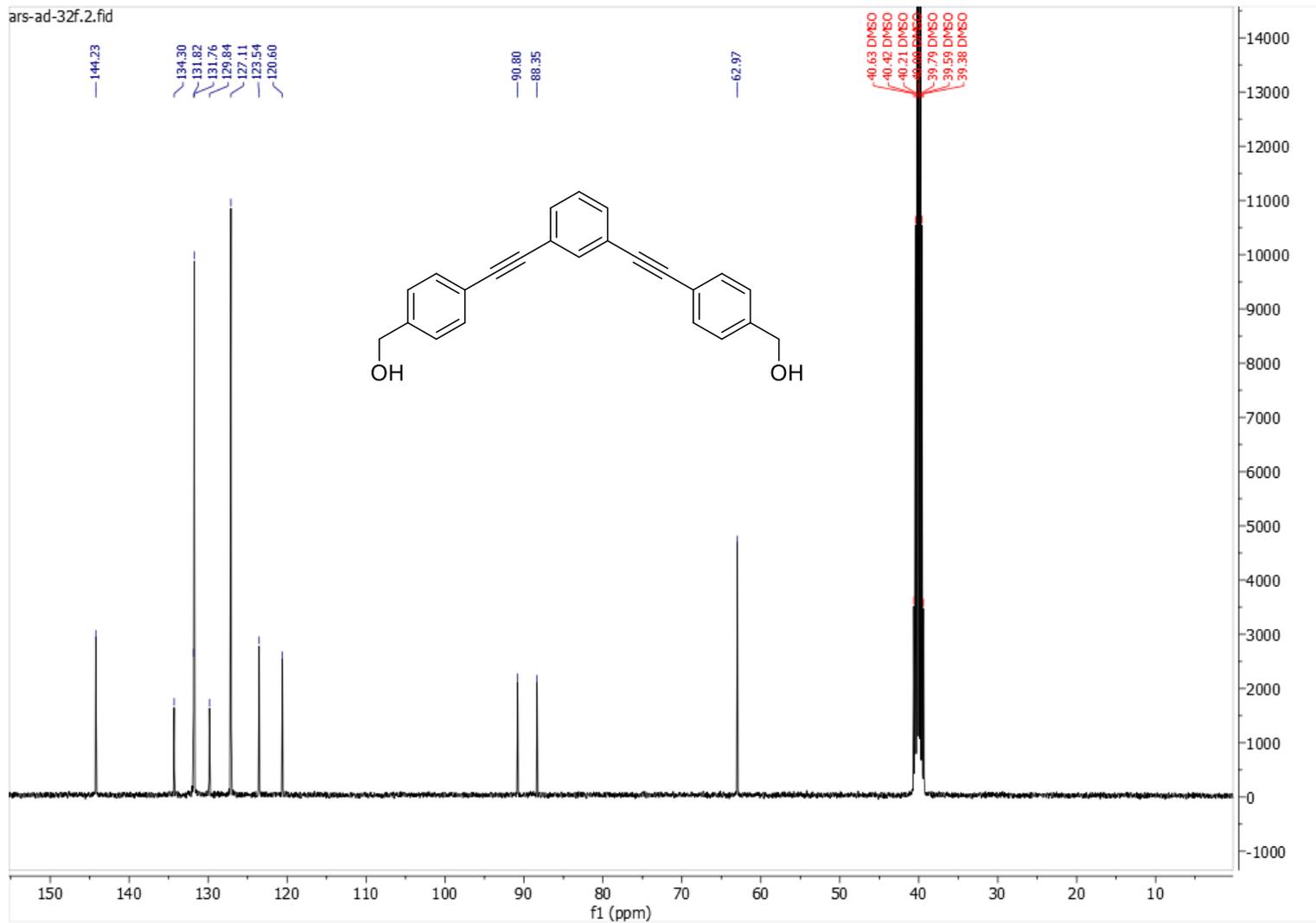
Compound (6):



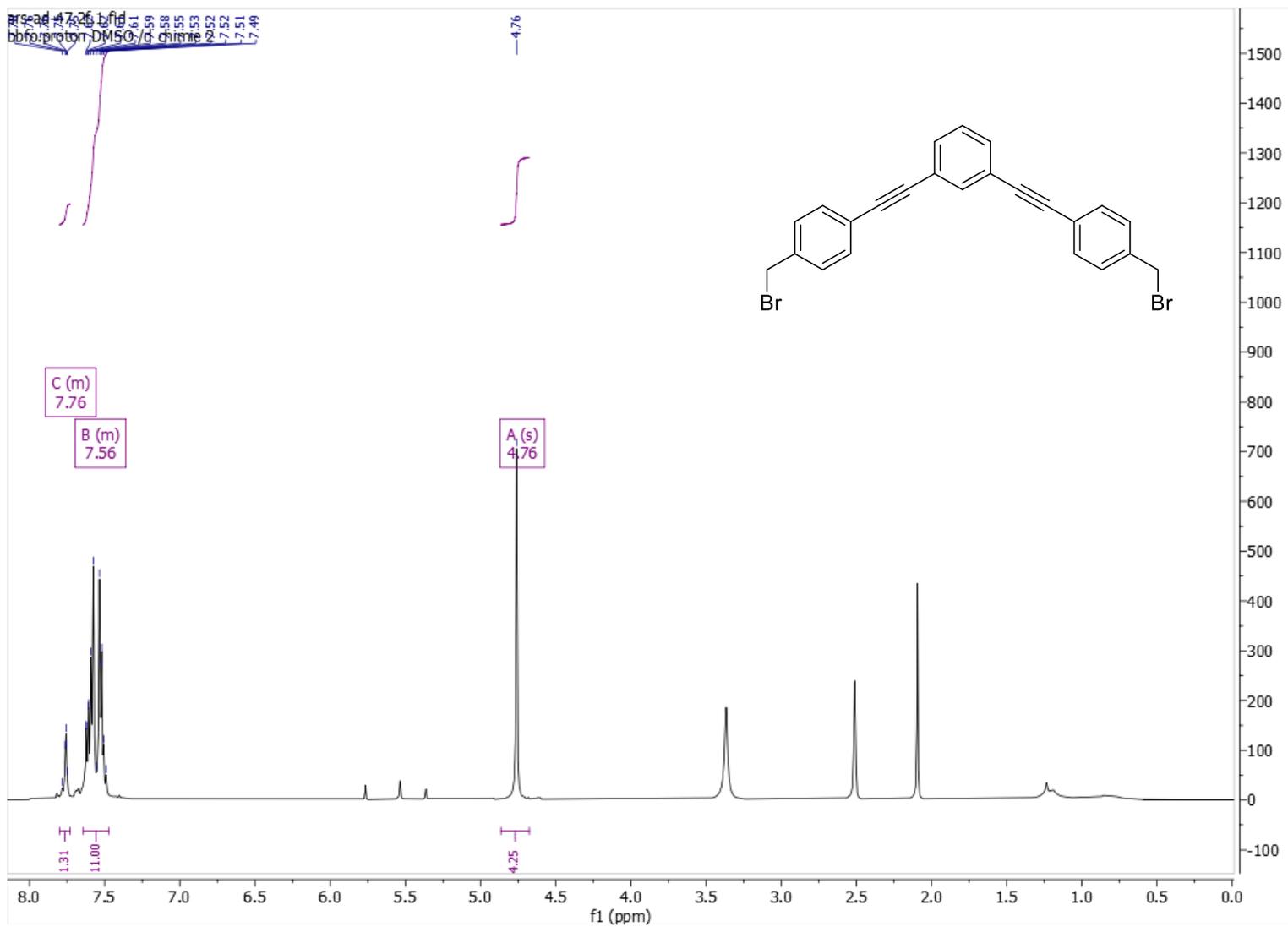
Spectrum Peaks (Max. 1)

Ion Species	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
(M+Na)+	C24H18O2	17842	361.11975	361.11990	-0.42

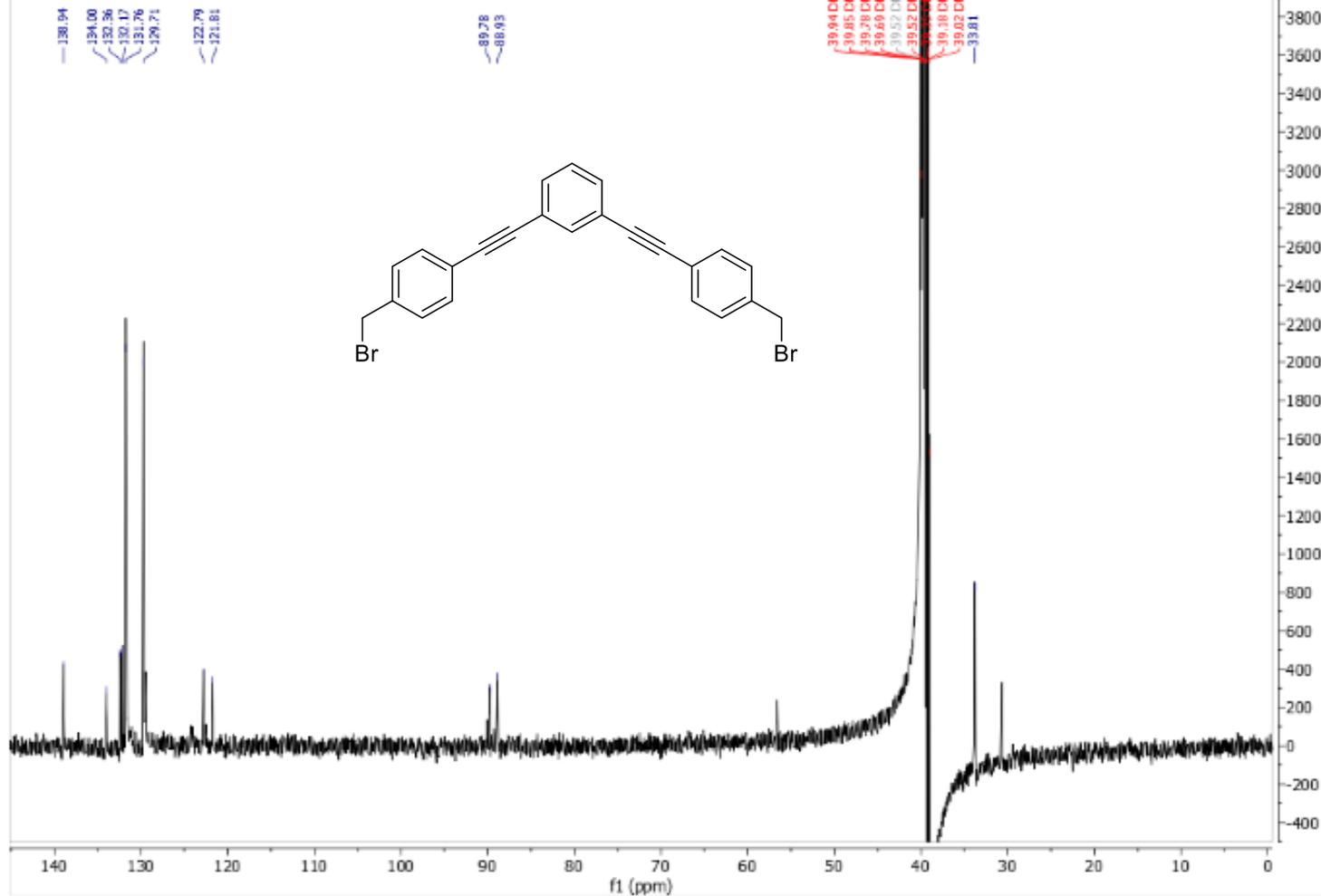
ars-ad-32f.2.fid



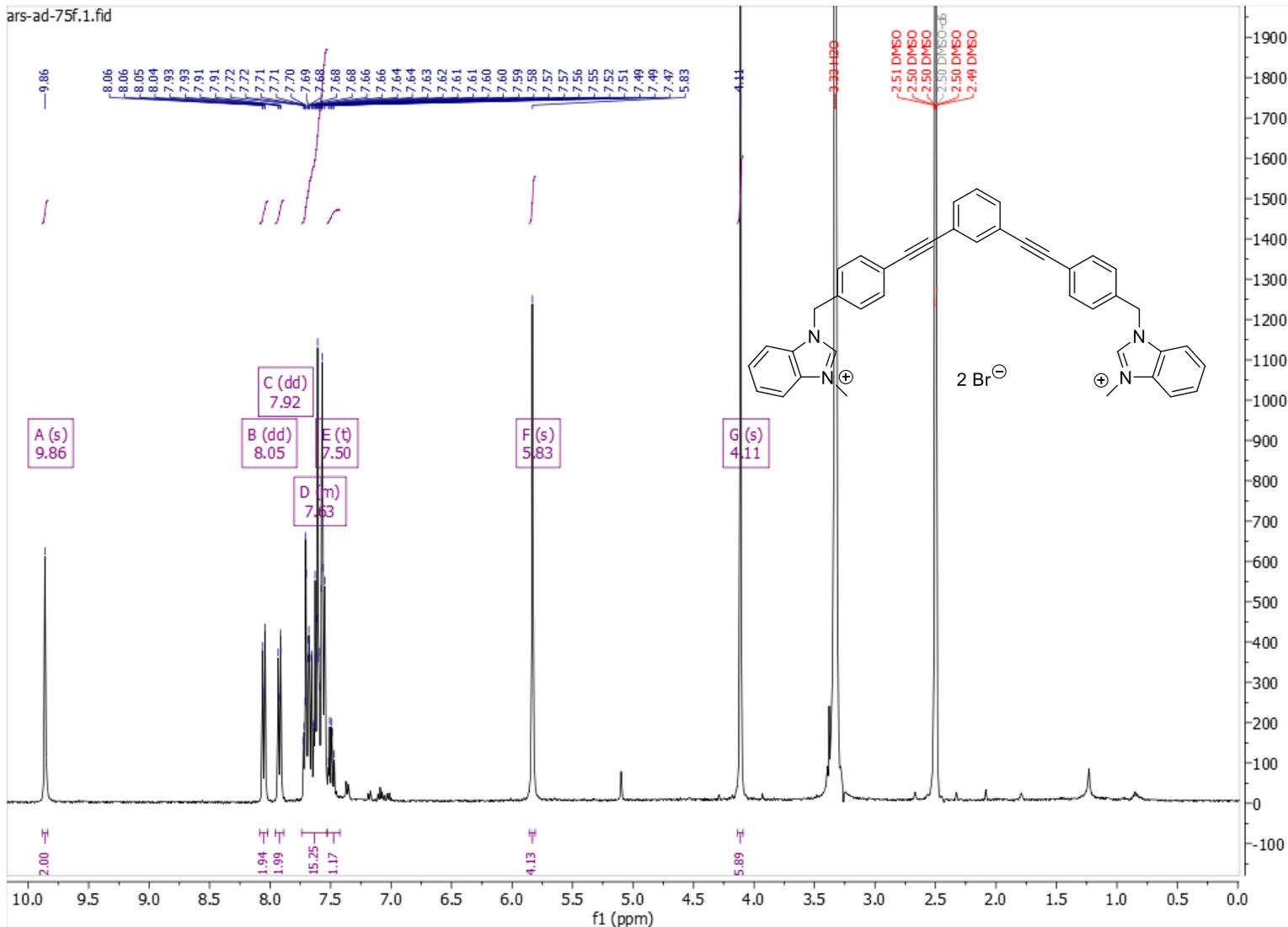
Compound (7):



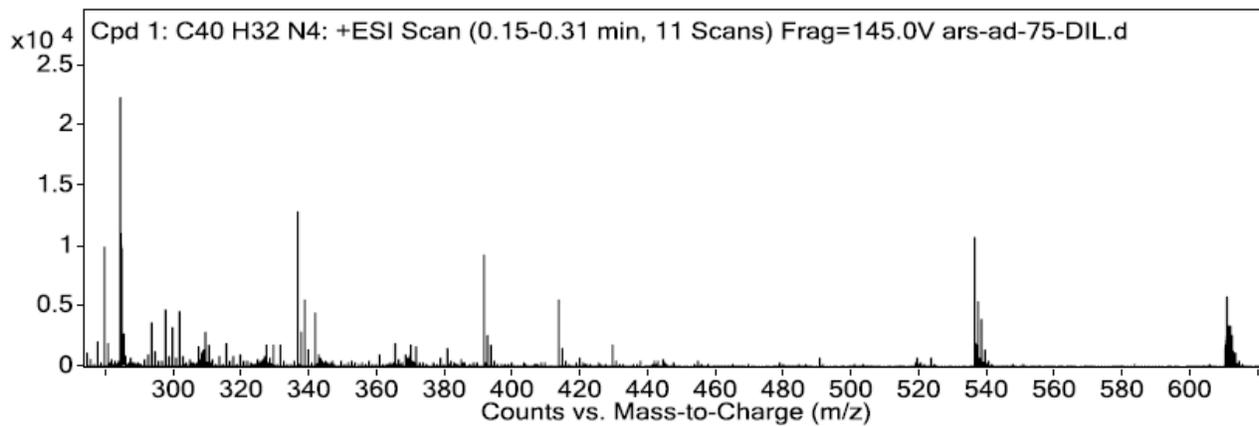
ars-ad-47.2f.2.fid  
sx\_carbon1k DMSO /d chimie 2



Compound (8):

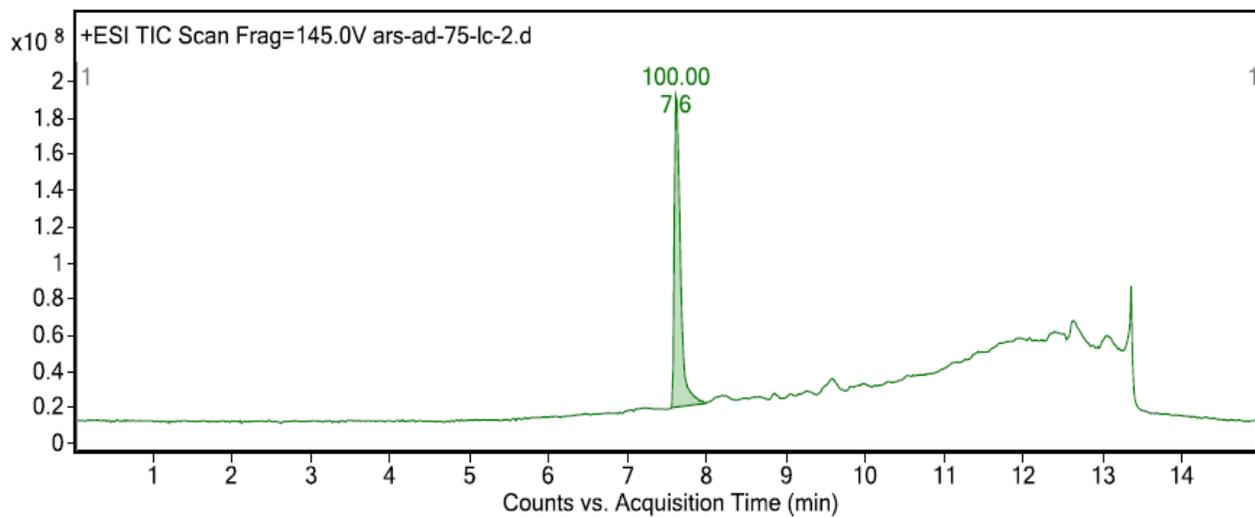


MS Zoomed Spectrum



MS Spectrum Peak List

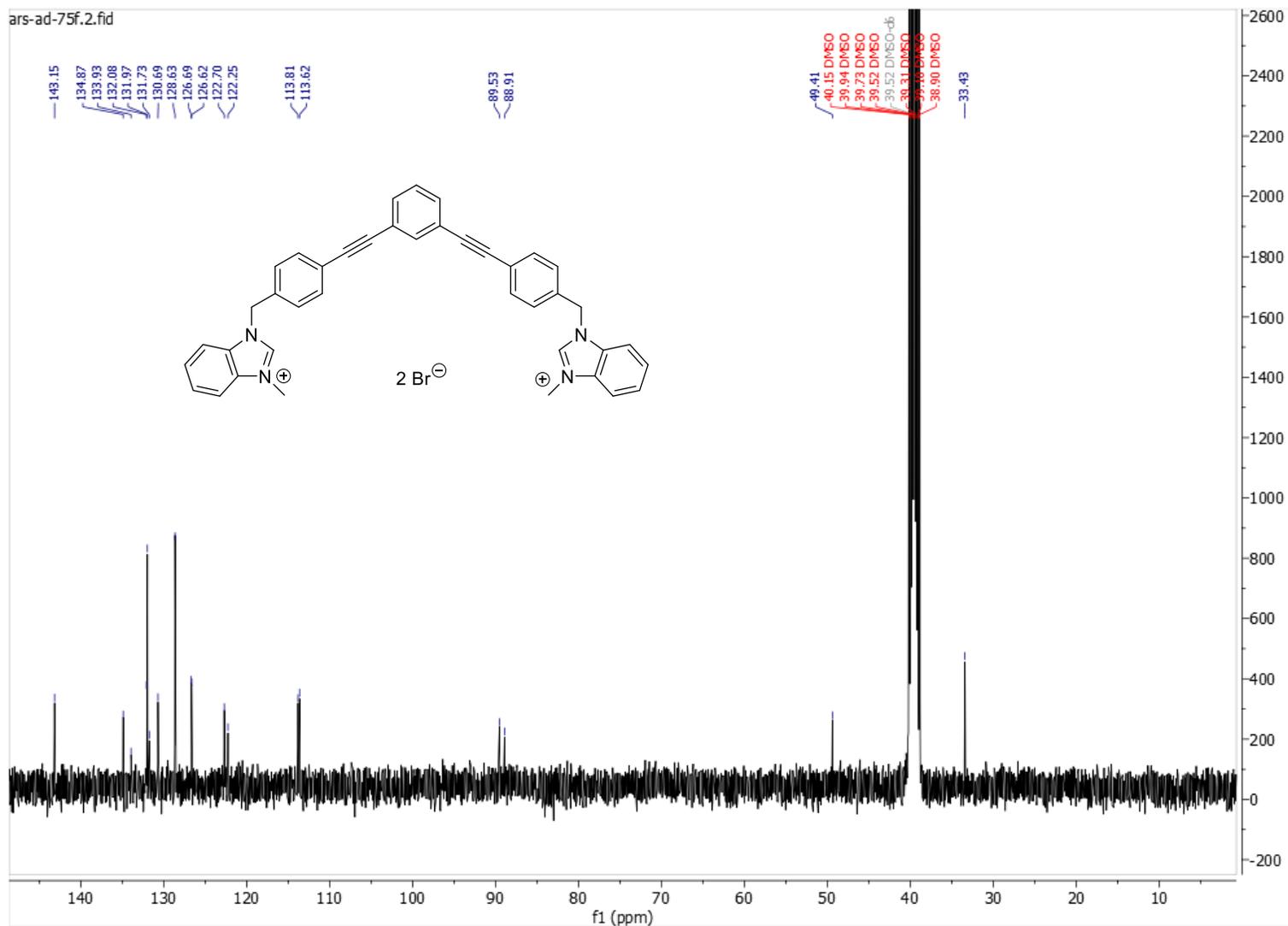
Ion	Formula	Abund	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff(ppm)
M+2	C <sub>40</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub>	22378.26	284.12967	284.1308	3.96



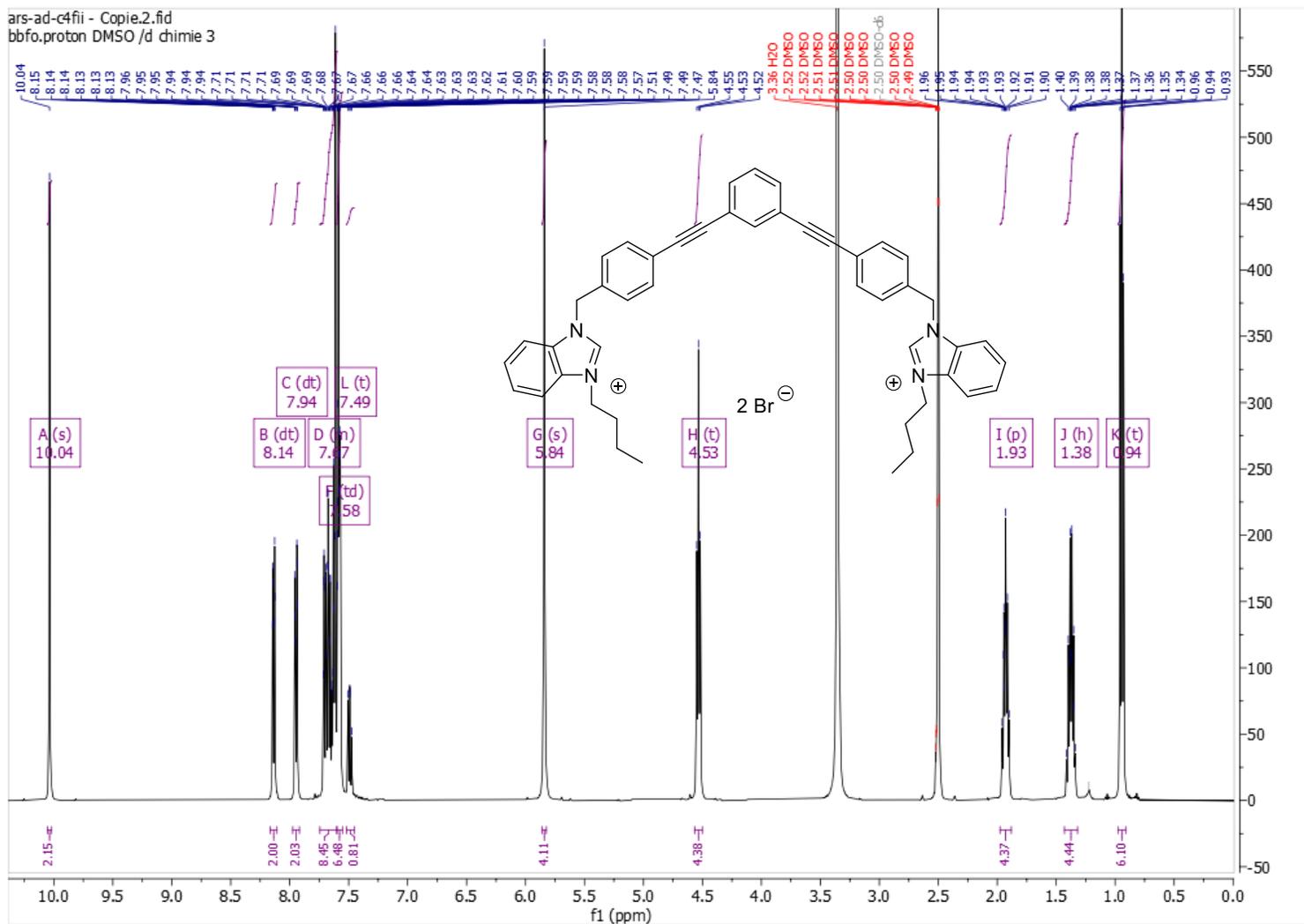
### Integration Peak List

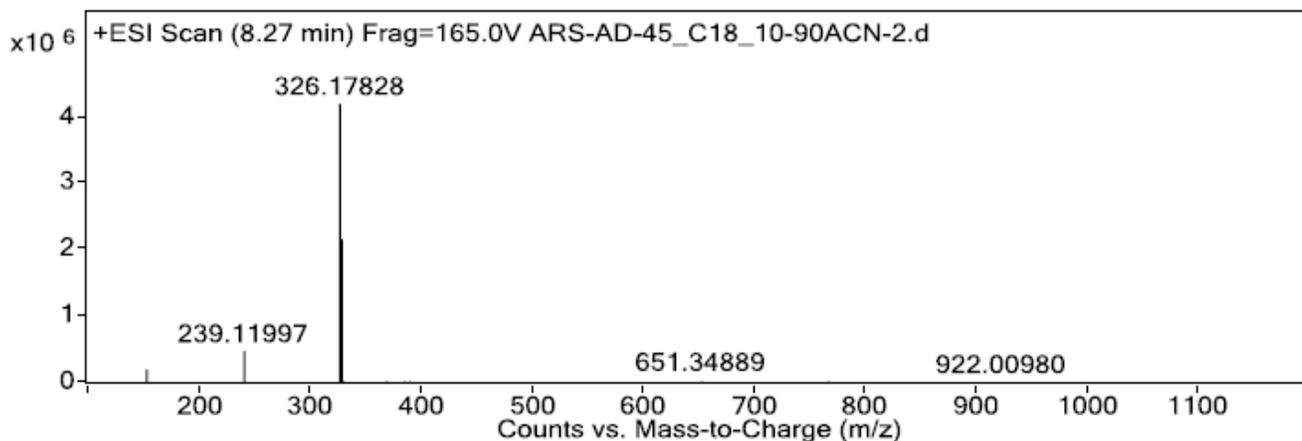
Peak	RT	Height	Area	Area (%)
1	7.6	172285027.3	945141727.6	100

ars-ad-75f.2.fid



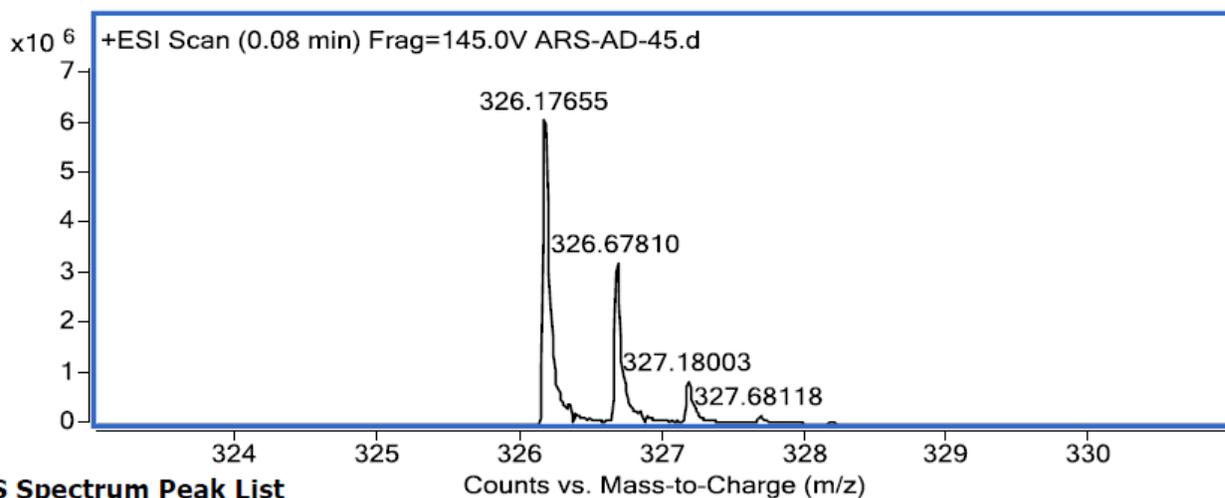
Compound (9):





**Integration Peak List**

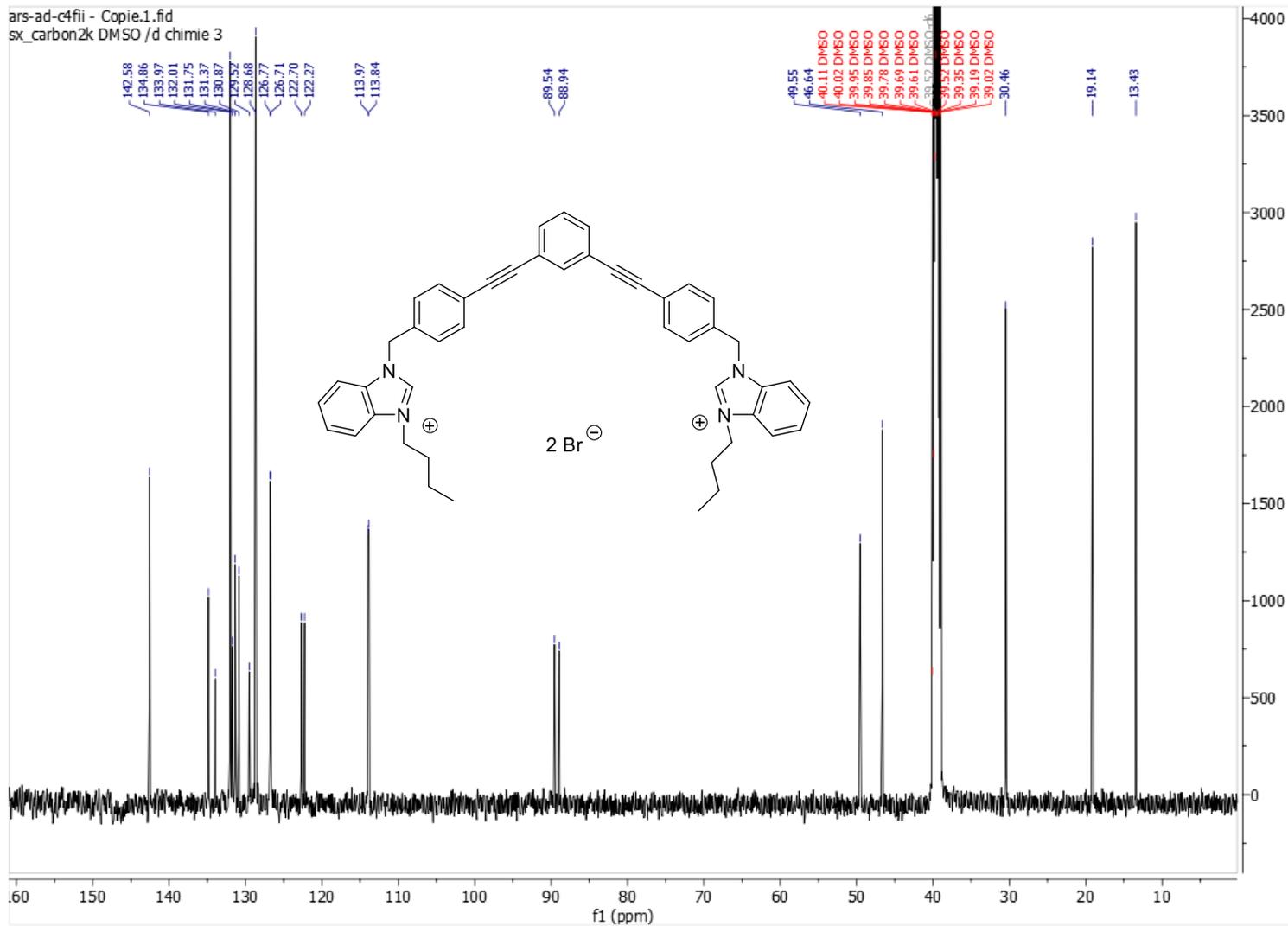
Peak	RT	Height	Area	Area (%)
1	8.25	69009985.7	411236010.2	100



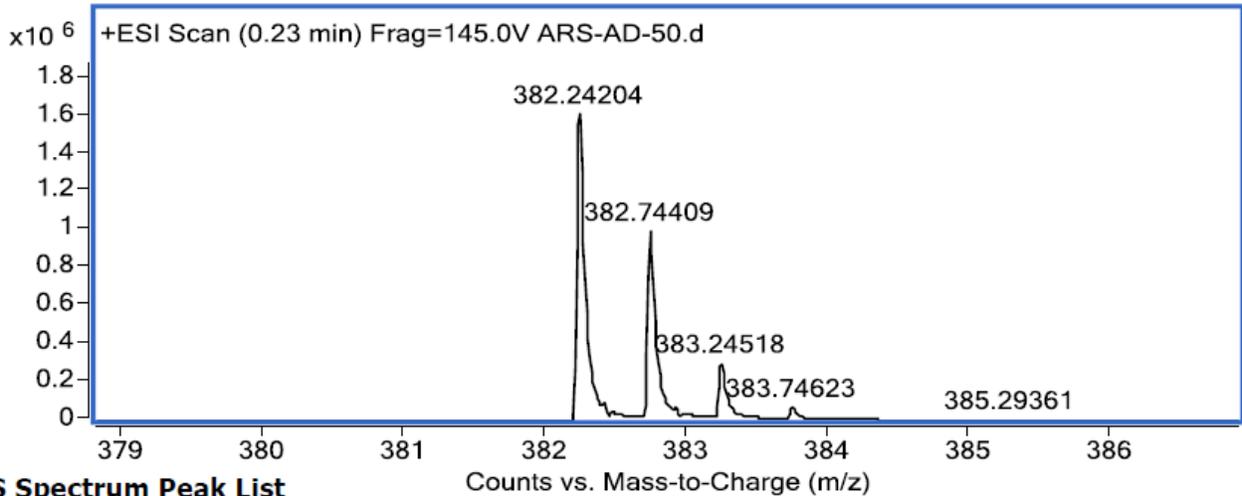
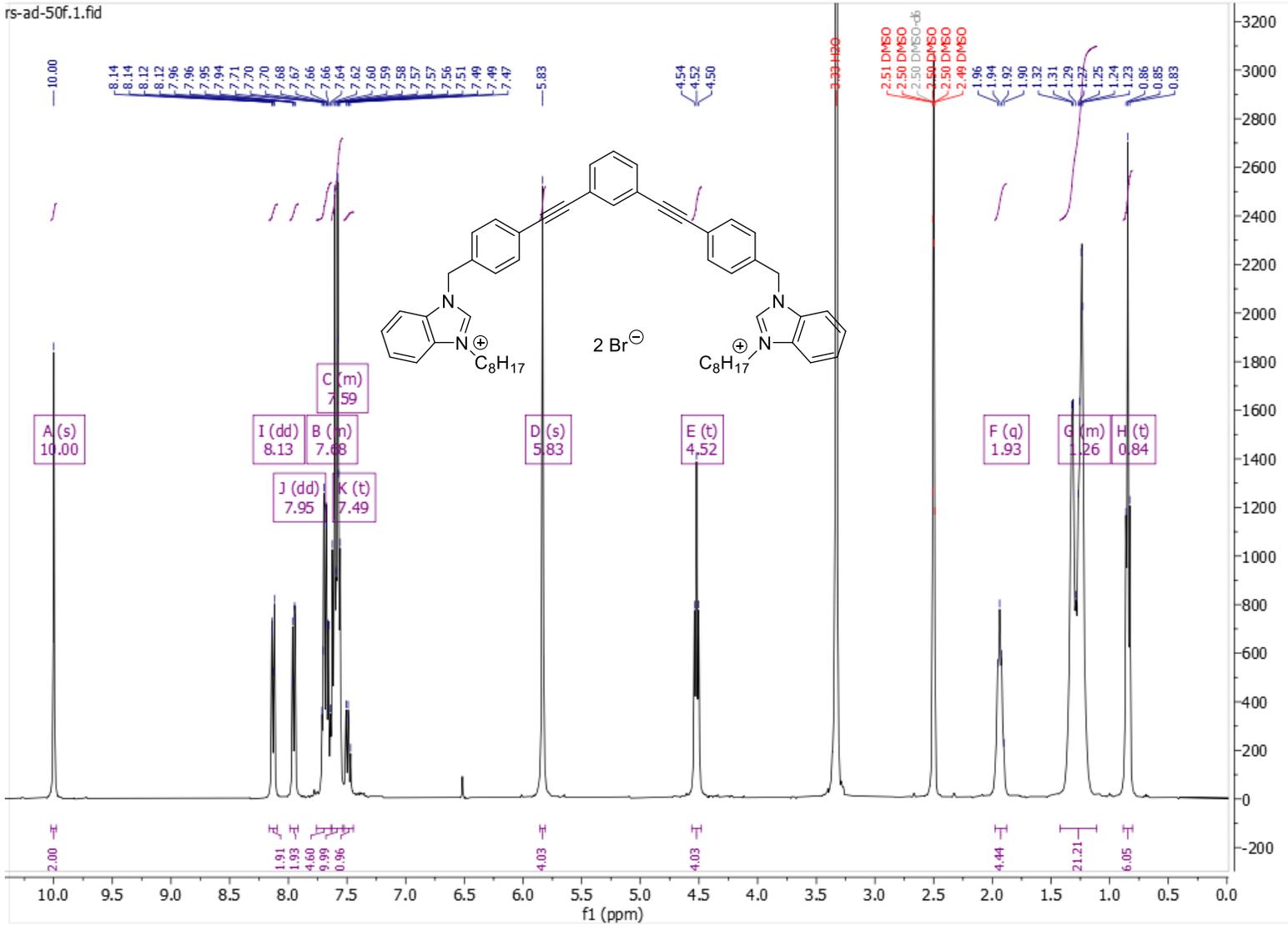
**MS Spectrum Peak List**

Ion	Formula	Abund	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff(ppm)
(M+2)	C46 H44 N4	n/a	326.17655	326.17775	3.68

ars-ad-c4fii - Copie.1.fid  
sx\_carbon2k DMSO /d chimie 3

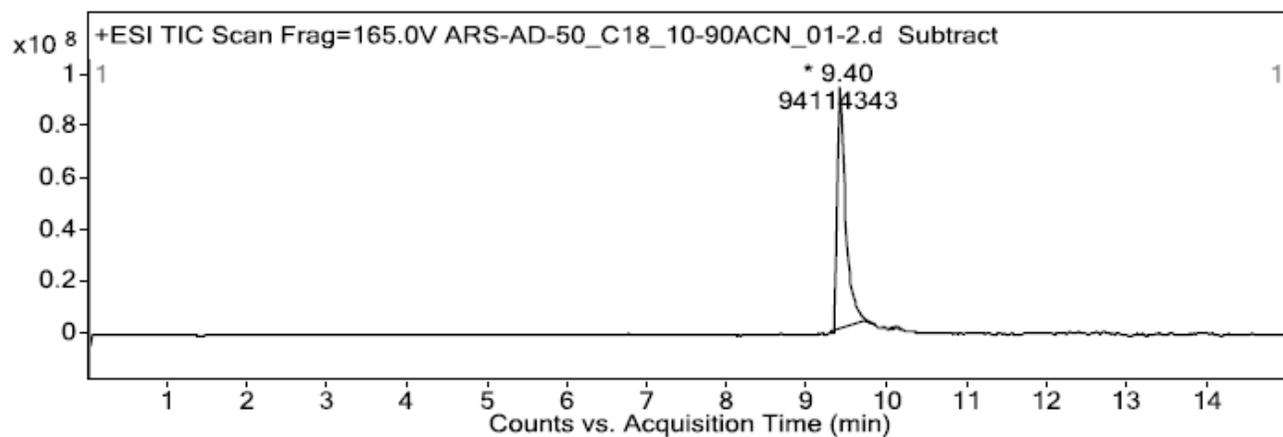


Compound (10):



MS Spectrum Peak List

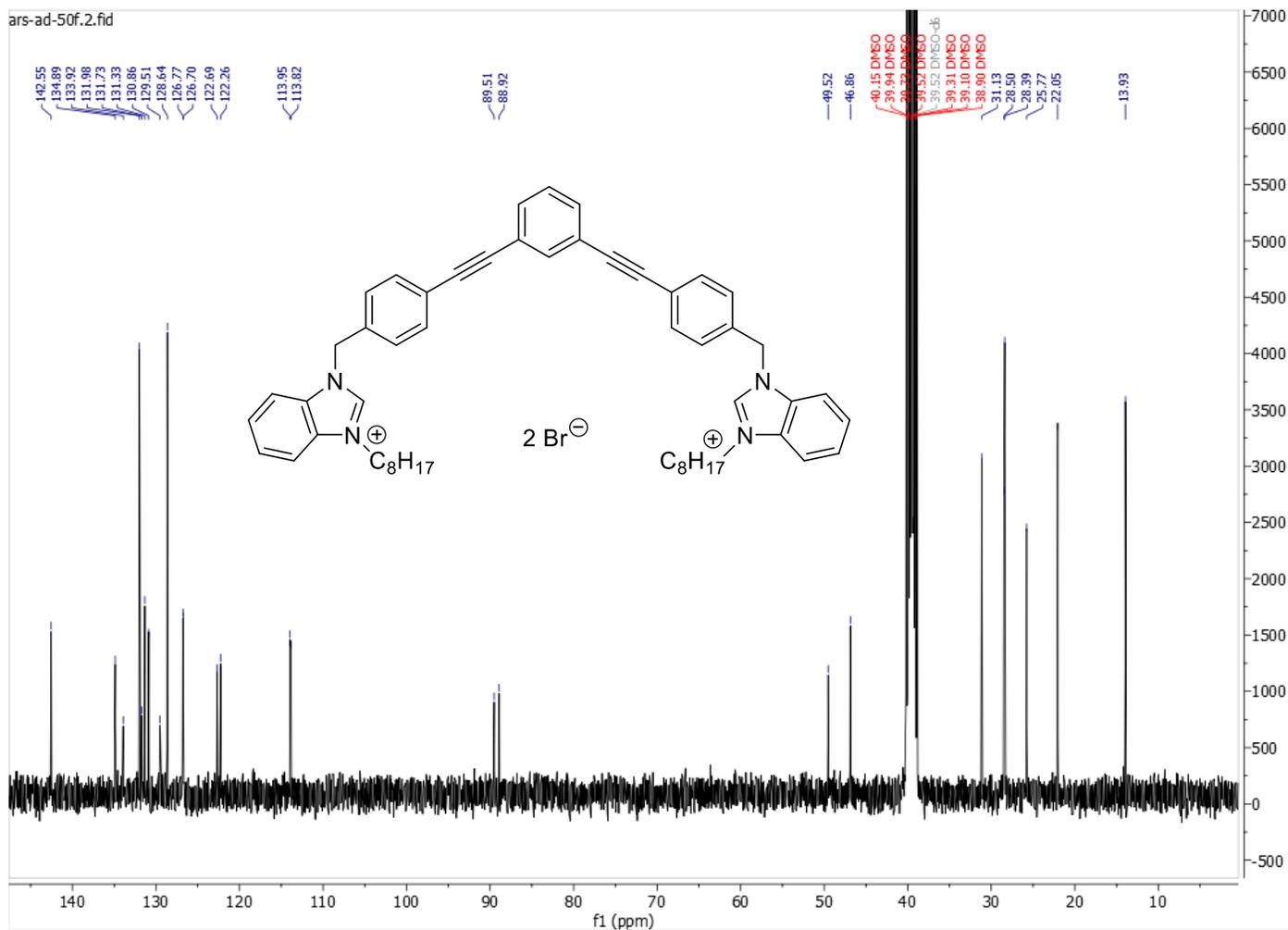
Ion	Formula	Abund	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff(ppm)
(M+2)	C <sub>54</sub> H <sub>60</sub> N <sub>4</sub>	n/a	382.24204	382.24035	-4.42



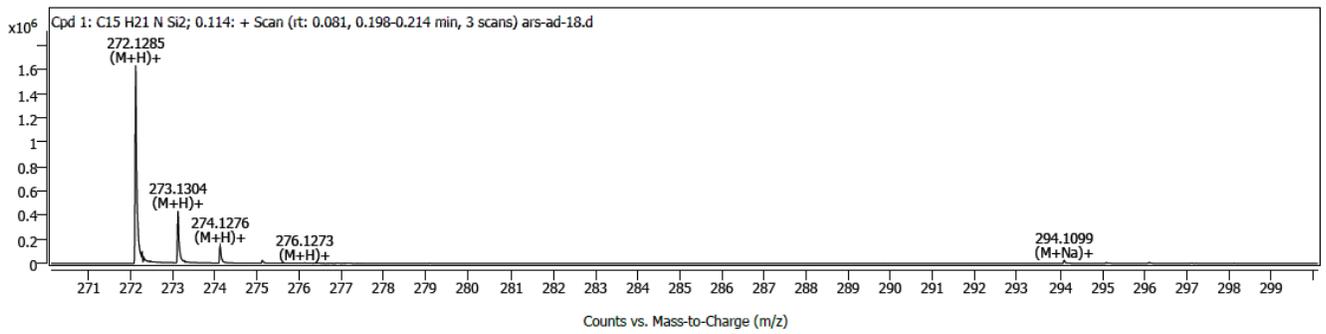
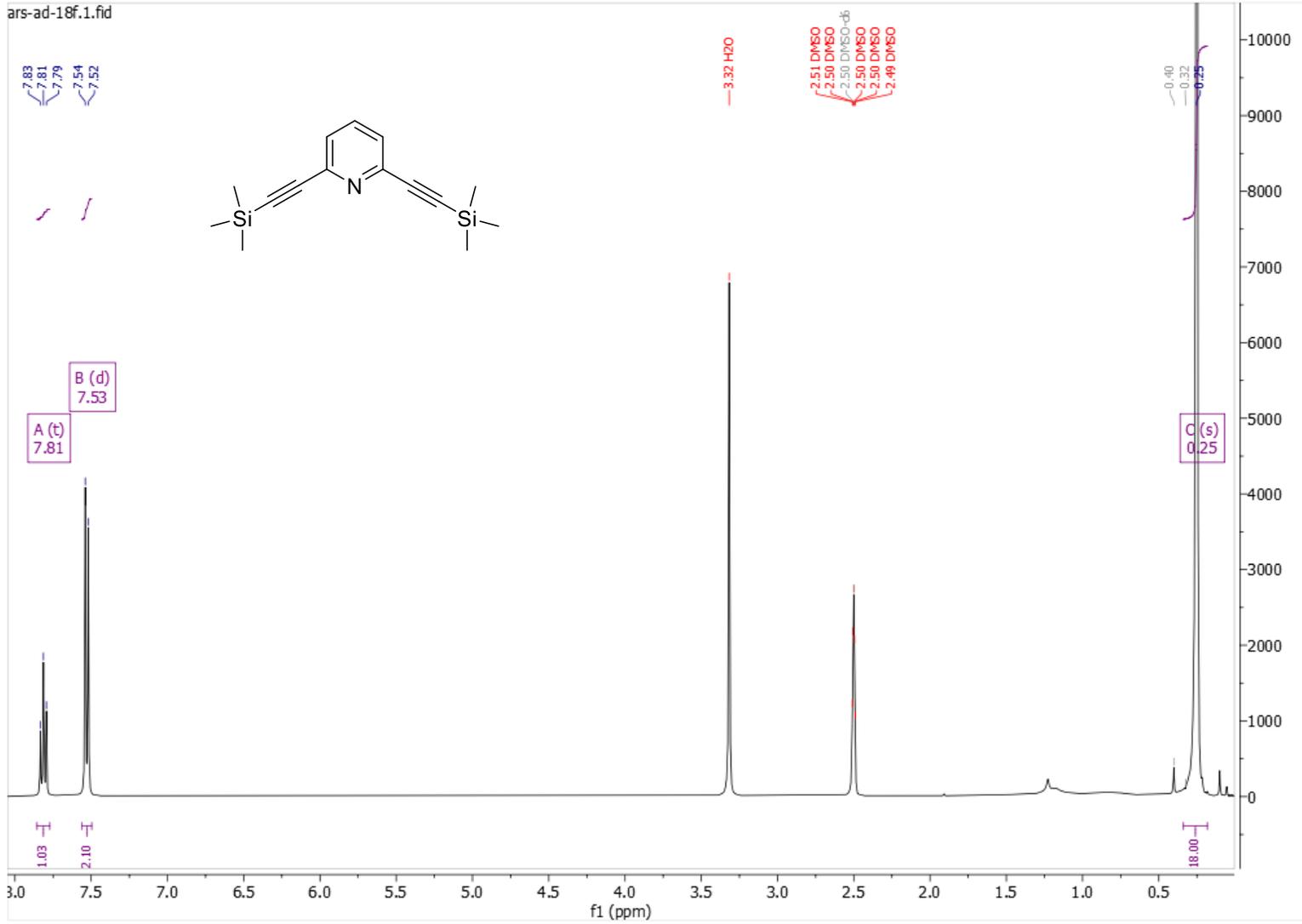
### Integration Peak List

Peak	RT	Height	Area	Area (%)
1	9.4	94114343	704309639	99.21
2	9.75	0	297309	0.04
3	9.98	512294	812586	0.11
4	10.08	1140836	4472491	0.63

ars-ad-50f.2.fid



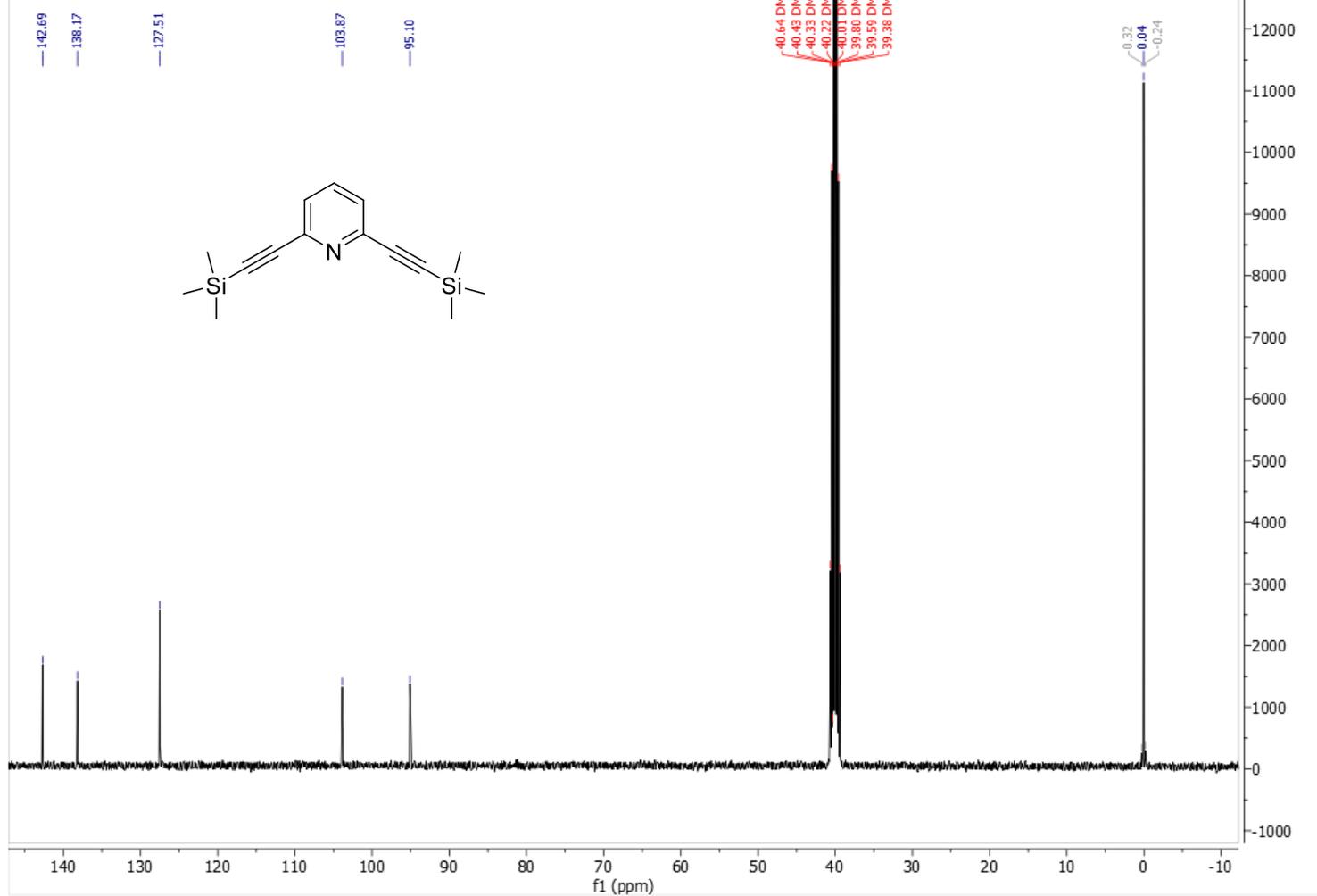
Compound (12):



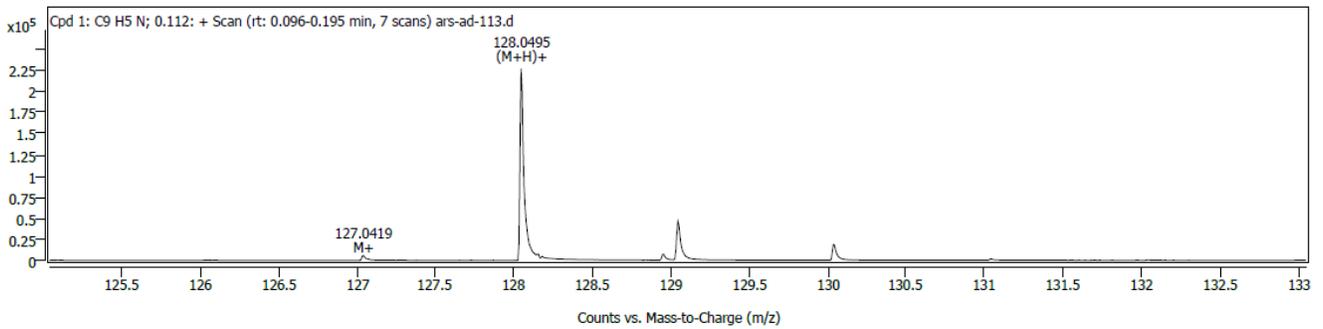
Spectrum Peaks (Max. 1)

Ion Species	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
(M+H) <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NSi <sub>2</sub>	1638420	272.12849	272.12853	-0.15

ars-ad-18f.2.fid



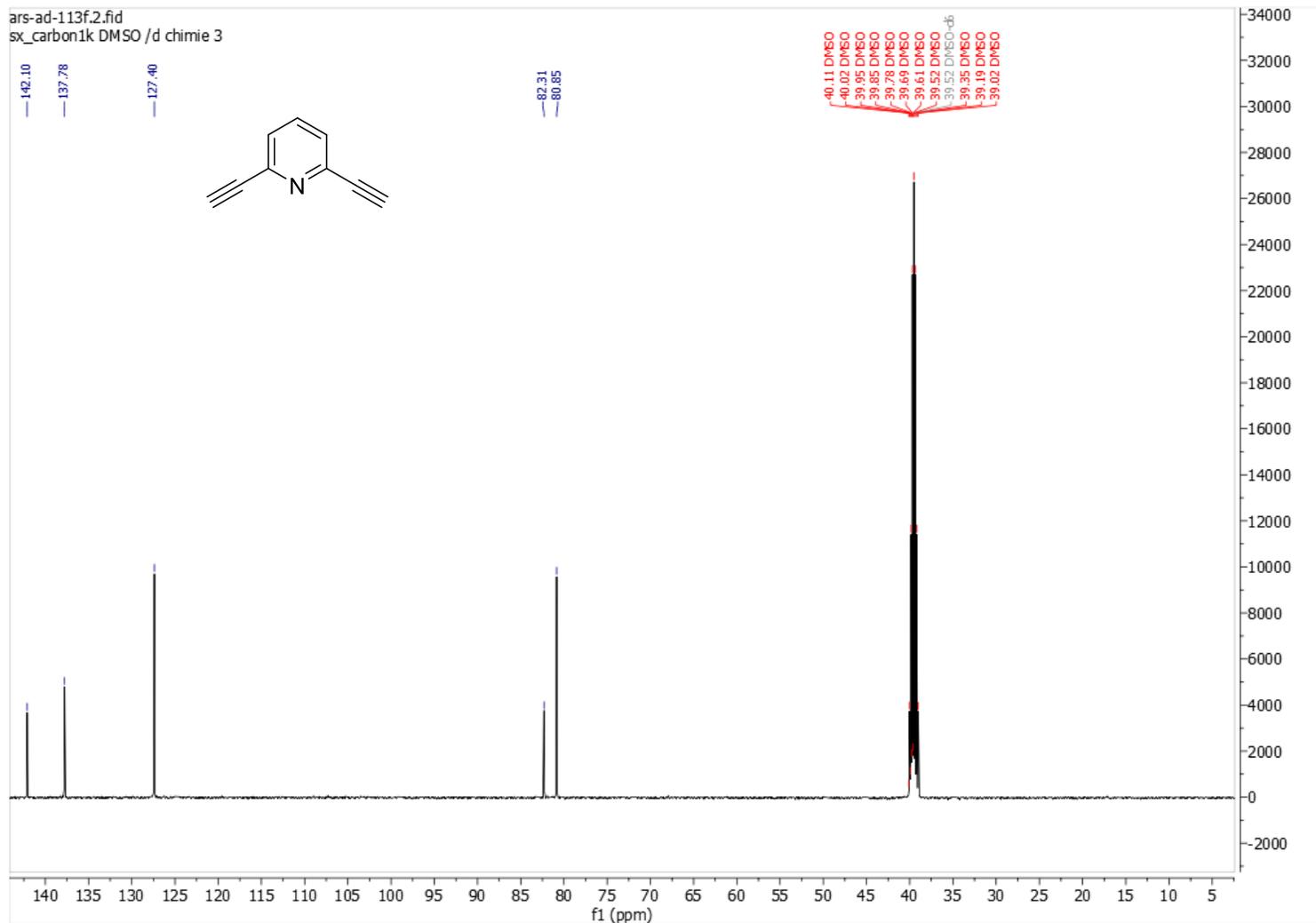
Compound (13):



Spectrum Peaks (Max. 1)

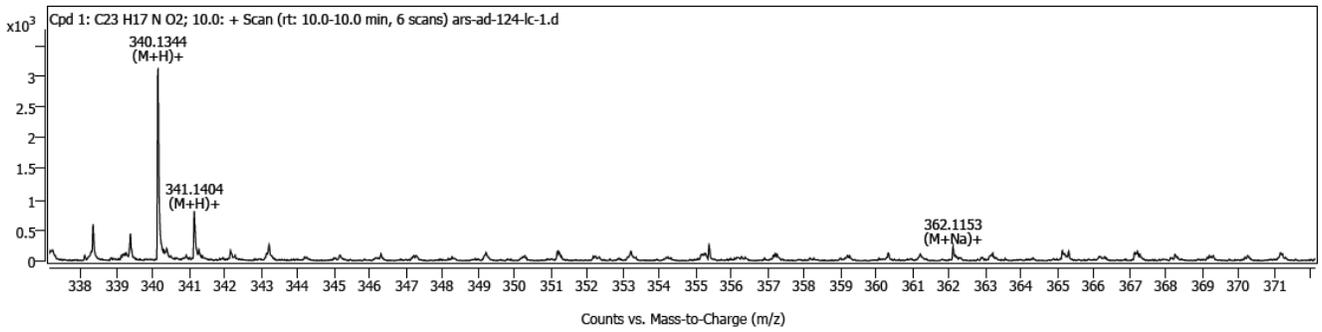
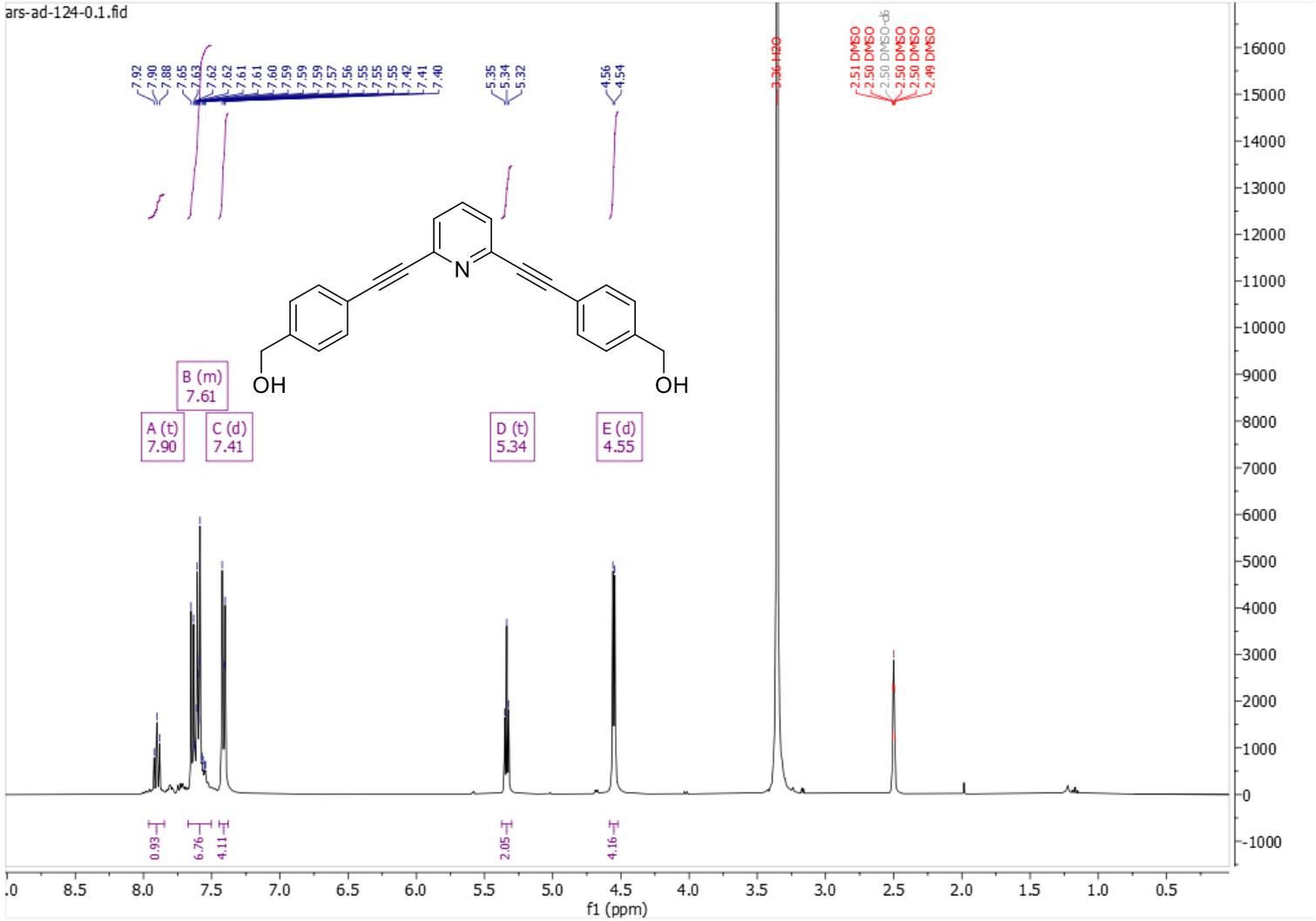
Ion Species (M+H) <sup>+</sup>	Formula C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> N	Abund 232501	m/z 128.04946	m/z (Calc) 128.04948	Diff (ppm) -0.13
--------------------------------	---	--------------	---------------	----------------------	------------------

ars-ad-113f.2.fid  
sx\_carbon1k DMSO /d chimie 3



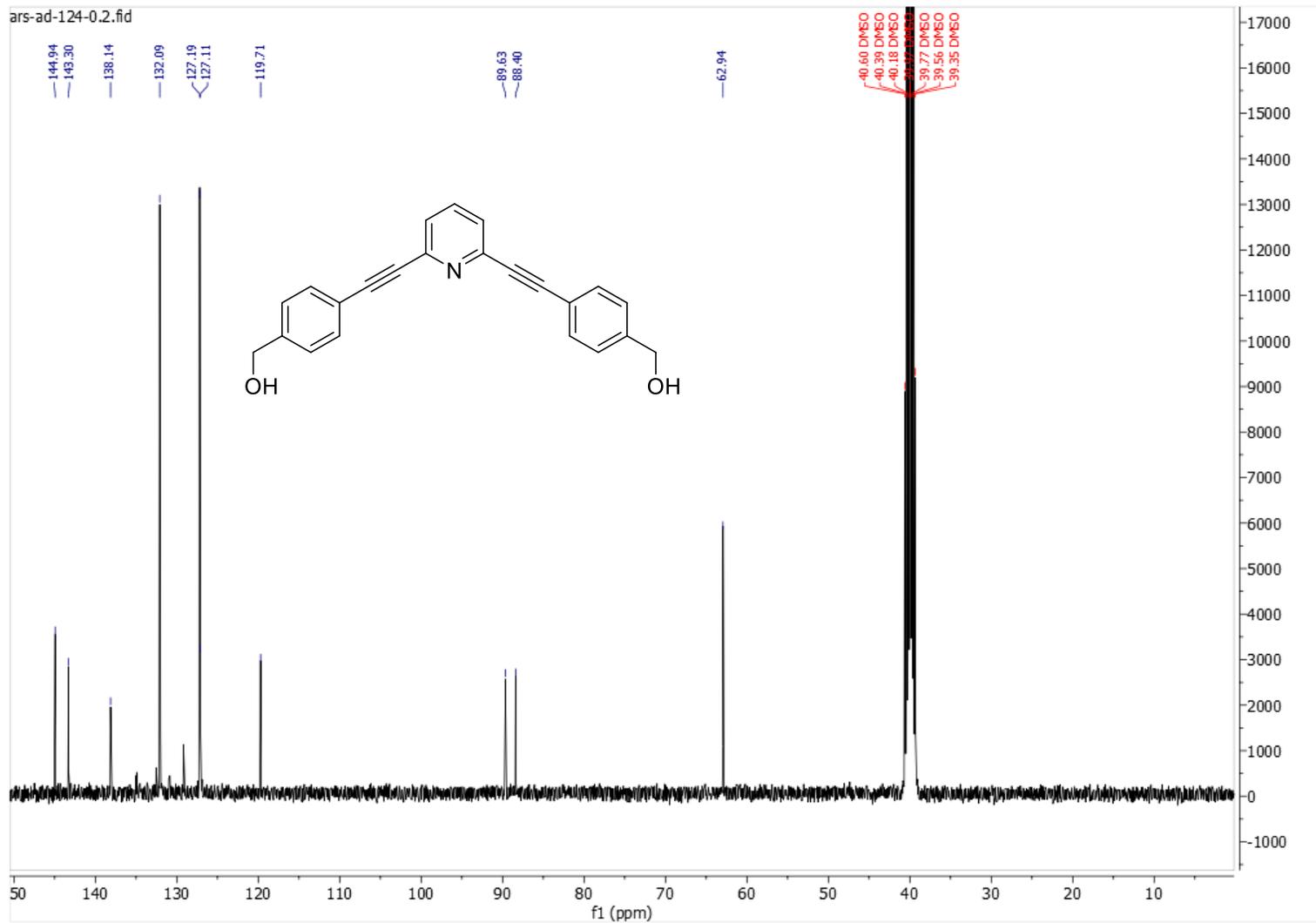
Compound (14):

ars-ad-124-0.1.fid

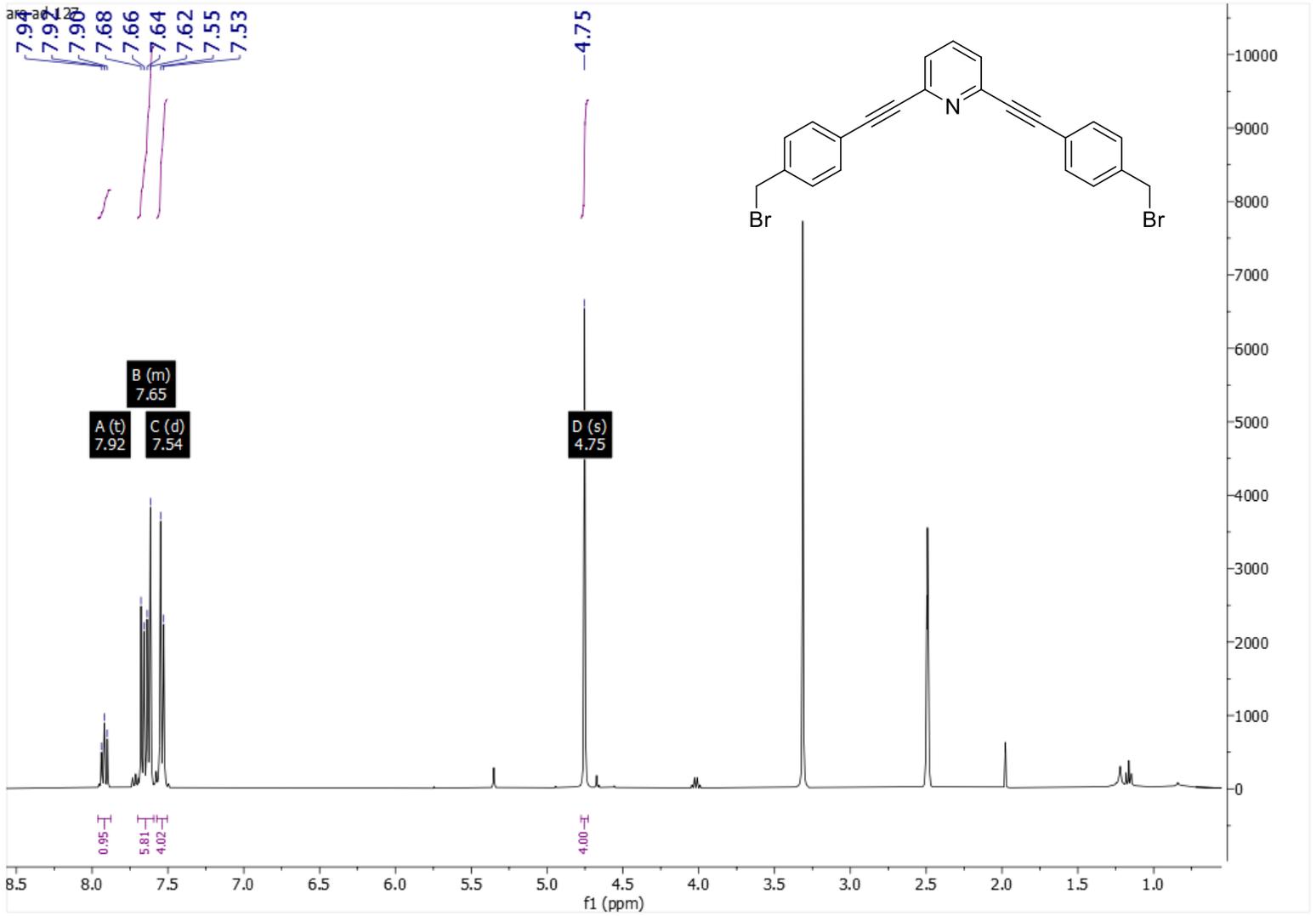


Ion Species	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
(M+H) <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3205	340.13436	340.13321	3.39

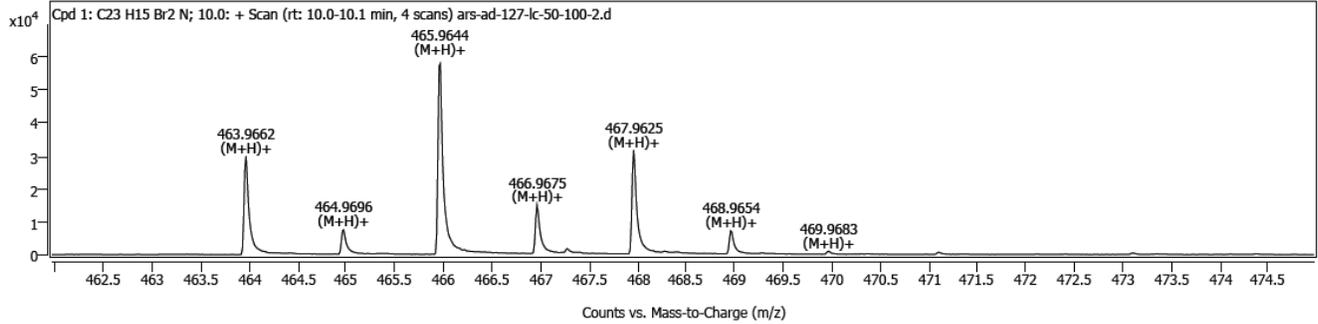
ars-ad-124-0.2.fid



Compound (15):

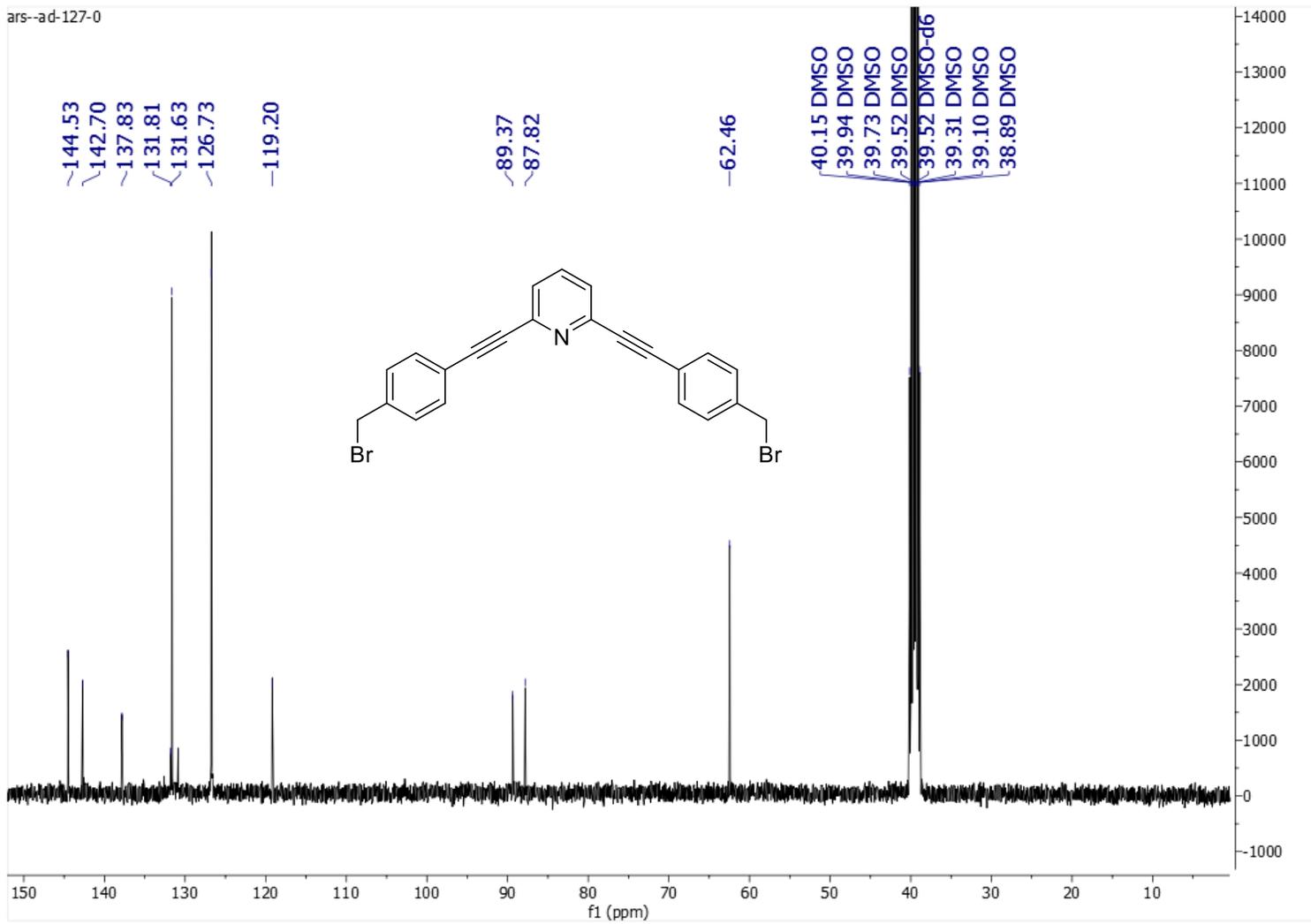


Compound Spectra

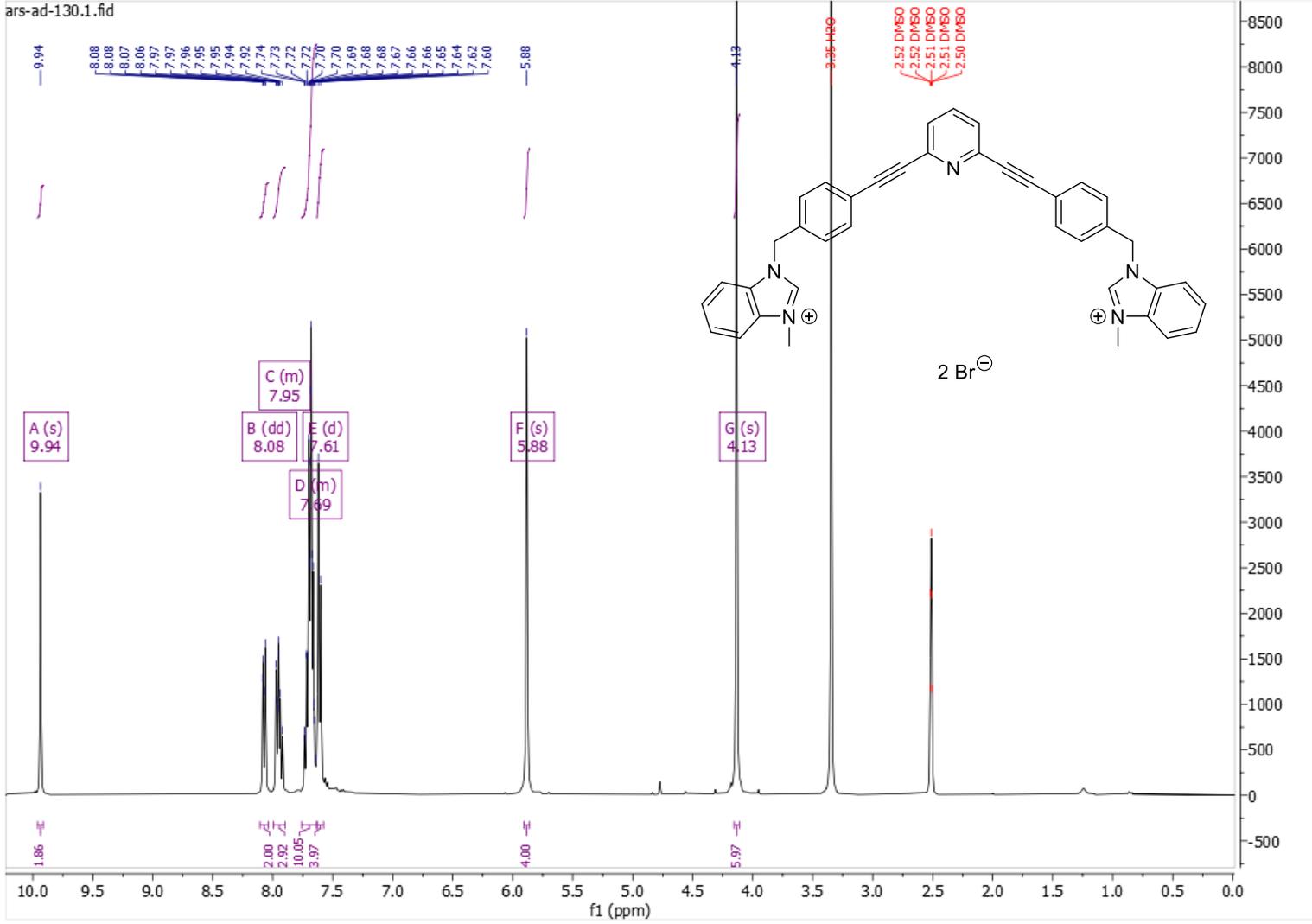


Spectrum Peaks (Max. 1)

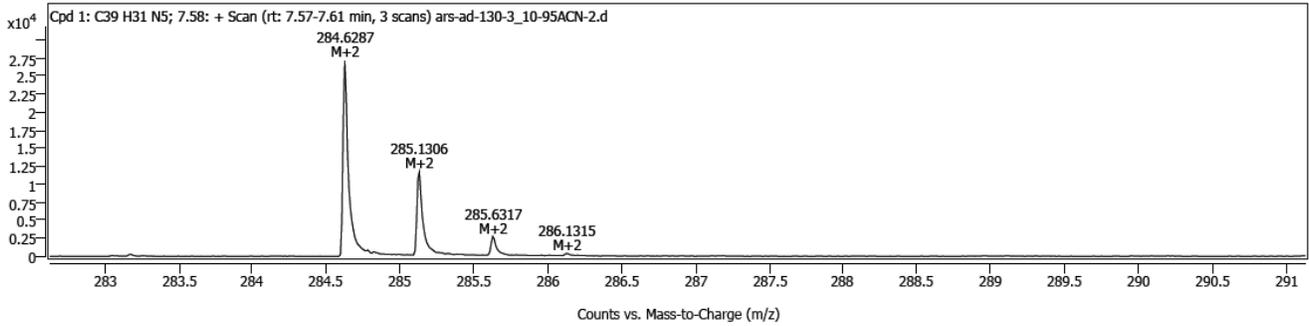
Ion Species	Formula	m/z (Calc)	m/z	Abund	Diff (ppm)
(M+H) <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>15</sub> Br <sub>2</sub> N	465.96249	465.96437	59754	4.03
			<b>XLIII</b>		



Compound (16):

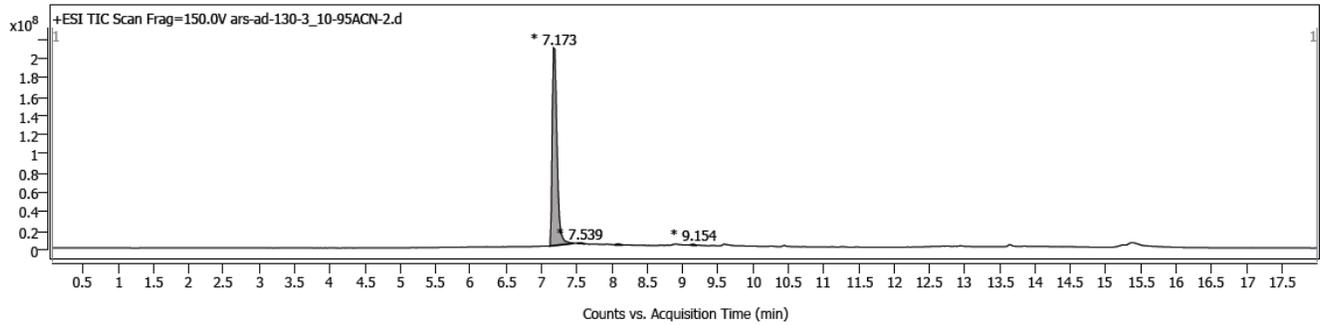


Compound Spectra



Spectrum Peaks (Max. 1)

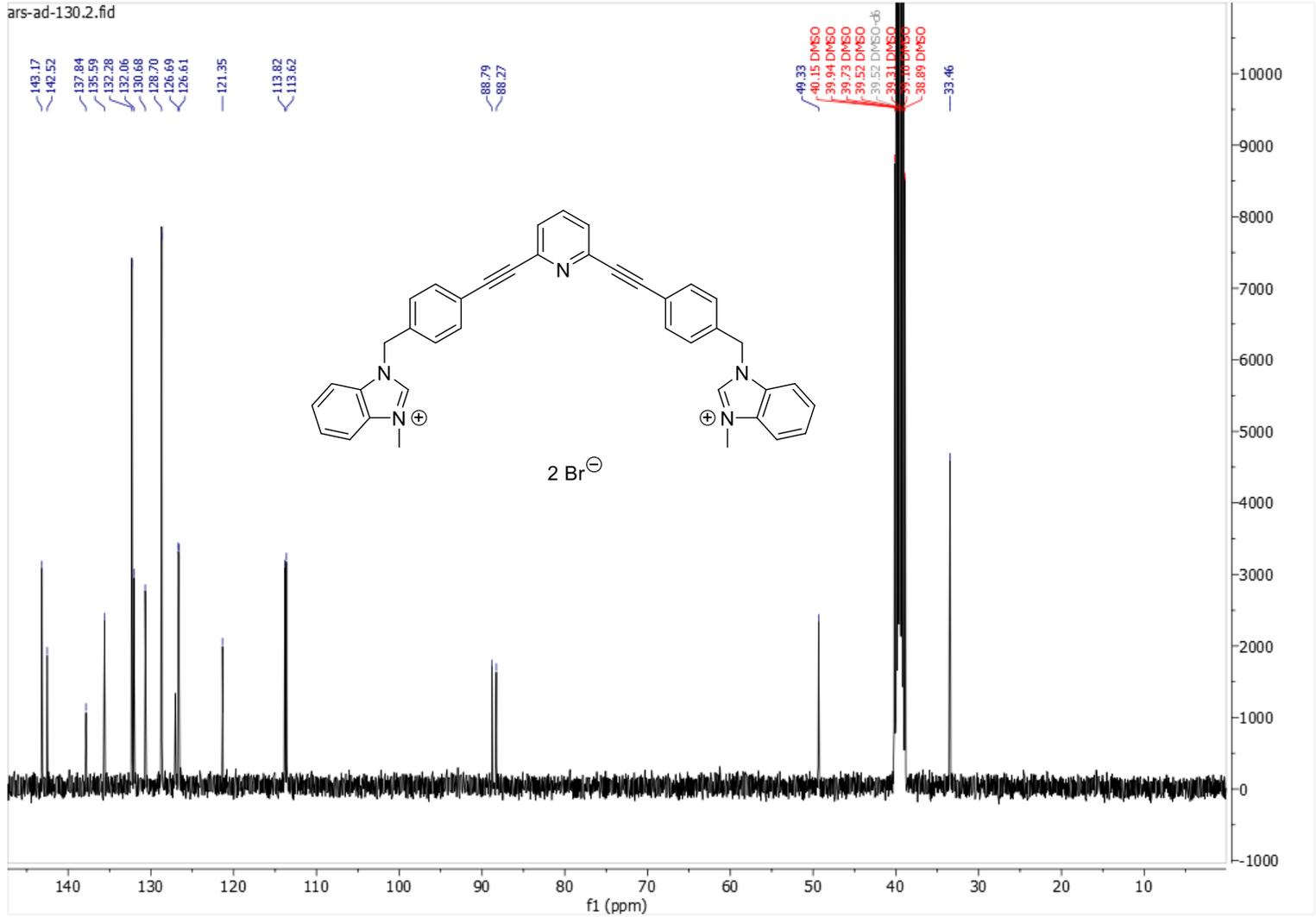
Ion Species	Formula	m/z (Calc)	m/z	Abund	Diff (ppm)
M+2	C39H31N5	284.62842	284.62869	27190	0.93



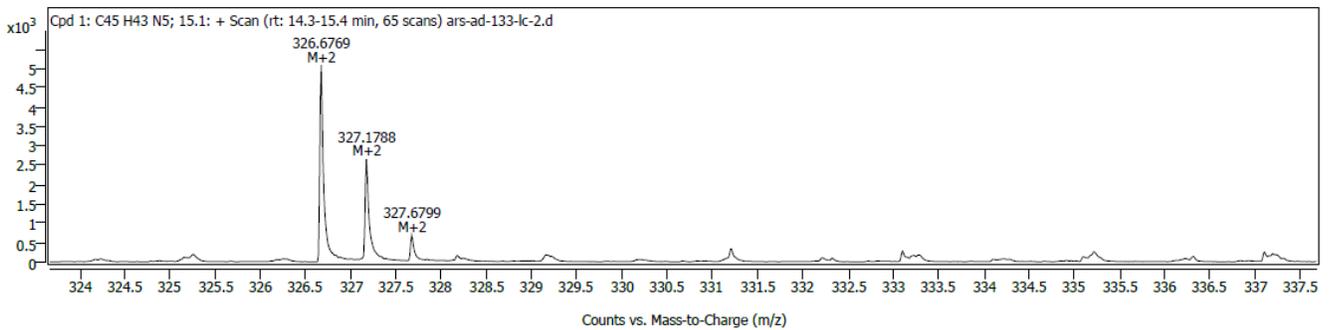
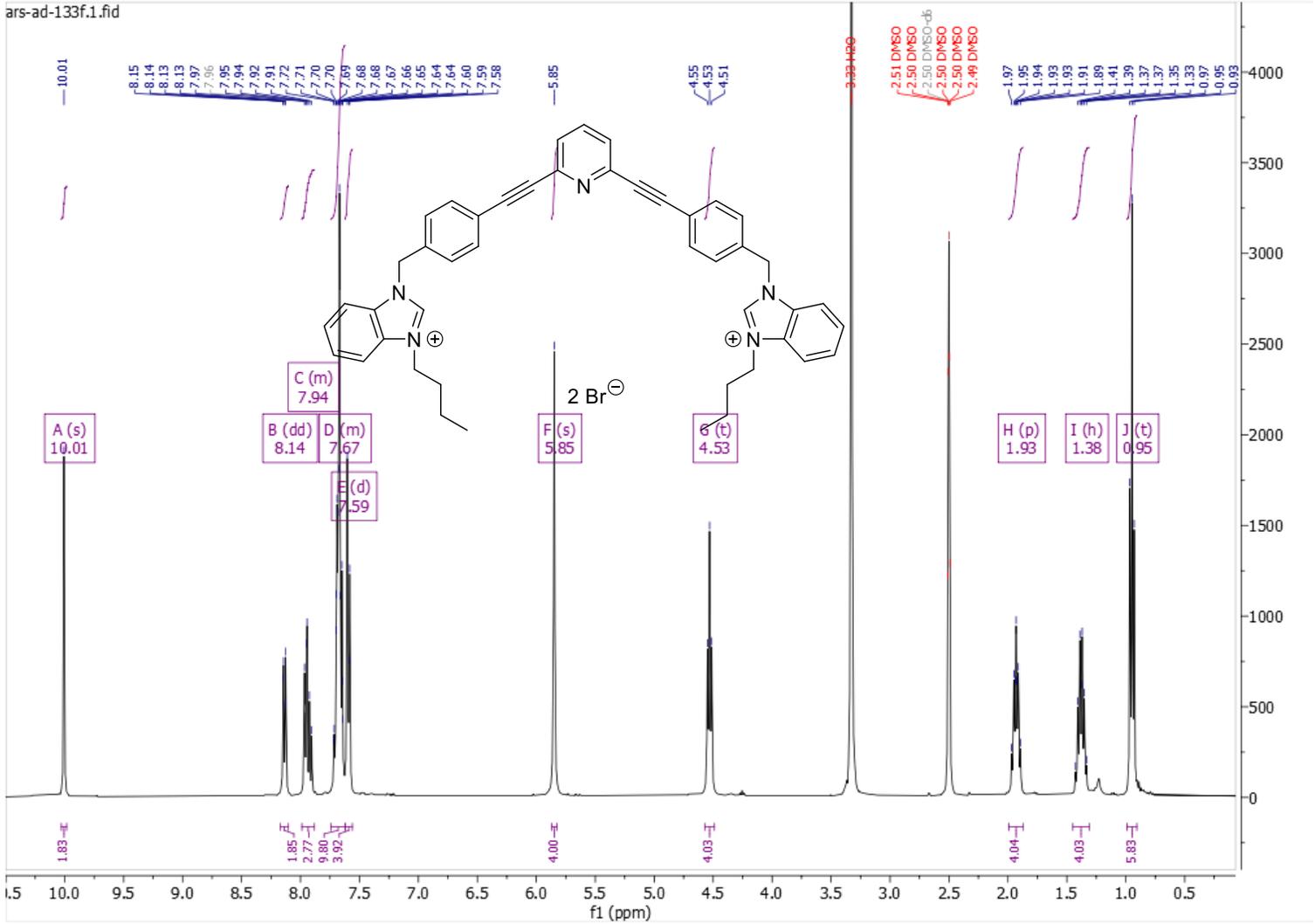
Chromatogram Peaks

RT	Area	Area Sum %
7.2	981753704	99.15
7.5	2076425	0.21
8.1	3715956	0.38
9.2	2602887	0.26

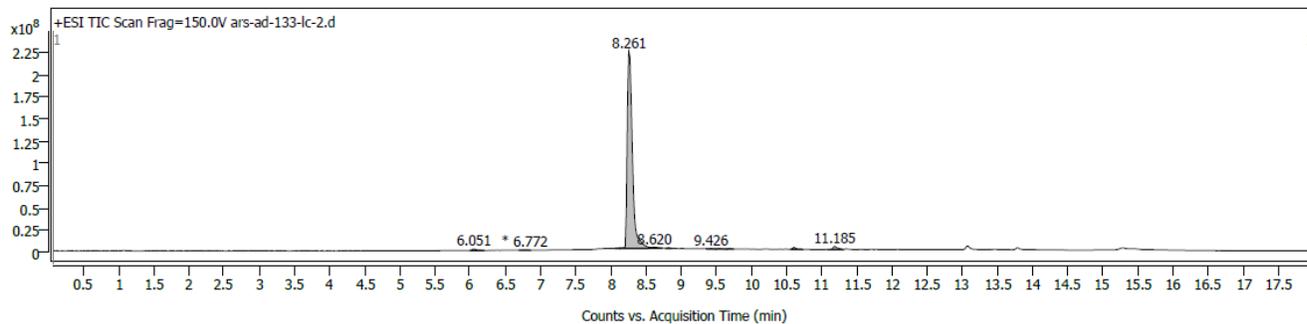
ars-ad-130.2.fid



Compound (17):



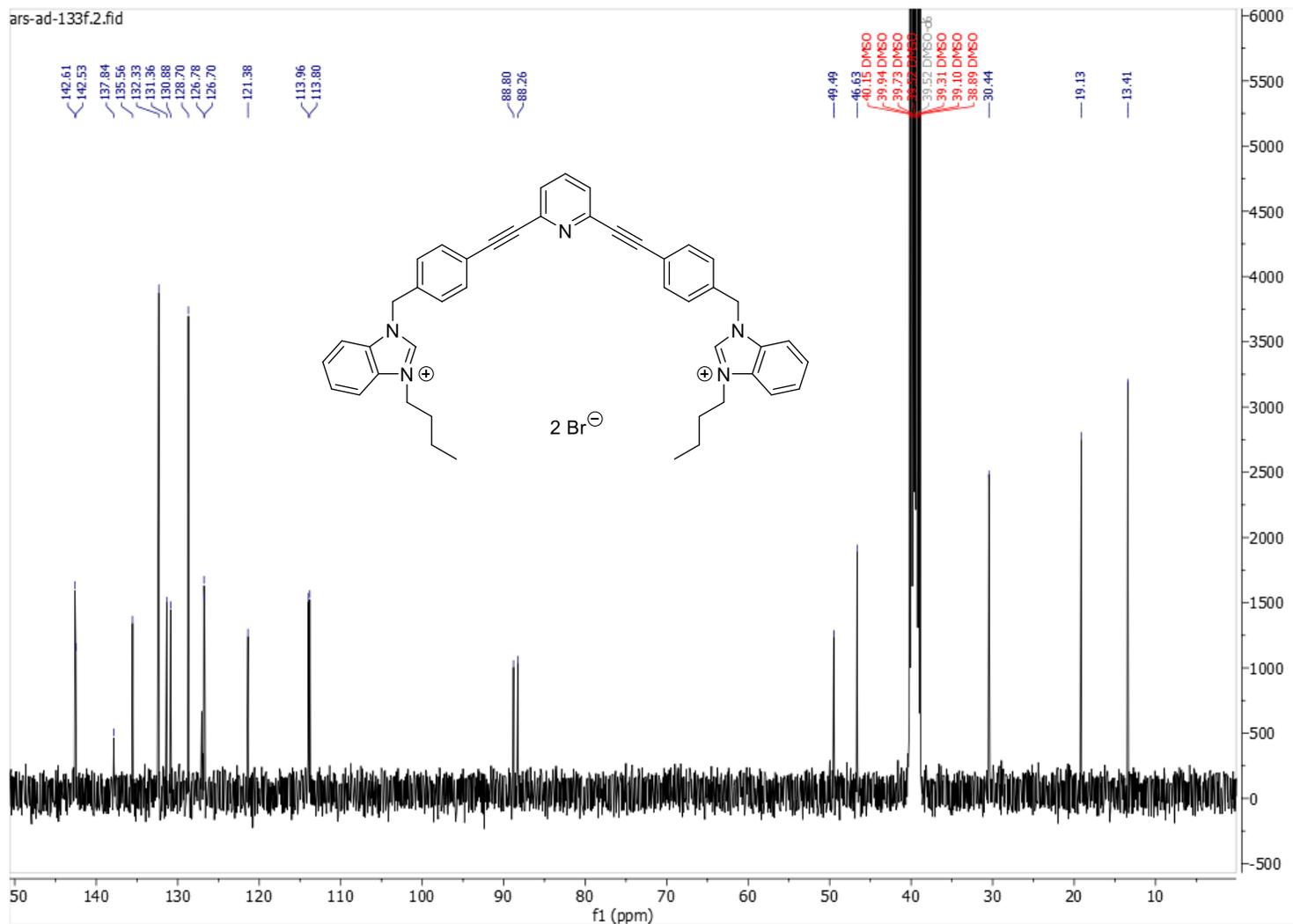
Ion Species	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
M+2	C <sub>45</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub>	5086	326.67689	326.67537	4.64



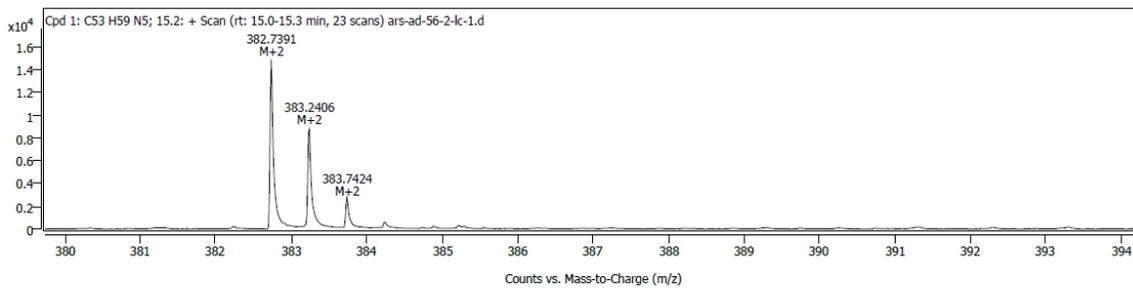
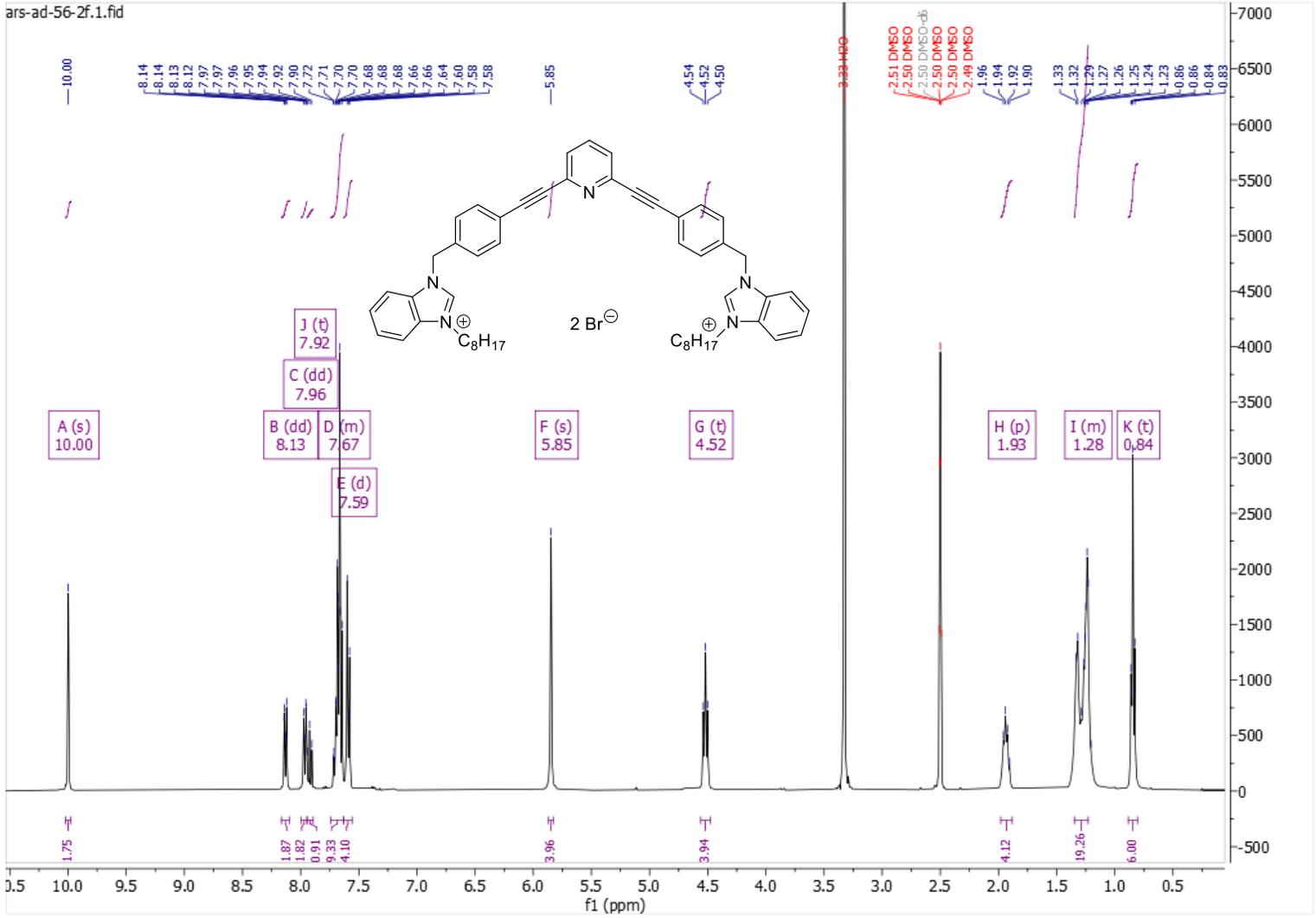
Chromatogram Peaks

RT	Area	Area Sum %
6.1	6157248	0.52
6.8	1341745	0.11
8.1	1363074	0.12
8.3	1134343213	95.98
8.6	7039232	0.60
8.8	1882220	0.16
9.4	2110547	0.18
9.5	2460479	0.21
9.7	2103395	0.18
10.6	6985387	0.59
11.2	16029074	1.36

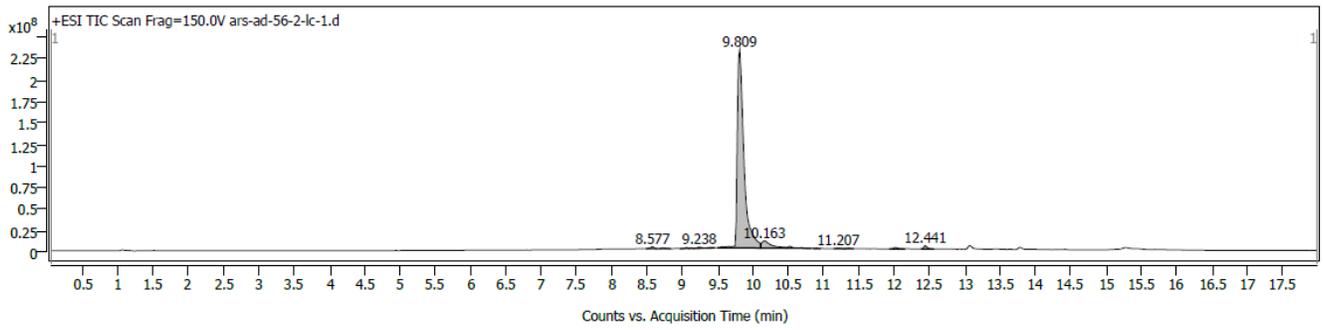
ars-ad-133f.2.fid



Compound (18):



Ion Species	Formula	Abund	m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)
M+2	C <sub>53</sub> H <sub>59</sub> N <sub>5</sub>	15002	382.73914	382.73797	3.04



**Chromatogram Peaks**

RT	Area	Area Sum %
8.6	9504689	0.57
8.7	5151674	0.31
9.1	3478022	0.21
9.1	1676855	0.10
9.2	5299264	0.32
9.4	1888570	0.11
9.6	4955105	0.30
9.7	7053915	0.42
9.8	1505815045	90.69
10.2	78469469	4.73
10.5	7943634	0.48
10.7	1957247	0.12
10.9	1782475	0.11
11.2	2692173	0.16
11.4	2649512	0.16
12.0	6957277	0.42
12.4	13085384	0.79

ars-ad-56-2f.2.fid

