

Université de Montréal

**Synthèse de précurseurs et assemblages supramoléculaires :  
études de leurs propriétés de transport transmembranaire**

Par  
Julie Kempf

Département de Chimie  
Faculté des Arts et des Sciences

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

Août 2016

© Julie Kempf, 2016

## Résumé

Le développement de composés permettant le passage de molécules à travers la membrane cellulaire constitue un domaine de grand intérêt de la chimie et de la biochimie. Certaines maladies, comme la fibrose kystique, sont le résultat d'un dysfonctionnement du transport d'ions chlorure et bicarbonate à travers la bicouche lipidique. Ces dernières années, de nouvelles familles de transporteurs synthétiques ont fait leur apparition comme solution de remplacement aux transporteurs naturels. Cependant, la synthèse de systèmes supramoléculaires permettant le transport de larges molécules de part et d'autre de la bicouche lipidique reste, quant à elle, un défi. Ainsi nous présentons dans cette thèse deux systèmes différents: l'un permettant le transport d'ions chlorures et le second capable de combiner transport anionique et transport de macrocycles biologiquement actifs.

Dans un premier temps, nous avons étudié le potentiel ionophore d'un dérivé benzimidazole. Des études mécanistiques ont été menées sur le 2,4,7-triphénylbenzimidazole afin de déterminer son mode d'assemblage dans la membrane phospholipidique, responsable de son efficacité à transporter les anions. Basé sur ces résultats, des analogues de cette molécule possédant des sites de complexation métallique ont été synthétisés afin d'augmenter l'efficacité de ces transporteurs benzimidazole et de contrôler leur auto-assemblage. Ces complexes ont été testés dans des membranes bactériennes afin d'étudier leur capacité à inhiber la croissance des bactéries et à diminuer la tolérance d'une souche bactérienne résistante envers les antibiotiques.

Dans le second volet de cette thèse, nous avons étudié l'utilisation de dérivés parapluies capables de changer de conformation dépendamment de la polarité du solvant, pour le transport d'anions et de macrocycles. La synthèse et la caractérisation d'un nouvel axe et son dimère parapluie sont rapportées dans cette partie. Leur capacité à transporter les anions à travers la membrane des liposomes ou leur insertion dans des membranes bactériennes ont été étudiées. Les premiers essais de synthèses de rotaxanes à partir de ces dérivés parapluies pour le transport de macrocycle biologiquement actif sont rapportés.

**Mots-clés** : benzimidazole, auto-assemblage, complexes métalliques, parapluie moléculaire, acide cholique, rotaxane, transport transmembranaire, liposomes, bactéries, macrocycle, nonactine.

## Abstract

The development of compounds able to transport molecules through cellular membranes is an emerging area of chemistry and biochemistry. Several diseases, such as cystic fibrosis, are the result of a dysfunction of chloride and bicarbonate transport across cellular membranes. In the last few years, new families of synthetic transmembrane transporters were developed in order to restore chloride transport. However, the synthesis of supramolecular systems for the transport of large molecules from one side to the other one of the lipid bilayer remains a challenge. Herein we present two different systems: one for chloride transport and a second one that combines the transport of ions and biologically active macrocycles through cellular membranes.

We first present the anionophoric potential of benzimidazole derivatives. Mechanistic studies were conducted on 2,4,7-triphenylbenzimidazole to determine its self-assembly in a phospholipid membrane and its capacity to transport anions. Two analogues possessing metal coordination sites were also developed and studied for their anion transport properties, as well for the formation of metal-organic assemblies. These complexes were studied in bacterial membranes for their ability to inhibit bacterial growth and to reduce the tolerance of a resistant strain to antibiotics.

In the second part of this thesis, we present the use of umbrella compounds that are able to change their conformation depending on the polarity of the environment. The synthesis and characterization of a new umbrella thread and its dimer are reported in this section. Their ability to transport anions through liposomal membranes or their insertion into more complex bacterial membranes are studied. The first attempts to assemble rotaxanes with the umbrella compounds and an active macrocycle are presented.

**Keywords:** benzimidazole, self-assembly, metal complex, molecular umbrella, cholic acid, rotaxane, transmembrane transport, liposomes, bacteria, cyclic drug, nonactin.



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des schémas.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xviii
<b>Chapitre 1 : Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Transport ionique.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 La membrane phospholipidique.....	2
1.1.2 Transport d'anions.....	3
1.1.2.1 Transporteurs mobiles.....	5
1.1.2.2 Transporteurs de type canal.....	7
1.1.2.2.1 Canaux monomériques.....	7
1.1.2.2.2 Assemblages supramoléculaires.....	9
1.1.2.2.3 Assemblages métalliques.....	12
1.1.3 Méthodes analytiques pour déterminer le transport ionique.....	14
1.1.3.1 L'électrode sensible aux chlorures.....	14
1.1.3.2 Les sondes fluorescentes.....	14
1.1.3.3 Interprétation des résultats.....	16
<b>1.2 Benzimidazoles et sels de benzimidazoliums.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Généralités.....	18
1.2.2 Activité biologique des benzimidazoles.....	19
1.2.3 Les benzimidazoles et sels de benzimidazoliums en transport transmembranaire.....	22
<b>1.3 Transport de larges molécules et dérivés d'acides choliques.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Exemples de transport de larges molécules.....	25
1.3.2 Les parapluies moléculaires.....	28
1.3.2.1 Principes et structure.....	28

1.3.2.2 Mécanismes de transport des parapluies moléculaires .....	30
1.3.2.2.1. Pour le transport de grosses molécules .....	30
1.3.2.2.2 Pour le transport ionique.....	32
1.3.3 Activité biologiques des acides choliques.....	33
<b>1.4 Les rotaxanes .....</b>	<b>35</b>
1.4.1 Les molécules enchevêtrées.....	35
1.4.2 Assemblage de rotaxanes.....	36
1.4.3 Applications biologiques des rotaxanes.....	38
<b>1.5 Axes et rotaxanes parapluies .....</b>	<b>41</b>
1.5.1 Généralités .....	41
1.5.2 Concept et design des axes parapluies .....	41
1.5.3 Mise en évidence du repliement du parapluie sur l'axe.....	42
1.5.4 Transport transmembranaire et relarguage de la roue.....	43
<b>1.6 Descriptions de mes projets de recherche .....</b>	<b>45</b>
1.6.1 Les dérivés 2,4,7-triphénylbenzimidazoles.....	46
1.6.1.1 Étude des propriétés ionophores du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour le transport transmembranaire d'anions.....	46
1.6.1.2 Utilisation d'analogues du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour la formation d'assemblages métalliques : études de leurs propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques .....	47
1.6.2 Axe et dimère parapluie .....	47
1.6.2.1 Axe et dimère parapluie : études de leurs propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques .....	47
1.6.2.2 Synthèse de rotaxanes parapluie possédant une roue biologiquement active..	49
<b>1.7 Bibliographie.....</b>	<b>50</b>
<b>Chapitre 2 : Etude des propriétés ionophores du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour le transport transmembranaire d'anions. ....</b>	<b>56</b>
<b>2.1 Préface .....</b>	<b>57</b>
<b>2.2 Article 1 : 2,4,7-triphenylbenzimidazole : the monomeric unit of supramolecular helical rod-like transmembrane transporters .....</b>	<b>58</b>
2.2.1 Abstract.....	59

2.2.2 Introduction.....	59
2.2.3 Results and discussion .....	61
2.2.4 Conclusion .....	71
2.2.5 Acknowledgments .....	71
2.2.6 Notes and References.....	71
<b>Chapitre 3 : Utilisation d’analogues du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour la formation d’assemblages métalliques : études de leur propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Préface .....</b>	<b>76</b>
<b>3.2 Article 2 : Metal-organic synthetic transporters (MOST) : from chloride transmembrane transport towards a new strategy to fight resistant bacteria.....</b>	<b>77</b>
3.2.1 Abstract.....	78
3.2.2 Introduction.....	78
3.2.3 Results and discussion .....	81
3.2.3.1 Synthesis .....	81
3.2.3.2 Insertion into the phospholipid membrane .....	81
3.2.3.3 Formation of the metal-ligand complexes .....	82
3.2.3.4 Chloride transport .....	91
3.2.3.5 Antimicrobial activity .....	98
3.2.4 Conclusion .....	103
3.2.5 Acknowledgments .....	103
3.2.6 Notes and References.....	103
<b>Chapitre 4 : Axe et dimère parapluie : études de leurs propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques.....</b>	<b>106</b>
<b>4.1 Préface .....</b>	<b>107</b>
<b>4.2 Article 3 : Membrane active cationic cholic acid-based molecular umbrellas .....</b>	<b>108</b>
4.2.1 Abstract.....	109
4.2.2 Introduction.....	109
4.2.3 Results and discussion .....	111
4.2.3.1 Design .....	111
4.2.3.2 Synthesis .....	112

4.2.3.3 Interaction with the phospholipid bilayer and chloride transport properties ..	114
4.2.3.4 Antibacterial studies.....	122
4.2.4 Conclusion .....	124
4.2.5 Acknowledgments.....	125
4.2.6 Notes and references.....	125
<b>Chapitre 5 : Synthèse de rotaxanes parapluies comportant une roue biologiquement active.....</b>	<b>129</b>
<b>5.1 Introduction .....</b>	<b>130</b>
<b>5.2 Synthèse du rotaxane parapluie .....</b>	<b>131</b>
5.2.1 Mise en évidence de la complexation avec la nonactine : titrage par RMN.....	132
5.2.2 Synthèse du [3]-rotaxane par « <i>capping</i> » suivi de la dimérisation.....	134
5.2.2.1 Titrage RMN avec DB24C8 .....	134
5.2.2.2 Assemblage du rotaxane par « <i>capping</i> » .....	137
5.2.3 Synthèse du [3]-rotaxane par « <i>clipping</i> » .....	139
5.2.3.1 Synthèse de la roue à cliper .....	139
5.2.3.2 Titrage RMN avec la roue 5.7 pour le « <i>clipping</i> ».....	141
5.2.3.3 Assemblage du rotaxane par « <i>clipping</i> » .....	143
5.2.4 « <i>Capping</i> » de macrocycles biologiquement actifs : études préliminaires.....	146
<b>5.3 Conclusion .....</b>	<b>148</b>
<b>5.4 Références.....</b>	<b>149</b>
<b>Chapitre 6 : Conclusions et perspectives .....</b>	<b>150</b>
<b>6.1 Bilan des travaux présentés .....</b>	<b>151</b>
<b>6.2 Perspectives .....</b>	<b>153</b>
6.2.1 La famille des transporteurs 2,4,7-triphénylbenzimidazoles .....	153
6.2.2 Le transport de macrocycles biologiquement actifs par les axes parapluies .....	155
<b>6.3 Les projets dans leur contexte .....</b>	<b>157</b>
<b>6.4 Références.....</b>	<b>158</b>
<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>159</b>
Liste des figures de la partie expérimentale.....	160
<b>Annexe 1 : Partie expérimentale de l'article 1 : « 2,4,7-triphenylbenzimidazole : the monomeric unit of supramolecular helical rod-like transmembrane transporters » .....</b>	<b>166</b>

<b>Annexe 2</b> : Partie expérimentale de l'article 2 : « Metal-organic synthetic transporters (MOST) : from chloride transmembrane transport towards a new strategy to fight resistant bacteria ».....	175
<b>Annexe 3</b> : Partie expérimentale de l'article 3 : « Membrane active cationic cholic acid-based molecular umbrellas ».....	214
<b>Annexe 4</b> : Partie expérimentale du chapitre 5 : Synthèse de rotaxanes parapluies comportant une roue biologiquement active .....	233

## Liste des tableaux

<b>Table 3.1</b> : Stoichiometry of the complexes formed by <b>1</b> , <b>2</b> and <b>3</b> with different metals .....	85
<b>Table 3.2</b> : Chloride efflux at 500 s obtained after the addition of different concentrations of PdCl <sub>2</sub> at 270 s in presence of <b>1</b> , <b>2</b> and <b>3</b> .....	93
<b>Table 3.3</b> : Chloride efflux at 500 s obtained for ligands <b>2</b> , <b>3</b> and their respective preformed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub> and Pd <sup>2+</sup> ( <b>3</b> ), with or without the addition of PdCl <sub>2</sub> at 270 s.....	95
<b>Table 3.4</b> : Chloride efflux at 500 s obtained for transporter <b>1</b> , <b>2</b> and <b>3</b> , with or without addition of PdCl <sub>2</sub> at 270 s, in EYPC or EYPC/cholesterol liposomes.....	96
<b>Table 3.5</b> : Antimicrobial activity (MIC) and chloride transport efficacy (EC <sub>50,500 s</sub> ) of <b>1</b> , <b>2</b> and <b>3</b> .....	99
<b>Table 4.1</b> : Antibacterial activity and transport efficiency of <b>UM</b> and <b>UD</b> . .....	123
<b>Tableau 5.1</b> : Optimisation de l'assemblage du rotaxane <i>via</i> un couplage par métathèse.....	138
<b>Tableau 5.2</b> : Optimisation de la formation du [3]-rotaxane par « <i>clipping</i> » .....	144
<b>Tableau 5.3</b> : Tableau d'optimisation des conditions de synthèse du [3]-rotaxane avec la nonactine. ....	147

## Liste des schémas

<b>Scheme 3.1</b> : Synthesis of ligands <b>1</b> , <b>2</b> and <b>3</b> . .....	81
<b>Scheme 4.2</b> : Multistep synthesis of the umbrella monomer <b>UM</b> .....	113
<b>Scheme 4.3</b> : Umbrella dimer <b>UD</b> synthesis <i>via</i> metathesis.....	113
<b>Schéma 5.1</b> : Synthèse de la roue pour le « <i>clipping</i> ».....	140

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> : Représentation d'une membrane cellulaire. <sup>2</sup> .....	2
<b>Figure 1.2</b> : Perméabilité d'une membrane cellulaire aux différents composés. <sup>8</sup> .....	3
<b>Figure 1.3</b> : Représentation d'un transporteur mobile et d'un canal transmembranaire. ....	4
<b>Figure 1.4</b> : a) Protonation de la prodigiosine <b>1.1</b> en milieu acide permettant la complexation de chlore. b) Structure des analogues de la prodigiosine étudiés par Davis <i>et al.</i> <sup>18, 19</sup> .....	5
<b>Figure 1.5</b> : a) Exemples des cholapodes développés par Davis <i>et al.</i> <sup>24</sup> et b) des dérivés urées de Gale <i>et al.</i> <sup>25</sup> .....	6
<b>Figure 1.6</b> : Autres exemples de familles de transporteurs mobiles. Les pérénosines, <sup>28</sup> les squaramides <sup>29, 30</sup> ou les cyanoguanidines. <sup>31</sup> .....	7
<b>Figure 1.7</b> : Structure du canal monomérique à base de cyclodextrine de Gin <i>et al.</i> <sup>32, 33</sup> (a) et de celui possédant un cœur calix[4]rène des professeurs Tecilla et Izzo <sup>34</sup> (b). ....	8
<b>Figure 1.8</b> : Peptides fonctionnalisés capables de former des canaux transmembranaires. ....	9
<b>Figure 1.9</b> : a) Structure du canal rigide à base de groupement naphtalène-diimide (NDI) <sup>44</sup> et b) du canal NDI auto-assemblé par l'ajout d'un groupement riche en électrons développé par Matile <i>et al.</i> <sup>46</sup> .....	10
<b>Figure 1.10</b> : Structure de l'assemblage de type rosette de Talukdar <i>et al.</i> <sup>47</sup> .....	11
<b>Figure 1.11</b> : a) Structure du complexe carré de Fyles formé à partir de ligands 4-4'-bipyridine et de dérivés lipophiles de palladium. <sup>51</sup> b) Dérivé d'acide cholique de Webb et son assemblage supramoléculaire en présence de Pd(II). <sup>52</sup> .....	13
<b>Figure 1.12</b> : Structure des sondes fluorescentes couramment utilisées pour le transport ionique.....	15
<b>Figure 1.13</b> : Représentation schématique des tests de transport effectués avec des liposomes contenant de la lucigénine.....	16
<b>Figure 1.14</b> : a) Structure du premier NHC de mercure à base de noyaux benzimidazoles et b) structure des NHC de Budagumpi de type pinceur. <sup>69</sup> .....	19
<b>Figure 1.15</b> : a) Structures du ligand axial de la vitamine B12. b) Similarité structurale entre le noyau benzimidazole et la purine.....	20
<b>Figure 1.16</b> : Exemples de composés possédant un noyau benzimidazole et de complexes métalliques ayant des propriétés antibactériennes. ....	21

<b>Figure 1.17</b> : Exemples de médicaments disponibles commercialement possédant un noyau benzimidazole. ....	22
<b>Figure 1.18</b> : Exemples de transporteurs d'anions comportant le motif benzimidazolium développés dans notre groupe ainsi que l'auto-assemblage de <b>1.28</b> à l'état solide. <sup>76</sup> .....	23
<b>Figure 1.19</b> : Structure des transporteurs de Chen comportant le motif benzimidazole. <sup>77, 78</sup> ..	24
<b>Figure 1.20</b> : Application des nanoparticules de silice pour le transport de principes actifs. <sup>80</sup>	26
<b>Figure 1.21</b> : Liposome développé par Bestel pour le transport de médicaments. <sup>83</sup> .....	27
<b>Figure 1.22</b> : Exemples d'architectures dendritiques utilisant différentes types d'interactions pour le transport de médicaments. <sup>85</sup> .....	28
<b>Figure 1.23</b> : Conformations ouverte et fermée des parapluies moléculaires dépendamment de l'environnement. ....	29
<b>Figure 1.24</b> : Exemples de composés transportés par des parapluies moléculaires. ....	30
<b>Figure 1.25</b> : Mécanisme de transport des parapluies moléculaires à travers la membrane. ....	31
<b>Figure 1.26</b> : Exemple des transporteurs mobiles de Chen à base d'acide choliques. <sup>63, 97, 98</sup> ..	33
<b>Figure 1.27</b> : Similarité structurelle entre un peptide antimicrobien et l'acide cholique exploité par Savage pour concevoir les dérivés céragénines. <sup>99</sup> .....	34
<b>Figure 1.28</b> : Représentation schématique d'un [2]-rotaxane. ....	36
<b>Figure 1.29</b> : Représentation schématique des différentes voies d'assemblage de [2]-rotaxane. ....	37
<b>Figure 1.30</b> : Synthèse du [2]-rotaxane de Tykwinski <i>et al.</i> par reconnaissance active. <sup>104</sup> .....	38
<b>Figure 1.31</b> : a) Rotaxane développé par Smithrud <i>et al.</i> pour le transport de cations <sup>108</sup> et b) structure du rotaxane auto-clivable de Leigh <i>et al.</i> <sup>109</sup> .....	40
<b>Figure 1.32</b> : Structure des axes parapluies développés dans le groupe du Pr. Schmitzer. <sup>115</sup> ..	42
<b>Figure 1.33</b> : Structure du rotaxane parapluie possédant une roue fluorescente.....	43
<b>Figure 1.34</b> : Structure de l'axe parapluie <b>1.46</b> et sa modélisation moléculaire réalisée dans le vide par un calcul PM6 /SCF-MO dans des conditions périodiques afin de démontrer l'assemblage dimérique de l'axe parapluie dans une membrane lipidique. <sup>113</sup> .....	44
<b>Figure 1.35</b> : Structure du premier transporteur possédant un noyau benzimidazolium étudié dans notre groupe et du 2,4,7-triphénylbenzimidazole utilisé dans ces travaux.....	46
<b>Figure 1.36</b> : Dimérisation de l'axe parapluie <b>UM</b> .....	48
<b>Figure 1.37</b> : Formation du [3]-rotaxane parapluie par « <i>capping</i> » grâce à la dimérisation. .	49



<b>Figure 2.1</b> : Structure of the benzimidazolium salts previous studied in our group, the 2,4,7-triphenylbenzimidazolium salt <b>1</b> and its unprotonated analog <b>2</b> .	60
<b>Figure 2.2</b> : Packing motif of <b>1</b> illustrating the self-assembly in the solid state.	61
<b>Figure 2.3</b> : Packing motif of <b>2</b> illustrating the self-assembly of <b>2</b> in the solid state.	62
<b>Figure 2.4</b> : Molecular modeling results obtained by semi-empirical PM3 geometry optimization of <b>2</b> in an EYPC bilayer.	63
<b>Figure 2.5</b> : a) Fluorescence of <b>2</b> (0.2 mmol/l) in CHCl <sub>3</sub> at 37 °C. b) Fluorescence of <b>2</b> (10 mol %, 1.0 mmol/l) in the presence of liposomes at 37 °C.	64
<b>Figure 2.6</b> : a) Efflux of Cl <sup>-</sup> in EYPC liposomes (10 mM) containing 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 20 and 30 mol % of <b>2</b> at 37 °C.	66
<b>Figure 2.7</b> : Chloride efflux at 250 s in DPPC liposomes (10 mM) at 30°C, 35°C, 40°C and 45°C obtained using 10 mol% of <b>2</b> .	67
<b>Figure 2.8</b> : HPTS-based transport assay.	68
<b>Figure 3.1</b> : Structure of the 2,4,7-triphenylbenzimidazole ( <b>1</b> ) and its two analogues with donor groups (red) ( <b>2</b> and <b>3</b> ).	80
<b>Figure 3.2</b> : Fluorescence of a) <b>2</b> and b) <b>3</b> in dichloromethane (DCM), in liposomes at 25 °C (15 mol% of each molecule) and after the addition of 0.5 equivalent of PdCl <sub>2</sub> .	83
<b>Figure 3.3</b> : UV-visible spectra of: a) <b>2</b> and b) <b>3</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentration of PdCl <sub>2</sub> .	84
<b>Figure 3.4</b> : Proposed structures of the metal complexes between PdCl <sub>2</sub> and <b>1</b> , <b>2</b> and <b>3</b> .	85
<b>Figure 3.5</b> : UV-visible spectra of <b>2</b> and <b>3</b> in aqueous solution of liposomes in presence of various concentrations of PdCl <sub>2</sub> .	86
<b>Figure 3.6</b> : SEM images of hierarchically sel-assembled gel microstructures (dried samples): a) Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub> and b) Pd <sup>2+</sup> ( <b>3</b> ).	88
<b>Figure 3.7</b> : Molecular modeling: a) PM6/SCF-MO optimized geometries of <b>2</b> and <b>3</b> in the gas phase. b) Palladium complexes Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub> and Pd <sup>2+</sup> ( <b>3</b> ) in an EYPC bilayer after a 200 ps molecular dynamics simulation.	90
<b>Figure 3.8</b> : a) Chloride efflux obtained after the addition of 0.5 equivalents of different metal sources at 270 s in the presence of 12.5 mol% of a) <b>2</b> and b) <b>3</b> in liposomes at 25 °C.	92

<b>Figure 3.9</b> : Chloride efflux obtained after the addition of 0.5 equivalents of PdCl <sub>2</sub> at 270 s in the presence of 12.5 mol% of a) <b>2</b> or b) <b>3</b> in liposomes bathing in different phosphate buffer at 25 °C. ....	97
<b>Figure 3.10</b> : Optical density of <i>Bacillus thuringiensis</i> obtained after several hours of incubation with different concentration of <b>2</b> and <b>3</b> .....	100
<b>Figure 3.11</b> : Tetracycline-resistant <i>Bacillus thuringiensis</i> growth in presence of 5 µl DMSO and 25 µM of <b>3</b> (5 µl in DMSO). The PdCl <sub>2</sub> aliquot (2.5 µl in DMSO) was added after 1 h of incubation with <b>3</b> .....	102
<b>Figure 4.1</b> : Structure of the umbrella dimer <b>UD</b> .....	112
<b>Figure 4.2</b> : Schematic representation of the liposomes and the lucigenin assay. ....	115
<b>Figure 4.3</b> : Relative chloride efflux in EYPC (5 mM) liposomes promoted by different concentrations 1 mol% to 30 mol% of (a) <b>UM</b> and (b) <b>UD</b> .....	116
<b>Figure 4.4</b> : Carboxyfluorescein leakage assays in EYPC liposomes. (a) <b>UM</b> and (b) <b>UD</b> ..	118
<b>Figure 4.5</b> : HPTS-based transport assay for <b>UM</b> (a) and <b>UD</b> (b) at 13.5 mol% .....	121
<b>Figure 4.6</b> : Antibacterial activity of <b>UM</b> in <i>E. coli</i> after 24 h .....	123
<b>Figure 5.1</b> : Structures de l'acide nonactique et de la famille des macrotétrolides.....	130
<b>Figure 5.2</b> : Synthèse du rotaxane parapluie par dimérisation. ....	131
<b>Figure 5.3</b> : Structures de l'axe parapluie <b>UM</b> et de la nonactine. ....	132
<b>Figure 5.4</b> : a) Spectres RMN <sup>1</sup> H 400 MHz dans CH <sub>3</sub> CN/MeOD 9/1 de l'axe parapluie <b>UM</b> en présence de différentes concentrations de nonactine. ....	133
<b>Figure 5.5</b> : a) Spectres RMN <sup>1</sup> H 400 MHz dans CH <sub>3</sub> CN/MeOD 9/1 de l'axe parapluie <b>UM</b> , de la roue DB24C8 et du mélange 1:1 <b>UM</b> :DB24C8 après 2 h de complexation .....	136
<b>Figure 5.6</b> : Assemblage du [3]-rotaxane par « <i>clipping</i> » de la roue.....	139
<b>Figure 5.7</b> : a) Spectres RMN <sup>1</sup> H 400 MHz dans CH <sub>3</sub> CN/MeOD 9/1 de l'axe parapluie <b>UM</b> en présence de différentes concentrations de roue <b>5.7</b> . ....	142
<b>Figure 6.2</b> : Structure d'un nouveau dérivé de la famille des 2,4,7-triphénylbenzimidazole. ....	154
<b>Figure 6.3</b> : Acétylation de l'axe parapluie <b>UM</b> . ....	155
<b>Figure 6.4</b> : Design de deux nouveaux axes parapluie pour la synthèse d'un [3]-rotaxane par « <i>capping</i> » <i>via</i> une cycloaddition. ....	156

## Liste des abréviations

18S6	thioéther-couronne comportant 6 atomes de soufre
ABC	famille de protéines transmembranaires ( <i>ATP Binding Cassette</i> )
ADN	acide désoxyribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BF <sub>4</sub>	tétrafluoroborate
CF	carboxyfluoresceine
CTFR	protéine transmembranaire associée à la fibrose kystique qui régule la conductance ionique ( <i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i> )
CLC	famille de protéines formant des canaux de chlores ( <i>CLC family of chloride channels</i> )
δ	déplacement chimique
d	doublet
dansyle	5-(diméthylamino)naphtalène-1-sulfonyle
DB24C8	dibenzo-24-crown-8
DCM	dichlorométhane
dd	doublet de doublets
DLS	diffusion dynamique de la lumière ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
EC <sub>50</sub>	concentration effective à laquelle la moitié de la réponse maximale est atteinte
eq.	équivalent
<i>et al.</i>	et alii (latin de « et autres »)

EYPC	phosphatidylcholine issue de jaunes d'œufs ( <i>Egg Yolk Phosphatidylcholine</i> )
g	gramme
GSH	glutathione
h	heure
HPTS	8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate de trisodium
HR-MS	spectrométrie de masse à haute résolution
Hz	hertz
J	constante de couplage
$K_{\text{ass}}$	constante d'association
KCNK3	protéine formant un canal potassique ( <i>Potassium Channel Subfamily K Member 3</i> )
$\lambda_{\text{em}}$	longueur d'onde d'émission
$\lambda_{\text{ex}}$	longueur d'onde d'excitation
LB	bouillon lysogène, milieu de culture bactérienne ( <i>Lysogeny Broth</i> )
LUV	large vésicule unilamellaire ( <i>Large Unilamellar Vesicle</i> )
m	multiplet
mg	milligramme
MHz	MegaHertz
MIC	concentration minimale inhibitrice ( <i>Minimal Inhibitory Concentration</i> )
mL	millilitre
mM	millimolaire
mmol	millimole
NDI	naphtalène-diimide
nm	nanomètre
NTf <sub>2</sub>	bis(trifluorométhylsulfonyl) amide

OD	densité optique ( <i>Optical Density</i> )
OTf	triflate
PDI	perylène-diimide
PF <sub>6</sub>	hexafluorophosphate
ppm	partie par million
quant.	quantitatif
R	groupement général
RCP	protéine de transport de la riboflavine ( <i>Riboflavin Carrier Protein</i> )
RMN	résonance magnétique nucléaire
s	singulet
t	triplet
t.a.	température ambiante
Tf	transferrine
THF	tétrahydrofurane
UD	dimère parapluie ( <i>Umbrella Dimer</i> )
UM	monomère parapluie ( <i>Umbrella Monomer</i> )
UV	ultraviolet

*À mes parents,*

## Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche, Pr. Andreea Schmitzer, qui m'a accueillie dans son groupe et à rendu cette expérience possible. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, ta confiance, ton optimisme et tes qualités humaines qui m'ont énormément apporté. Les opportunités que tu offres à tes étudiants ainsi que la liberté que tu nous laisses dans l'orientation de nos projets de recherche m'ont énormément formé tout au long de ces cinq années. Tu es une directrice de recherche incroyable, merci pour tout !

Merci également aux membres de mon jury : Pr. Joelle Pelletier, Pr. Alexis Vallée-Bélisle et Pr. Stephen Loeb pour avoir pris le temps de lire et de corriger mon travail.

Durant ces cinq années j'ai rencontré et côtoyé de nombreuses personnes. Des étudiants, des stagiaires et des professeurs que je ne pourrais pas tous énumérer mais qui ont contribué à la réussite de cette thèse. Je pense tout particulièrement à Vincent et Marc qui étaient présents dès mon arrivée et m'ont beaucoup appris, et pas seulement en chimie ! Merci Vincent pour ces journées de travail remplies de bonne humeur et de motivation, et pour nos pauses café matinales. Aux anciens et membres actuels du groupe : Christine, Mathieu, Audrey, Farza, Jérémie, Thierry, ma stagiaire Marie-pier, et les autres pour cette ambiance de travail idéal !

Mais il n'y a pas seulement les personnes de mon groupe que je voudrais remercier, il y a également les membres du groupe voisin que l'on côtoie également au quotidien : Anne-Catherine, Augusto, Antoine, Shawn, Jeff pour leur bonne humeur et leurs réponses, sans oublier leur chef Pr. Shawn Collins.

Je remercie le Pr. Joelle Pelletier pour m'avoir laissé l'accès à ses laboratoires afin de réaliser mes expériences sur les bactéries. Je remercie également son groupe et tout particulièrement Jacynthe Toulouse et Lorea Alejaldre pour leur patience, leur connaissances et surtout pour leur disponibilité en tout temps lorsque j'avais des questions.

J'aimerais aussi remercier le personnel permanent du département de chimie : les membres du service de masse, Sylvie Bilodeau du service RMN, Huguette Dinél et tout particulièrement Gaétan Caron des laboratoires d'enseignement, pour sa bonne humeur et sa

disponibilité, et son sirop d'érable ! Un grand merci aussi à Michel Simard qui m'a formé à la résolution DRX. Ton savoir faire nous a permis de résoudre de sacrés casse-têtes, et tout ça avec ta bonne humeur légendaire.

Une pensée pour tous mes amis qui m'ont aidé et encouragé. Les « français », qui malgré la distance et le décalage horaire étaient présents : Florie, Mélanie, Stéphanie et Morgan. Ceux d'ici, les « québécois » : Nadim, Sylvain pour ces 6 ans (déjà !) d'amitié, de bons moments et bien plus encore. Vanessa, pour ta bonne humeur éternelle, ton soutien et tous ces souvenirs partagés.

Enfin, les meilleurs: Julien, pour avoir partagé ces 4 ans de doctorat à mes côtés. Tes conseils mais surtout les fous rires et le soutien que tu m'as apporté sont d'une valeur incomparable ! Et Solène, rencontré en cours de route mais qui a su faire toute la différence ces dernières années. Bien plus qu'une amie, une sœur en or. Et pour tout ce que je ne peux pas écrire ici, un grand merci à vous deux !

Plus personnellement, je voudrais remercier mes parents pour tout le soutien et les encouragements qu'ils m'ont apporté pendant mon doctorat. Je n'en serais pas arrivée la sans vous. Et finalement merci à Clément, pour ton soutien, ton réconfort et tout ce que tu as fait pour moi durant ces années à distance.

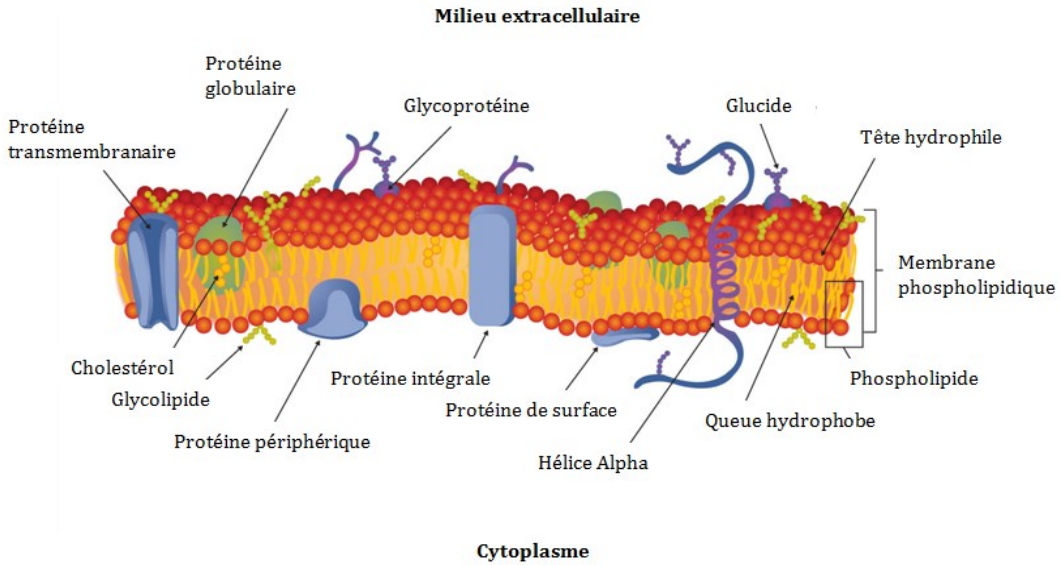


# **Chapitre 1 : Introduction**

# 1.1 Transport ionique

## 1.1.1 La membrane phospholipidique

La membrane cellulaire est une barrière naturelle qui sépare le milieu intracellulaire de l'environnement extérieur. Cette membrane délimitant le cytoplasme est un ensemble complexe principalement constitué de lipides, de protéines et de différents métabolites comme le cholestérol (Figure 1.1). Les phospholipides qui sont les principaux constituants de la membrane sont des lipides amphiphiles possédant une tête polaire et de longues chaînes alkyles hydrophobes qui s'orientent vers l'intérieur de la membrane.<sup>1</sup> Cet ensemble hétérogène qui reste fluide et en mouvement constant, régule les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

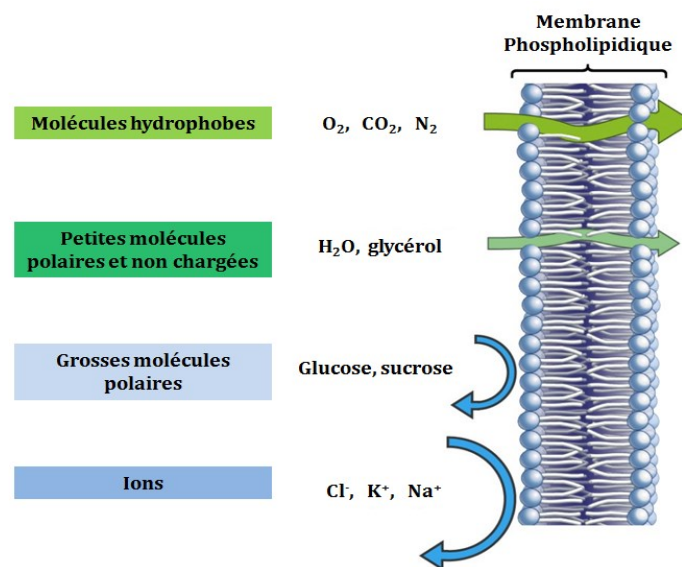


**Figure 1.1** : Représentation d'une membrane cellulaire.<sup>2</sup>

La membrane plasmique est sélectivement perméable aux petites molécules polaires, aux gaz et aux molécules apolaires, mais empêche le libre passage des grosses molécules polaires et des espèces chargées comme les acides aminés ou les ions<sup>3</sup> (Figure 1.2). Cependant, ces composés sont essentiels à la survie de la cellule par la régulation de son volume ou de son pH intracellulaire.<sup>4</sup> Il existe ainsi des protéines transmembranaires dont le

rôle est d'assurer le passage de ces composés de part et d'autre de la membrane phospholipidique.

Les canaux potassiques font partie de ces protéines transmembranaires et se retrouvent pratiquement dans tous les organismes vivants.<sup>5</sup> Parmi eux, le canal KCNK3 («*Potassium Channel Subfamily K member 3*»), présent principalement dans les cellules musculaires, assure le transport des ions  $K^+$  à travers la bicouche.<sup>6</sup> Les transporteurs ABC («*ATP Binding Cassette*») quant à eux, sont des familles de protéines abondamment présentes dans les cellules du foie et des reins.<sup>7</sup> Elles assurent le transport unidirectionnel de plus grosses molécules, comme les stérols ou les macromolécules *via* la consommation d'adénosine triphosphate (ATP).



**Figure 1.2** : Perméabilité d'une membrane cellulaire aux différents composés.<sup>8</sup>

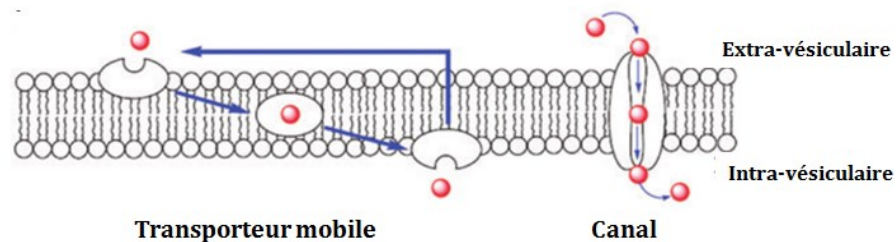
### 1.1.2 Transport d'anions

Plusieurs types de transporteurs transmembranaires facilitent le passage des ions à travers la membrane plasmique. Le transport actif nécessite la consommation de molécules d'ATP afin de permettre le transfert d'ions à travers la membrane, contre le gradient de

concentration.<sup>3</sup> Le transport passif s'effectue sans consommation d'énergie suivant le gradient de concentration, soit *via* une diffusion simple à travers les phospholipides, ou soit facilité par la présence de protéines. Ces protéines peuvent être soit des canaux ioniques ou soit agir comme des transporteurs mobiles.<sup>3</sup> Quel que soit le mode de transport, ces protéines ont pour but d'isoler et de protéger l'ion hydrophile de l'intérieur hydrophobe de la bicouche lipidique afin de permettre son passage.

Malheureusement, lorsque ces protéines transmembranaires sont déficientes l'organisme peut en être fortement affecté et conduire à des maladies appelées canalopathies<sup>9,10</sup> telles que la fibrose kystique ou le syndrome de Bartter.<sup>11</sup> La fibrose kystique est une maladie héréditaire et souvent létale qui touche principalement les caucasiens avec près de 70 000 cas répertoriés dans le monde en 2013.<sup>12</sup> Elle résulte d'une modification du gène *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance* (CTFR) entraînant un dysfonctionnement du canal CTFR transporteur des ions chlorures.<sup>13</sup> Cette absence d'efflux de chlorures à travers la membrane cellulaire modifie l'équilibre ionique dans les cellules, rendant le mucus des poumons et du pancréas plus épais, source de nombreuses infections bactériennes.<sup>14</sup>

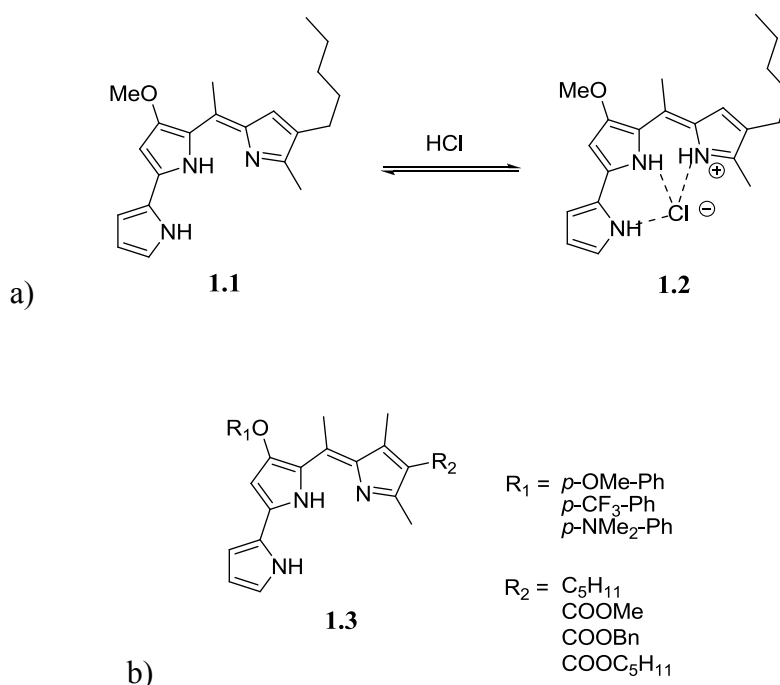
Ainsi, depuis quelques années, de nombreux groupes de recherche se sont penchés sur l'élaboration de composés synthétiques capables de rétablir le transport de chlorure à travers la membrane plasmique, tout en mimant les protéines naturelles. Ces composés se classent en deux catégories : les transporteurs mobiles et les canaux transmembranaires (Figure 1.3).



**Figure 1.3** : Représentation d'un transporteur mobile et d'un canal transmembranaire.

### 1.1.2.1 Transporteurs mobiles

Les transporteurs mobiles sont souvent de petites molécules qui doivent être capables de lier fortement l'ion chlorure, de diffuser à travers la membrane phospholipidique avant de relâcher ce dernier dans le milieu intracellulaire (Figure 1.3). Les premiers transporteurs synthétiques se sont inspirés d'un produit naturel, la prodigiosine. Cette molécule est un pigment rouge produit par des espèces bactériennes telles que la *Streptomyces* et la *Serratia*.<sup>15</sup> En milieu acide, les trois motifs pyrroles de la prodigiosine sont protonés.<sup>16</sup> Ces groupements -NH sont alors capables d'assurer la formation de ponts hydrogènes avec les anions faisant de ce composé un très bon récepteur et transporteur d'ions chlorures<sup>17</sup> (Figure 1.4 a)).



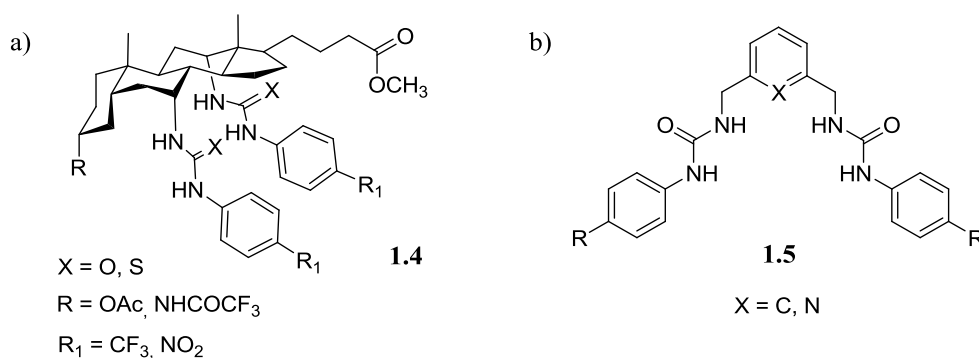
**Figure 1.4** : a) Protonation de la prodigiosine **1.1** en milieu acide permettant la complexation de chlore. b) Structure des analogues de la prodigiosine étudiés par Davis *et al.*<sup>18, 19</sup>

Le caractère ionophore de la prodigiosine a mené plusieurs groupes de recherche tels que ceux des professeurs Davis et Quesada à investiguer l'efficacité des dérivés prodigiosènes, où des modifications structurales sur les cycles pyrroles ont été réalisées<sup>18-20</sup> (Figure 1.4 b)). Ils ont alors démontré que l'ajout de groupements électro-attracteurs sur le squelette de la

molécule diminuait sa capacité à transporter les chlorures à travers les membranes phospholipidiques. Cela s'explique par la diminution du  $pK_a$  de la molécule, qui se retrouve en milieu aqueux principalement sous sa forme déprotonnée et n'est plus capable de complexer les ions chlorures.

Ces premiers résultats ont mis en avant la nécessité d'optimiser certains paramètres : la capacité d'un composé à lier l'anion de façon sélective, de le relarguer dans le milieu intracellulaire, ainsi que son caractère lipophile doivent être pris en compte et optimisés afin de synthétiser un bon transporteur mobile.<sup>21, 22</sup>

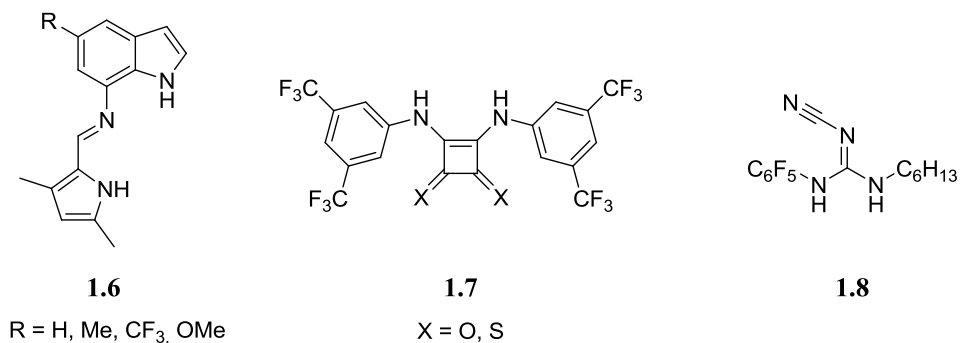
Ainsi, de grandes familles de transporteurs synthétiques ont vu le jour.<sup>23</sup> Parmi elles, les cholapodes développés par Davis *et al.* sont basés sur un squelette d'un acide biliaire comme l'acide cholique par exemple.<sup>4</sup> Les groupements hydroxyles situés en position axiale du cholapode ont été substitués par des groupements urées ou thio-urées, formant ainsi une cavité permettant la complexation d'un anion<sup>24</sup> (Figure 1.5 a)).



**Figure 1.5** : a) Exemples des cholapodes développés par Davis *et al.*<sup>24</sup> et b) des dérivés urées de Gale *et al.*<sup>25</sup>

Ces groupements sont de très bons motifs de reconnaissance pour les chlorures et ont également été utilisés par le groupe du professeur Gale. Il a dans un premier temps étudié une série de composés comportant un unique motif urée ou thio-urée.<sup>26</sup> Des modifications successives du squelette de ces composés ont permis d'optimiser l'efficacité de cette famille pour le transport anionique. Par exemple, en augmentant le nombre de groupements fluorés

cela permet d'accentuer le caractère lipophile du composé, jouant sur sa capacité à transporter les anions.<sup>26, 27</sup> Les dérivés de la molécule **1.5** font partie des récents travaux du professeur Gale sur la synthèse de nouveaux transporteurs mobiles.<sup>25</sup>



**Figure 1.6** : Autres exemples de familles de transporteurs mobiles. Les pérénosines,<sup>28</sup> les squaramides<sup>29, 30</sup> ou les cyanoguanidines.<sup>31</sup>

D'autres transporteurs mobiles basés sur un squelette différent ont été pensés tels que les pérénosines **1.6**,<sup>28</sup> les squaramides **1.7**<sup>29, 30</sup> ou les cyanoguanidines **1.8**,<sup>31</sup> (Figure 1.6) mais aucun de ces composés n'égalent encore l'efficacité des dérivés urées et thio-urées pour le transport mobile des chlorures.

### 1.1.2.2 Transporteurs de type canal

Contrairement aux transporteurs mobiles dont la vitesse de transport des chlorures dépend de la diffusion du transporteur, les canaux transmembranaires sont susceptibles d'échanger les anions plus rapidement.

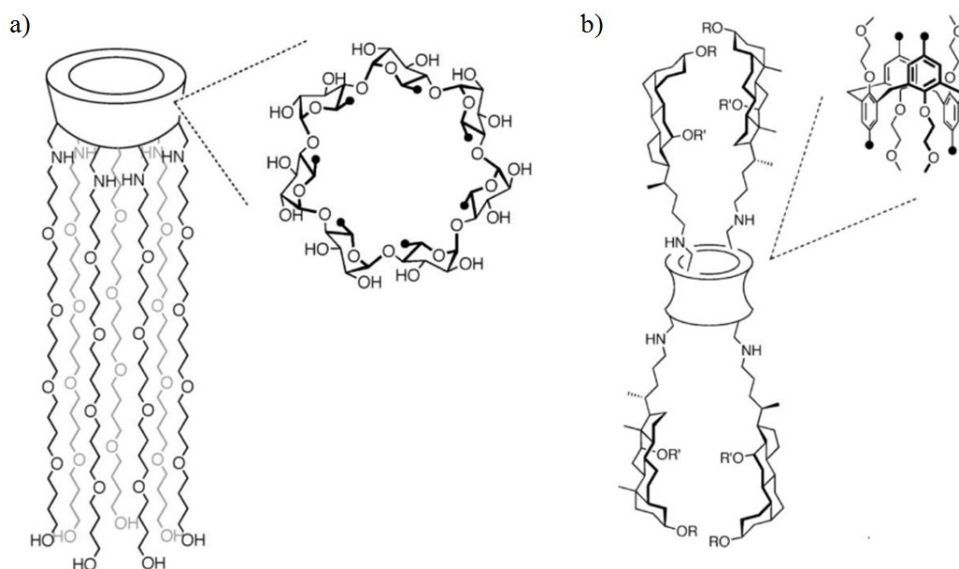
#### 1.1.2.2.1 Canaux monomériques

Dans le but d'imiter la nature et les protéines transmembranaires, les premières idées de design de canaux avaient pour but de créer des unités monomériques. Ces grosses molécules doivent être capables de pénétrer la membrane cellulaire. Ainsi, dans les années 2005, Gin *et al.* développèrent des dérivés de la  $\beta$ -cyclodextrine possédant de longues chaînes

polybutylène glycoles pour permettre au composé de traverser de part et d'autre la membrane plasmique et assurer un transport des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Br}^-$  et  $\text{Cl}^-$ <sup>32, 33</sup> (Figure 1.7 a)).

Les professeurs Tecilla et Izzo ont exploité un dérivé calix[4]arène possédant 4 groupements acides choliques dans sa structure (Figure 1.7 b)) comme canal transmembranaire.<sup>34</sup> Ils ont prouvé que la position des substituants sur le macrocycle influençait l'efficacité de transport de la molécule. En effet, l'alternance en position axiale 1 et 3 des groupements sur le calix[4]arène (Figure 1.7 b)) permet un transport de cations, alors que son homologue possédant les 4 acides choliques du même côté du macrocycle est beaucoup moins actif.<sup>34</sup> Cette différence s'explique par la capacité de ce composé, contrairement à son homologue, à totalement traverser la membrane, créant un pore pour le passage des ions.

Cependant, la conception d'un composé capable de traverser de part et d'autre la membrane plasmique amène souvent à de grosses molécules dont la synthèse est relativement longue. Les chercheurs se sont alors penchés sur l'exploitation de la chimie supramoléculaire pour créer des canaux auto-assemblés à l'aide de plus petites molécules.



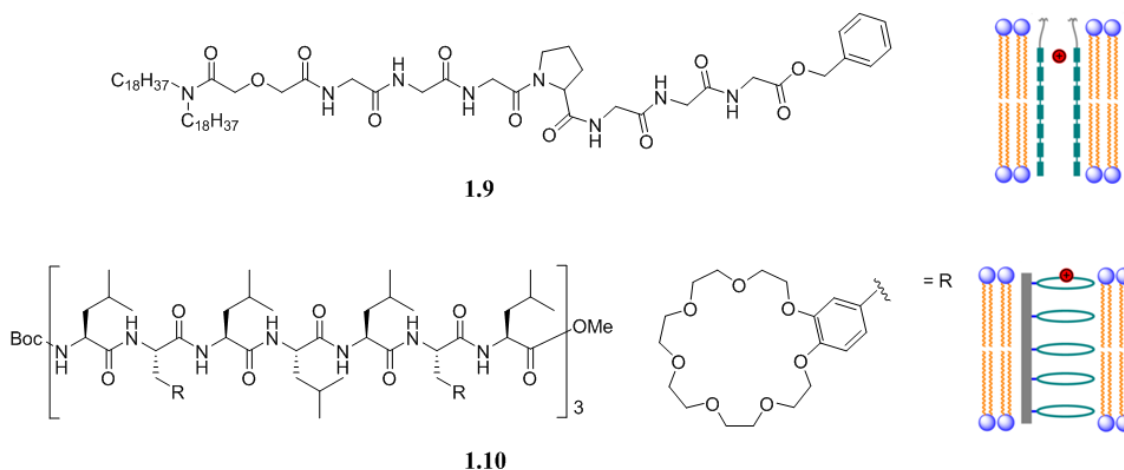
**Figure 1.7** : Structure du canal monomérique à base de cyclodextrine de Gin *et al.*<sup>32, 33</sup>(a) et de celui possédant un cœur calix[4]arène des professeurs Tecilla et Izzo<sup>34</sup> (b).



### 1.1.2.2 Assemblages supramoléculaires

Le groupe du professeur Gokel fait partie des premiers chercheurs à avoir utilisé des chaînes peptidiques, inspirées de la structure des canaux transmembranaires de chlorures de la famille des CLC (« *CLC family of chloride channels* » en anglais), pour former des canaux auto-assemblés.<sup>35</sup> Ces peptides synthétiques sont capables de s'agencer en oligomères dans la membrane et ainsi permettre la diffusion des chlorures<sup>35, 36</sup> (composé **1.9** Figure 1.8). Par des modifications successives, telles que le changement d'un acide aminé<sup>37, 38</sup> ou la modification du groupement terminal de la chaîne peptidique,<sup>39, 40</sup> les auteurs ont pu optimiser le transport de chlorures.

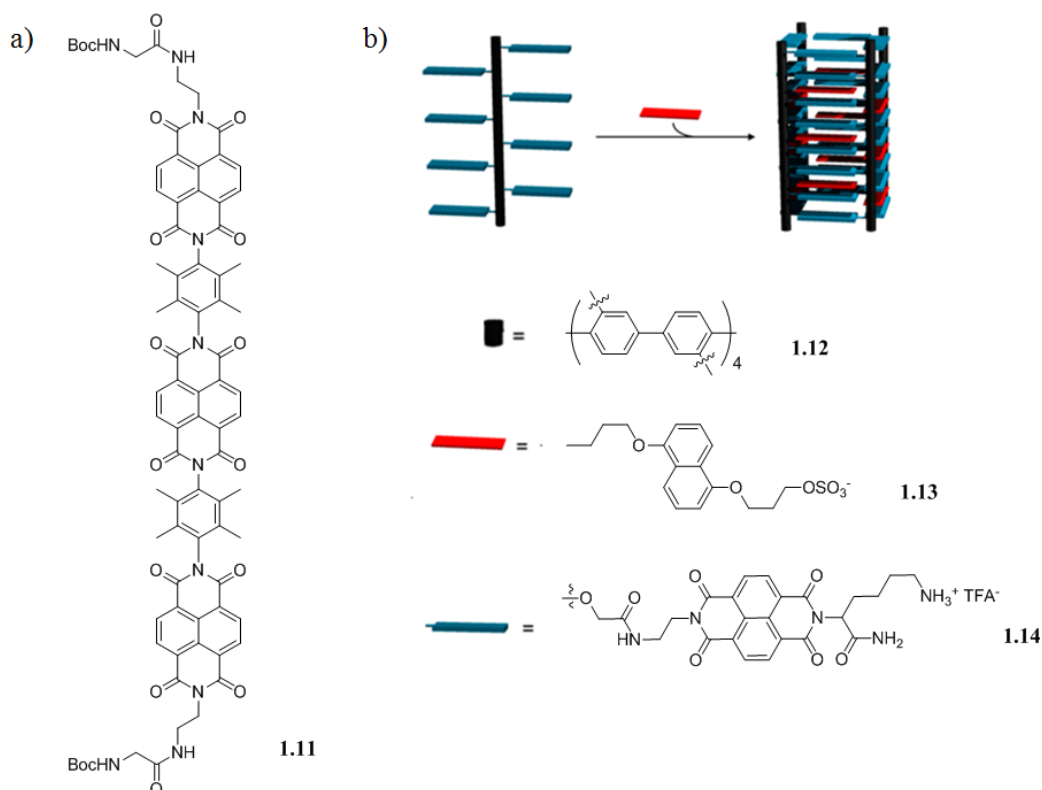
Exploitant la configuration naturelle en hélice  $\alpha$  des peptides, le professeur Voyer créa une chaîne peptidique portant des éthers couronnes placés à des positions stratégiques dans la structure.<sup>41, 42</sup> Le repliement en hélice  $\alpha$  permet alors la superposition des macrocycles formant ainsi un endroit de passage préférentiel dans la membrane pour la diffusion ionique (composé **1.10**, Figure 1.8). Cependant, ces différents assemblages se sont montrés principalement sélectifs aux cations.



**Figure 1.8** : Peptides fonctionnalisés capables de former des canaux transmembranaires.

D'autres stratégies ont alors été envisagées pour favoriser le transport transmembranaire des chlorures. En exploitant les interactions anions- $\pi$ , Matile *et al.* ont

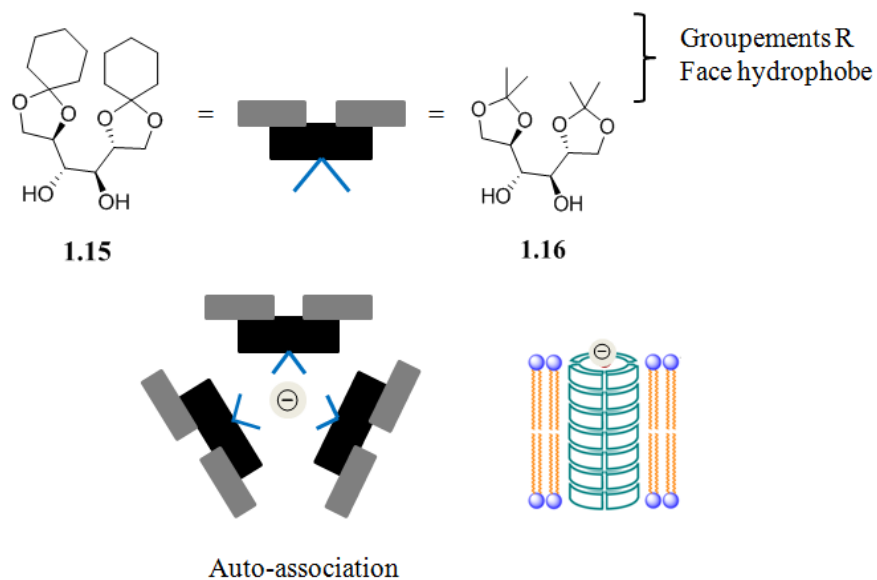
synthétisé un système pauvre en électrons capable de s'insérer dans la membrane phospholipidique (**1.11**). L'utilisation de motifs naphthalènediimide (NDI) ou perylènediimide (PDI) liés entre eux par un noyau benzène permet le passage des anions *via* une succession d'interactions anion- $\pi$ .<sup>43, 44</sup> L'ajout d'une « ancre » hydrophile aux extrémités du composé permet d'orienter l'assemblage rigide dans la bicouche lipidique, augmentant ainsi son efficacité en tant que transporteur et sa sélectivité anionique<sup>45</sup> (Figure 1.9 a).



**Figure 1.9** : a) Structure du canal rigide à base de groupement naphthalène-diimide (NDI)<sup>44</sup> et b) du canal NDI auto-assemblé par l'ajout d'un groupement riche en électrons développé par Matile *et al.*<sup>46</sup>

Les auteurs ont par la suite utilisé le motif NDI (**1.14**) mais cette fois-ci comme groupement latéral d'un axe rigide (**1.12**). Cet assemblage en forme d'échelle permet de transporter les anions à travers la membrane *via* une succession de « sauts » entre chaque unité NDI.<sup>46</sup> Cet ensemble s'avère très efficace quand sa longueur égale parfaitement celle de la bicouche lipidique. De plus, comme observé dans la Figure 1.9 b), lorsqu'un groupement

aromatique riche en électrons (**1.13**) est ajouté au système, cela engendre la formation d'un assemblage très ordonné ouvrant un pore à travers la membrane et permettant ainsi la diffusion rapide des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{OH}^-$ .<sup>46</sup>



**Figure 1.10** : Structure de l'assemblage de type rosette de Talukdar *et al.*<sup>47</sup>

Récemment, le groupe du professeur Talukdar exploite d'autres interactions supramoléculaires, les ponts hydrogènes, afin de concevoir un composé capable de s'auto-assembler en nanotubes (Figure 1.10).<sup>47</sup> Ces dérivés du mannitol sont des composés possédant plusieurs groupements hydroxyles. Dans un solvant apolaire, ces composés sont capables de s'auto-assembler en nanotubes, orientant ses groupements alcools vers l'intérieur de la structure. Ainsi, Talukdar *et al.* démontrèrent que cet assemblage permet le transport des ions chlorures à travers la membrane *via* une succession d'interactions de type ponts hydrogènes entre les groupements alcools des transporteurs et l'anion. De plus, la nature des groupements hydrophobes R sur la molécule semble importante. Il s'est avéré que le composé **1.15** possédant des groupements cyclohexylidènes est actif pour le transport ionique alors que son homologue **1.16** avec des groupements isopropylidènes est inactif. Cela s'explique par les fortes interactions de Van der Waals développées entre le composé **1.15** et les phospholipides

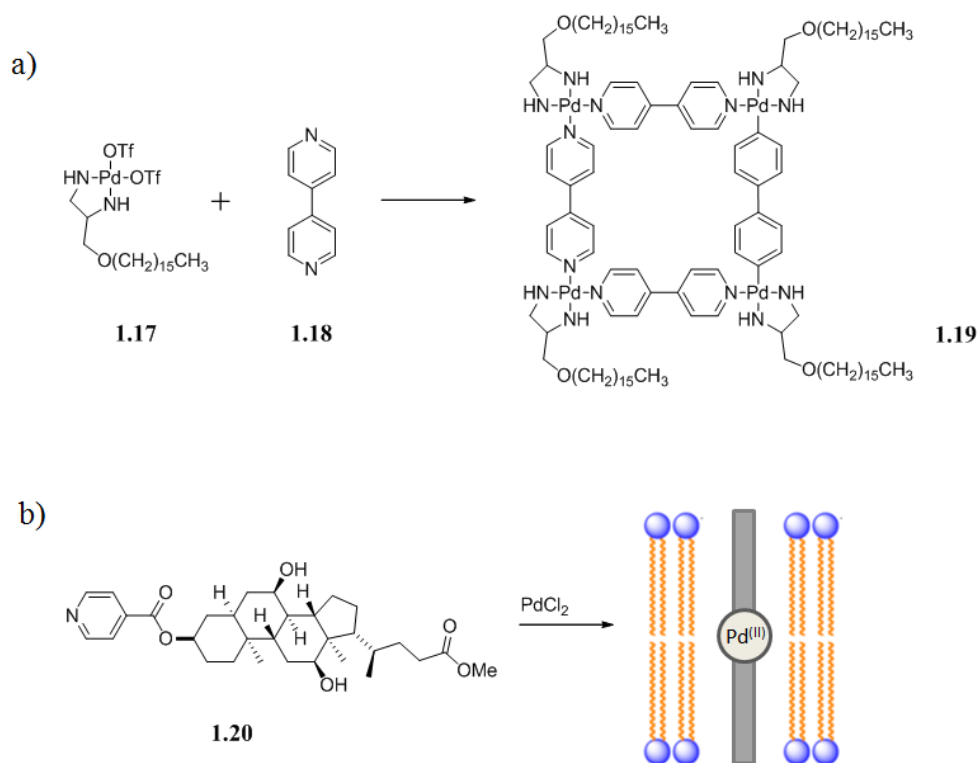
de la membrane, assurant ainsi le maintien de l'intégrité de la structure dans la bicouche lipidique.

#### 1.1.2.2.3 Assemblages métalliques

En restant dans l'optique de contrôler l'assemblage des molécules dans la membrane, plusieurs chercheurs ont exploité la chimie de coordination afin de former des structures métalliques capables de transporter des ions.

Quelques exemples de structures métalliques à base de porphyrines ont été rapportés dans la littérature ces dernières années.<sup>48</sup> L'assemblage de ces grosses molécules à l'aide de métaux comme le palladium<sup>49</sup> ou le rhénium<sup>50</sup> permet la formation de larges pores capables de transporter des molécules aussi grosses que la 5,6-carboxyfluoresceine. Cependant, la synthèse de ces grosses molécules s'avère assez longue et complexe, et les structures formées ont souvent des difficultés à pénétrer dans la membrane phospholipidique. C'est pourquoi la conception de plus petits ligands a été envisagée.

Fyles *et al.* sont les premiers à rapporter en 2007 la formation d'un complexe carré formé de quatre ligands 4-4'-bipyridines et d'un dérivé lipophile de palladium<sup>51</sup> (Figure 1.11 a)). L'addition en premier lieu du palladium amphiphile **1.17** à la membrane permet au métal de se placer à l'interface phospholipides/eau, avec l'insertion de sa chaîne alkyle à l'intérieur de la partie hydrophobe de la bicouche. Puis, l'ajout des ligands bipyridines **1.18** permet la formation du complexe métallique **1.19** à la surface de la membrane. Les tests de conductivité ionique réalisés par les auteurs ont permis d'observer la formation d'un canal capable de transporter des ions. Cependant, de nombreuses autres structures ont également été observées. Cela peut s'expliquer par la présence d'autres groupements compétiteurs capables de se lier au centre métallique (les ions présents en solution par exemple), ainsi que l'équilibre de partition des deux espèces dans la membrane, ce qui peut jouer sur la stœchiométrie du complexe formé dans la bicouche phospholipidique.



**Figure 1.11** : a) Structure du complexe carré de Fyles formé à partir de ligands 4-4'-bipyridine et de dérivés lipophiles de palladium.<sup>51</sup> b) Dérivé d'acide cholique de Webb et son assemblage supramoléculaire en présence de Pd(II).<sup>52</sup>

Dans la même optique, le groupe du professeur Webb a synthétisé un dérivé d'acide cholique possédant une fonction pyridyle terminale (**1.20**).<sup>52</sup> Dans cet exemple-ci, le design de l'assemblage est différent. L'ajout du Pd(II) permet la formation d'un complexe qui traverse de part et d'autre la membrane, avec le métal positionné au milieu de la bicouche phospholipidique (Figure 1.11 b)). Ce complexe forme de larges pores assurant le transport ionique, qui peut être inactivé par l'ajout de thioéther-couronne 18S6, un agent complexant du palladium.

### **1.1.3 Méthodes analytiques pour déterminer le transport ionique**

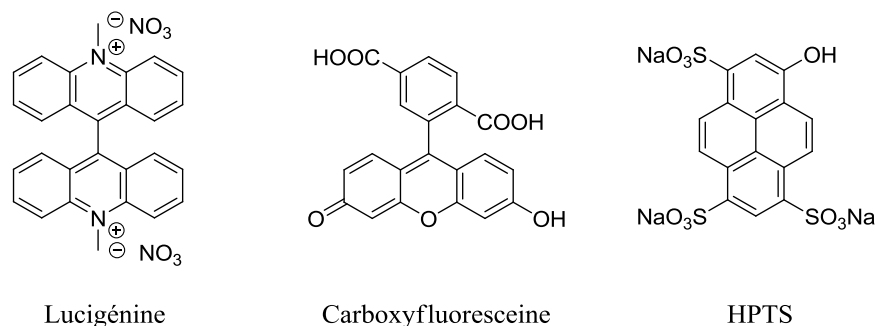
L'approche la plus souvent utilisée pour mesurer le transport ionique à travers une membrane synthétique est l'utilisation de vésicules unilamellaires, les liposomes.<sup>53</sup> Ces modèles de membranes sont constitués d'une bicouche lipidique formée par l'agencement supramoléculaire de phospholipides. Deux grandes techniques en utilisant des liposomes sont employées pour mesurer l'efflux de chlorures à travers ces membranes synthétiques : l'électrode sensible aux chlorures et les sondes fluorescentes.<sup>54</sup>

#### **1.1.3.1 L'électrode sensible aux chlorures**

L'utilisation de l'électrode spécifique au chlorure pour en mesurer le transport d'ions à travers une bicouche phospholipidique est une méthode simple et rapide.<sup>3</sup> La solution intravésiculaire des liposomes est invisible pour l'électrode, ainsi lorsqu'un transporteur est capable d'assurer le passage des chlorures de l'intérieur vers l'extérieur du liposome, la concentration en ions chlorures augmente et le signal est directement détecté par l'électrode. Cette méthode possède cependant quelques limitations. Une solution intravésiculaire concentrée en chlorures est nécessaire afin de permettre la détection d'un changement de concentration ionique extravésiculaire. De plus, certains autres anions comme le bromure peuvent venir interférer dans le signal et fausser le résultat. C'est pourquoi d'autres techniques d'analyses sont aussi utilisées en parallèle.

#### **1.1.3.2 Les sondes fluorescentes**

Différentes sondes fluorescentes peuvent être incorporées dans les liposomes afin de mesurer l'efflux de chlorures. Il existe plusieurs types de sondes fluorescentes,<sup>3</sup> dont les plus utilisées dans la littérature sont la lucigénine, la carboxyfluoresceine (CF) et le 8-hydroxy-1,3,6-trisulfonate de trisodumpyrène (HPTS)<sup>54</sup> (Figure 1.12). Ce sont également ces sondes qui seront utilisées lors des travaux rapportés dans cette thèse.



**Figure 1.12** : Structure des sondes fluorescentes couramment utilisées pour le transport ionique.

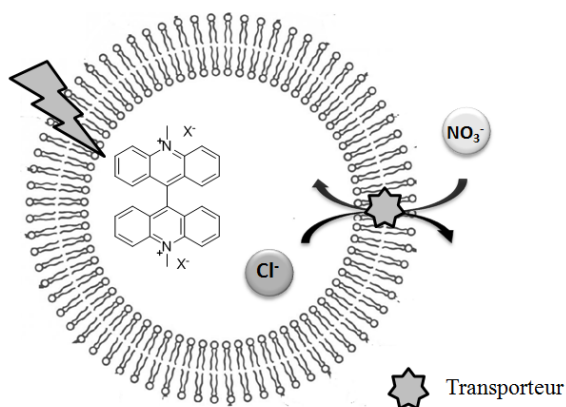
Ces trois fluorophores possèdent des caractéristiques qui leur sont propres. La fluorescence de la lucigénine est désactivée par la présence d'halogénures et plus particulièrement par les ions chlorures.<sup>55</sup> Davis *et al.* ont été les premiers en 2005 à avoir rapporté l'utilisation de cette sonde pour mesurer l'efflux de chlorures à travers une membrane phospholipidique.<sup>56</sup> La carboxyfluoresceine est une molécule plus grosse, de l'ordre de 10 Å x 6 Å, qui possède la propriété de s'auto-désactiver lorsqu'elle est concentrée en solution.<sup>49</sup> La carboxyfluoresceine est généralement utilisée pour étudier la taille des canaux transmembranaires, car dans le cas des canaux ayant un diamètre assez gros, la carboxyfluoresceine peut être libérée dans la solution extravésiculaire. Finalement, la fluorescence de l'HPTS est quant à elle dépendante du pH, et est utilisée surtout pour étudier le transport transmembranaire des protons (H<sup>+</sup>).<sup>57</sup>

La combinaison de plusieurs expériences de transport avec ces différentes sondes fluorescentes permettent de déterminer l'efficacité du transporteur, son mécanisme de transport ainsi que le type d'auto-assemblage formé par celui-ci dans la membrane.<sup>58-61</sup>

### 1.1.3.3 Interprétation des résultats

Lors des expériences de transport avec la lucigénine, les liposomes sont préalablement chargés de la sonde fluorescente et de l'anion d'intérêt, ici le chlorure, tout en prenant soin que le milieu extravésiculaire en soit dépourvu. Les liposomes sont alors dispersés dans un tampon externe comme une solution de nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ) afin d'effectuer les tests de transport (Figure 1.13). En présence d'un composé capable de transporter des ions chlorures de part et d'autre de la bicouche lipidique, une augmentation de la fluorescence sera observée. Il est à noter que plus l'augmentation de la fluorescence de la lucigénine est importante, meilleure est l'efficacité du transporteur, car moins d'ions chlorures restent dans les liposomes.

Cette expérience peut également être réalisée de façon inverse. Certains groupes de recherche, comme celui du professeur Gokel, choisissent de suivre l'entrée des chlorures à l'intérieur de liposomes, entraînant une diminution de la fluorescence de la lucigénine avec le temps.<sup>54</sup>



**Figure 1.13** : Représentation schématique des tests de transport effectués avec des liposomes contenant de la lucigénine.

Par la suite, différentes analyses peuvent être réalisées pour déterminer le mécanisme de transport des chlorures. Afin de conserver l'équilibre ionique constant de part et d'autre de la membrane, le transport de ces ions peut se faire *via* un mécanisme d'antiport (échange de



deux anions) ou *via* un mécanisme symport (transport Cl<sup>-</sup>/cation ou Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>). Ainsi, un mécanisme de transport se faisant majoritairement *via* un antiport d'anions peut être observé en changeant la nature du tampon extravésiculaire. En utilisant des anions dont l'enthalpie d'hydratation varie (par exemple NO<sub>3</sub><sup>-</sup> versus SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)<sup>62</sup> il sera possible d'observer une baisse de l'efficacité du transporteur. Cela s'explique par la difficulté de l'anion hydraté à passer la membrane hydrophobe.<sup>63</sup> Lorsqu'aucune modification du transport n'est observée durant cette expérience, il peut s'agir d'un processus de transport s'effectuant majoritairement *via* un mécanisme de type symport. Afin de l'observer, des tests sont réalisés en remplaçant la lucigénine par l'HPTS. L'HPTS possède une forme protonnée et une forme déprotonnée qui sont respectivement excitées à 403 et 460 nm et émettent toutes les deux à 510 nm.<sup>43</sup> Ainsi, en suivant simultanément la fluorescence des deux formes, il est possible d'observer la variation du pH intravésiculaire et donc, de déterminer si un transport de protons s'effectue simultanément à celui des ions chlorures.

La carboxyfluoresceine (CF) est quant à elle utilisée pour étudier le diamètre d'un canal, et par la même occasion pour vérifier l'intégrité des liposomes lors des tests de transport.<sup>49</sup> Lorsqu'elle est concentrée à l'intérieur des liposomes, sa fluorescence est éteinte. En présence de transporteurs capables de former de larges pores dans la membrane, une augmentation de la fluorescence de la CF est observée. Cependant, cette molécule étant volumineuse, son transport est beaucoup plus lent, comparé à celui des ions chlorures. A l'opposé, une augmentation rapide de la fluorescence de la sonde est caractéristique d'une lyse du liposome induite par la présence du transporteur.<sup>64</sup>

Ces tests de transport utilisant des sondes fluorescentes sont rapides et les résultats sont directement observables par fluorescence. Cependant, des interférences dans la fluorescence des sondes sont observées en présence d'un transporteur possédant une fluorescence qui lui est propre, limitant l'utilisation de ces techniques d'analyse dans ces cas particuliers. L'utilisation de la micro-électrode est alors indispensable.

Comme survolé dans cette première partie, le transport ionique, et plus particulièrement celui des anions, a connu un essor majeur durant les dernières décennies. La multitude de possibilités aussi bien au niveau structurel des molécules, que par les stratégies

utilisées pour concevoir un transporteur synthétique, ont permis de créer une grande diversité de transporteurs synthétiques dans le domaine.<sup>65</sup> La mise au point de techniques analytiques mesurant l'efficacité de ces transporteurs a également évolué au fil des années.

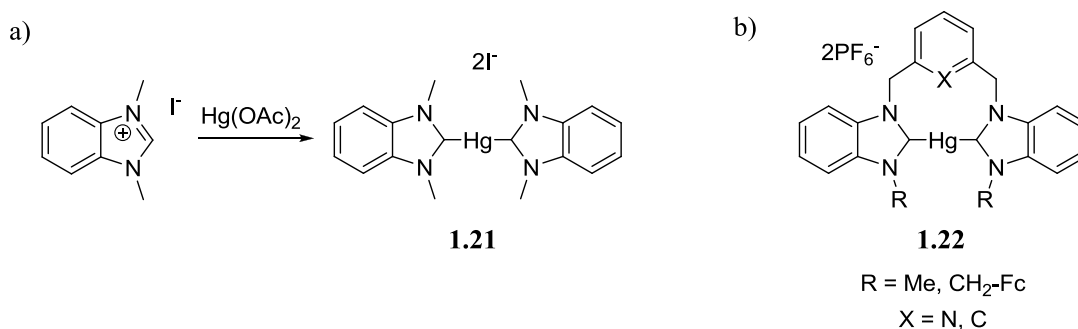
Ces avancées constantes sont essentielles pour la compréhension du mécanisme de transport d'anions dans des systèmes modèles comme les liposomes, mais aussi dans des systèmes plus complexes tels que des organismes vivants.

## 1.2 Benzimidazoles et sels de benzimidazoliums

### 1.2.1 Généralités

Les benzimidazoles sont des composés aromatiques qui résultent de la fusion d'un cycle aromatique et d'un imidazole, et qui possèdent une basicité plus importante que l'imidazole, avec un  $pK_a$  de 12,7.<sup>66</sup> La synthèse la plus courante de benzimidazoles s'effectue par une condensation entre des dérivés *ortho*-phénylènediamine et des dérivés acides carboxyliques. Le benzimidazole, qui est souvent vu comme une extension de son homologue imidazole, est couramment utilisé comme ligand pour des complexes métalliques,<sup>67, 68</sup> comme précurseur de carbène *N*-hétérocyclique (NHC),<sup>69</sup> ou comme composé biologiquement actif.<sup>66</sup>

La première série de NHC réalisée à l'aide du noyau benzimidazole a été rapportée en 1998 par le groupe du professeur Bilsten.<sup>70</sup> Le précurseur du NHC a été obtenu *via* la substitution des azotes en positions 1 et 3 du noyau benzimidazole par des chaînes alkyles substituées ou non. La formation d'un complexe de mercure **1.21** dont le métal est stabilisé par deux NHC benzimidazoles a pu être isolé et caractérisé (Figure 1.14 a)).



**Figure 1.14** : a) Structure du premier NHC de mercure à base de noyaux benzimidazoles et b) structure des NHC de Budagumpi de type pinceur.<sup>69</sup>

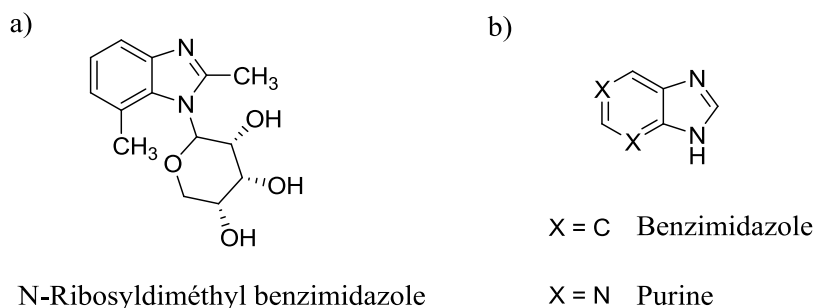
Le groupe du professeur Budagumpi rapporta par la suite la synthèse d'une famille de ligands de type pinceurs (« *pincer-like* » en anglais) **1.22** (CCC ou CNC où les lettres représentent les atomes se liant au métal) comportant deux unités benzimidazoles pour la synthèse de complexes de mercure<sup>69</sup> (Figure 1.14 b)). Ces ligands se sont avérés très stables à la chaleur, à l'humidité et à l'oxygène. De plus, les complexes de mercure sont reconnus pour être de bons carbènes de transfert, permettant une transmétallation avec des métaux tels que l'or, le palladium ou le platine, ce qui a ouvert la porte à la synthèse d'une grande variété de NHC à base de benzimidazole.<sup>69</sup>

Grâce à leur grande stabilité, les complexes de palladium comportant des ligands benzimidazoles ont largement été utilisés ces dernières années comme catalyseurs dans des réactions de couplage,<sup>69</sup> mais également pour des applications plus biologiques.

## 1.2.2 Activité biologique des benzimidazoles

Les benzimidazoles et leurs dérivés sont une importante classe de composés actifs dans les domaines de la médecine<sup>66</sup> et des pesticides.<sup>71</sup> Ils possèdent une large gamme d'activités biologiques comme des propriétés antibactériennes, antifongiques ou encore antivirales.<sup>72, 73</sup> Les premières études menées sur les dérivés benzimidazoles ont commencé avec la résolution en 1955 de la structure de la vitamine B12 possédant un motif 5,6-diméthylbenzimidazole

(Figure 1.15). Les chercheurs ont alors réalisé que les molécules possédant le motif benzimidazole n'étaient pas nocives pour la santé et permettaient d'inhiber la croissance bactérienne.<sup>66</sup> Cette propriété résulte de la similarité entre la structure du benzimidazole et celle de la purine. La purine est une molécule azotée hétérocyclique qui rentre dans la synthèse des acides nucléiques et des protéines qui composent la paroi bactérienne.<sup>66, 74</sup> Le benzimidazole joue alors le rôle d'inhibiteur compétitif de la purine bloquant ainsi la biosynthèse des composés de la membrane ce qui entraîne la mort de la bactérie. C'est une des raisons pour laquelle un bon nombre de composés démontrant une activité antimicrobienne possèdent un motif benzimidazole dans leur squelette.<sup>73</sup>

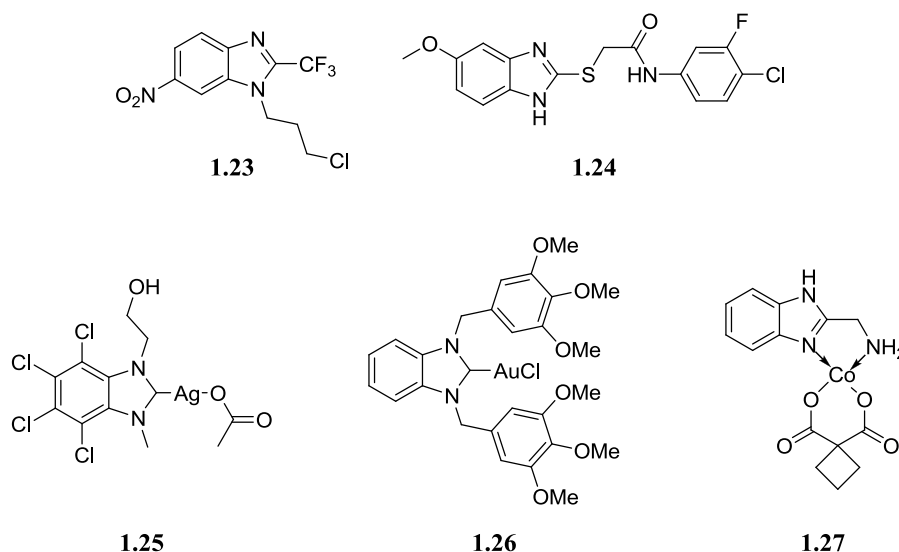


**Figure 1.15** : a) Structures du ligand axial de la vitamine B12. b) Similarité structurale entre le noyau benzimidazole et la purine.

La structure de ces composés actifs est variée, de la plus simple possédant une simple substitution sur le noyau benzimidazole, à la plus complexe, telle que la formation de polymères de benzimidazole. Par ailleurs, dépendamment des substituants présents sur la structure de la molécule, l'agent antimicrobien peut soit viser les bactéries à Gram-positifs soit à Gram-négatifs.<sup>73</sup> Les composés **1.23** et **1.24** (Figure 1.16) sont deux exemples récemment découverts démontrant de bonnes activités antimicrobiennes.<sup>72, 75</sup>

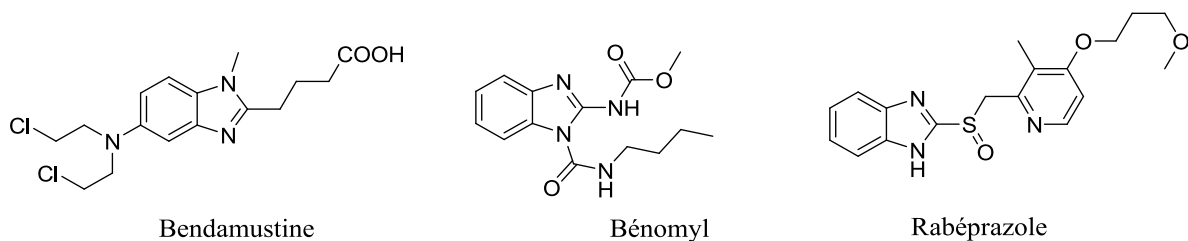
Dernièrement, les travaux effectués dans le but de trouver de nouvelles molécules possédant une activité antimicrobienne ont permis d'observer que certains composés, lorsqu'administrés sous la forme d'un complexe métallique, possédaient une meilleure activité.<sup>73</sup> Cette efficacité s'explique par la présence de lipides et de polysaccharides à la surface des membranes bactériennes pouvant interagir avec le métal. La pénétration du

complexe à l'intérieur de la bactérie est ainsi facilitée et permet à celui-ci d'aller se lier à certaines enzymes, inhibant leur activité. Quelques récents exemples de complexes métalliques antibactériens à base d'argent, d'or ou de cobalt sont représentés dans la Figure 1.16 (1.25 à 1.27).



**Figure 1.16** : Exemples de composés possédant un noyau benzimidazole et de complexes métalliques ayant des propriétés antibactériennes.

Les dérivés benzimidazoles possèdent une large gamme d'activités biologiques et pharmacologiques. Plusieurs médicaments présents sur le marché possèdent un noyau benzimidazole. Parmi ces produits on peut citer un anticancéreux le Bendamustine, le Bénomyl (antifongique) ou le Rabéprazole (antiulcéreux), mais il en existe bien d'autres aux propriétés analgésiques, antidiabétiques ou anti-inflammatoires<sup>66</sup> (Figure 1.17).



**Figure 1.17** : Exemples de médicaments disponibles commercialement possédant un noyau benzimidazole.

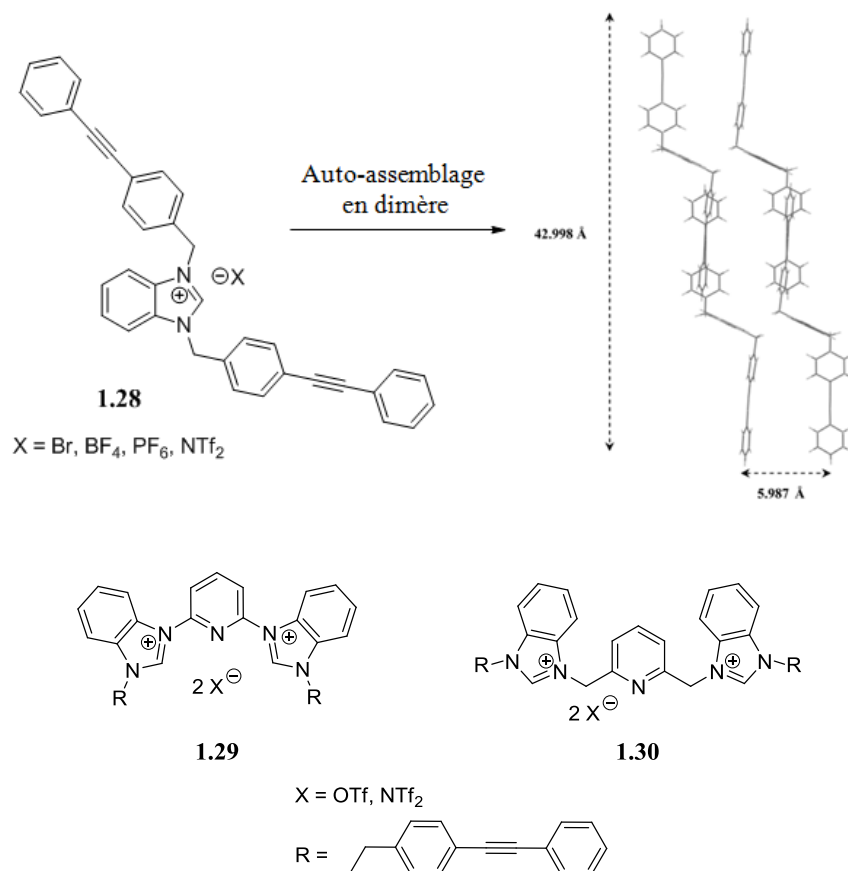
### 1.2.3 Les benzimidazoles et sels de benzimidazoliums en transport transmembranaire

Encore peu utilisé dans le domaine des transporteurs transmembranaires, contrairement à son homologue imidazole, le motif benzimidazole et ses sels correspondants sont cependant un très bon outil pour la confection de transporteurs synthétiques. En effet, la présence du groupement aromatique permet d'augmenter la conjugaison du noyau imidazole, permettant la complexation anionique et sa planéarité, favorise son auto-assemblage grâce aux empilements  $\pi$ .

Notre groupe est le premier à avoir rapporté l'utilisation de dérivés benzimidazoliums pour le transport ionique à travers les membranes.<sup>76</sup> La capacité de ces molécules à permettre le passage des ions chlorures à travers une membrane phospholipidique a été déterminée grâce à l'utilisation de liposomes comportant une sonde fluorescente, la lucigénine. Comme mentionné précédemment (Chapitre 1.1.3.3.), la fluorescence de cette sonde est dépendante de la concentration des chlorures et l'augmentation de sa fluorescence au fil de l'expérience est caractéristique de l'efficacité du transporteur.

L'ajout de deux bras phényléthynylbenzyles au noyau benzimidazolium (Figure 1.18) permet au composé **1.28** de s'auto-assembler en dimère, formant un canal dans la membrane pour le transport des ions chlorures.<sup>76</sup> De plus, la modification du contre-anion du transporteur

**1.28** permet d'augmenter son efficacité de transport. En effet, suivant la série d'Hofmeister, moins l'anion est hydraté, meilleure est la pénétration de la molécule dans la bicouche lipidique.

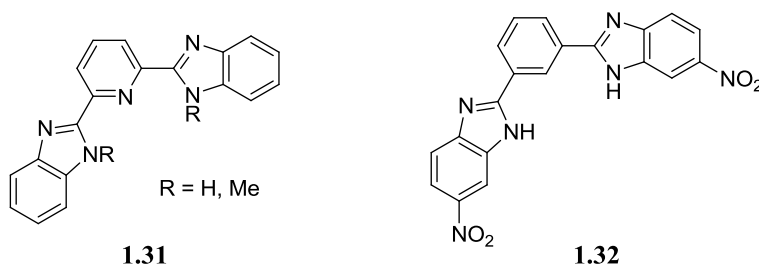


**Figure 1.18** : Exemples de transporteurs d'anions comportant le motif benzimidazolium développés dans notre groupe ainsi que l'auto-assemblage de **1.28** à l'état solide.<sup>76</sup>

Afin d'améliorer l'efficacité de cette famille de transporteurs, de nouvelles molécules ont été synthétisées, possédant deux unités benzimidazoliums reliées entre elles par un groupement pyridine ou lutidine (composés **1.29** et **1.30** Figure 1.18). Ces groupements permettent de faire la liaison entre les deux sites cationiques tout en participant à la complexation de l'anion. Comme observé dans le cas du composé **1.30**, l'hydrophilie du contre-anion joue un rôle important. Ainsi, le composé **1.30** portant un anion triflate démontre la meilleure efficacité pour le transport de chlorures à travers les membranes

phospholipidiques.<sup>61</sup> De plus, il s'est avéré que cette molécule possède également une activité antimicrobienne sur des systèmes plus complexes comme les bactéries.

Très récemment, le groupe du professeur Chen synthétisa des molécules similaires pour le transport ionique.<sup>77, 78</sup> Dans ce cas-ci, la liaison des groupements benzimidazoles au cycle pyridine se fait par le carbone C2 situé entre les deux azotes du noyau imidazole. Lors de leur première étude, ils ont prouvé que la présence du proton NH est essentielle pour la complexation avec l'anion assurant son transport à travers les membranes (composé **1.31**). Par la suite, des modifications structurales ont été apportées au transporteur. Le nombre d'unités benzimidazoles, leurs positionnements sur le cycle aromatique ou encore l'influence des substituants ont été investigués, démontrant ainsi que le composé **1.32** possède la meilleure efficacité comme transporteur d'anions.



**Figure 1.19** : Structure des transporteurs de Chen comportant le motif benzimidazole.<sup>77, 78</sup>

Toutes les caractéristiques des benzimidazoles et sels de benzimidazoliums survolées dans cette partie font de ce motif un groupement très polyvalent. Ses dérivés se retrouvent aussi bien dans la synthèse de complexes métalliques, dans la structure d'agents antimicrobiens ou dans celle de nouveaux transporteurs anioniques faisant de ces molécules des outils de choix pour la recherche fondamentale et industrielle.



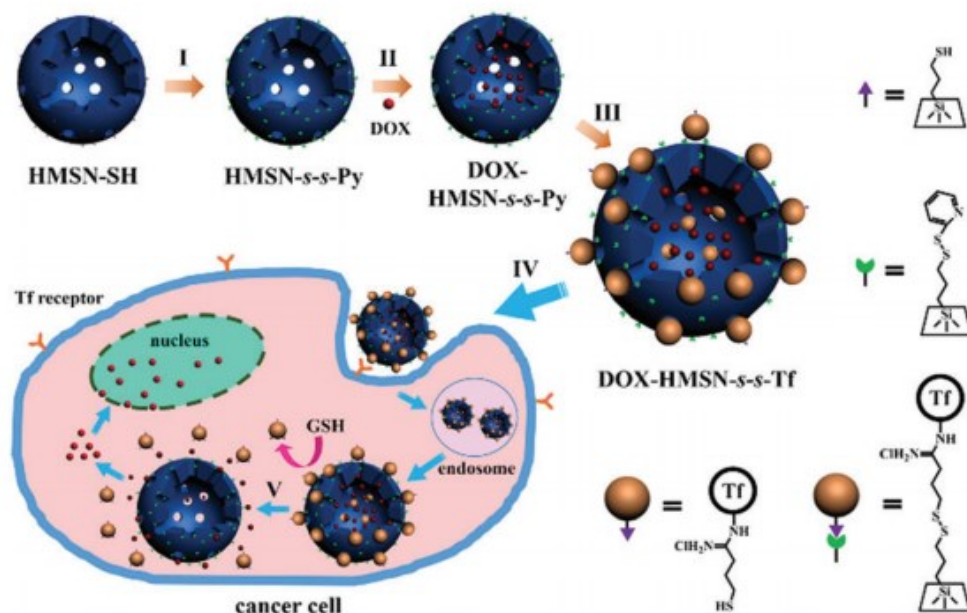
## 1.3 Transport de larges molécules et dérivés d'acides choliques

Le transport de larges molécules polaires à travers les membranes cellulaires est toujours un défi d'actualité. Comme mentionné précédemment, la membrane cellulaire joue le rôle de barrière naturelle limitant la diffusion des espèces trop hydrophiles. Cependant, de nombreuses thérapies nécessitent l'acheminement du médicament ou du composé actif directement dans la cellule. Ainsi depuis quelques années, de nombreux systèmes de transport pour différents médicaments ont vu le jour.

### 1.3.1 Exemples de transport de larges molécules

Les nanoparticules de silice sont de très bons exemples de transporteurs de principes actifs. Ces composés de taille nanométrique possèdent une luminescence propre sous rayonnement infrarouge, permettant de les détecter et de les localiser par imagerie médicale. Elles sont également biocompatibles et se dégradent progressivement dans le corps, raisons pour lesquelles de nombreux chercheurs se sont penchés sur leurs utilisations ces dernières années.<sup>79</sup>

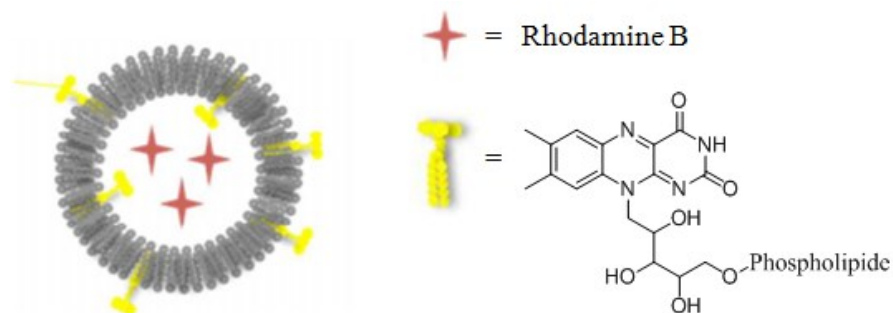
Récemment, Yang *et al.* ont développé une nanoparticule de silice pour la libération ciblée de médicaments dans des cellules cancéreuses.<sup>80</sup> Ces nanoparticules poreuses ont dans un premier temps été chargées du médicament à transporter, la doxorubicine (DOX), puis un large groupement bloquant a été ajouté à la nanoparticule afin d'empêcher le relargage du principe actif (Figure 1.20). Ce groupement bloquant est composé d'une protéine, la transferrine (Tf), qui permettra de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses connues pour sur-exprimer le récepteur Tf correspondant. Ainsi, après reconnaissance et endocytose de la nanoparticule par la cellule, celle-ci se retrouvera dans le milieu intracellulaire. La glutathione (GSH) qui est un tripeptide cytoplasmique pourra alors venir sélectivement cliver le pont disulfure liant le groupement bloquant à la nanoparticule, libérant ainsi le médicament directement dans la tumeur<sup>80</sup> (Figure 1.20).



**Figure 1.20** : Application des nanoparticules de silice pour le transport de principes actifs.<sup>80</sup> (Reprinted with permission from, Y. Tian, R. Guo, Y. Jiao, Y. Sun, S. Shen, Y. Wang, D. Lu, X. Jiang and W. Yang, *Nanoscale Horiz.*, **2016**, *1*, 480. Copyright 2016 Royal Society of Chemistry).

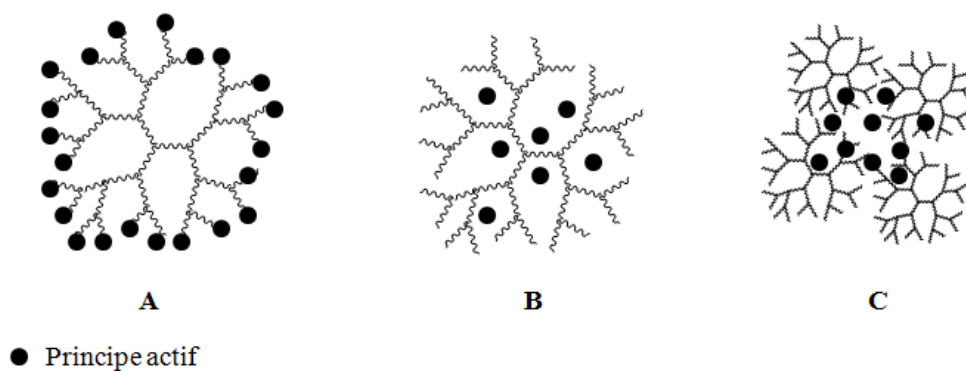
D'autres groupes se sont basés sur l'utilisation des liposomes dans le même but. Les liposomes sont formés d'une bicouche de phospholipides dont les têtes polaires sont orientées vers le milieu aqueux et les chaînes alkyles vers l'intérieur de la structure, créant une cavité hydrophile délimitée par une paroi hydrophobe. Plusieurs travaux ont déjà été rapportés dans la littérature pour la libération de médicaments comme l'amphotéricine B ou le paclitaxel *via* l'utilisation de liposomes.<sup>81</sup> Parmi les derniers exemples on peut citer les travaux du professeur Bestel.<sup>82</sup> Celui-ci utilisa un dérivé hydrophobe de la riboflavine (ou vitamine B12) incorporé à la surface d'un liposome pour cibler spécifiquement les cellules malades. (Figure 1.21). En effet, la protéine RCP (« *Riboflavin Carrier Protein* ») est une protéine membranaire surexprimée dans cellules cancéreuses. Ainsi, une fois le liposome chargé de médicament, celui-ci pourra cibler spécifiquement les cellules cancéreuses exprimant la RCP. Afin de valider son modèle, la rhodamine fut incorporée dans ces liposomes comme preuve de concept afin d'observer sa libération dans les cellules cibles.<sup>83</sup>

Des polymères ou hydrogels sensibles aux stimuli externes comme la variation du pH ou la température ont également été rapportés. En 2011, Yang *et al.* étudièrent l'utilisation d'un hydrogel à base de chitosane sensible au pH pour la libération simultanée de doxorubicine et de paclitaxel *in vivo*.<sup>84</sup>



**Figure 1.21** : Liposome développé par Bestel pour le transport de médicaments.<sup>83</sup>

L'utilisation de dérivés dendritiques a également fait son apparition. Cette architecture hyperbranchée est construite couche après couche à partir d'un cœur central ce qui permet de contrôler exactement sa taille, souvent de l'ordre du nanomètre. Plusieurs composés insolubles en milieu physiologique peuvent alors être incorporés au dendrimère afin de permettre leur vascularisation et leur acheminement jusqu'à la tumeur.<sup>85</sup> Il existe plusieurs types d'interactions entre le dendrimère et le médicament. Comme représenté dans la Figure 1.22, l'agent actif peut être lié de manière covalente au dendrimère, faisant office de fonction terminale de l'architecture (A), il peut interagir de façon supramoléculaire avec le cœur du dendrimère (B) ou finalement être piégé au milieu d'une association de dendrimères (C).



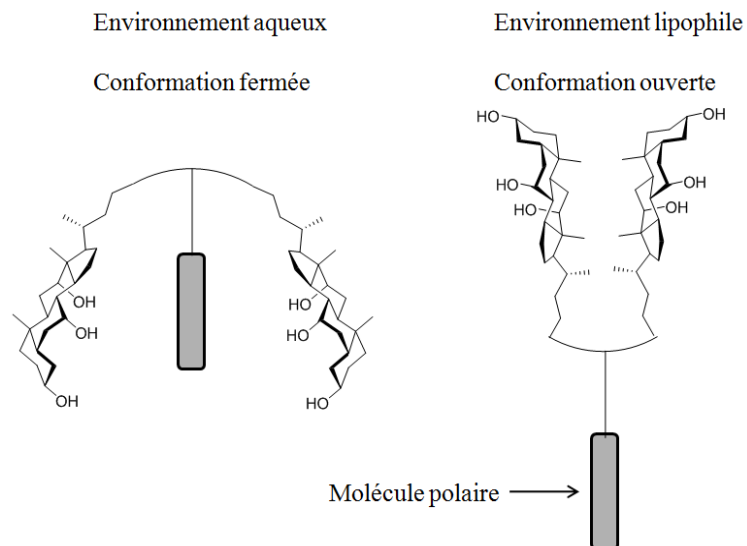
**Figure 1.22** : Exemples d'architectures dendritiques utilisant différents types d'interactions pour le transport de médicaments.<sup>85</sup>

Les exemples de transport de larges molécules polaires rapportés dans la littérature sont nombreux et variés. Parmi ceux-ci, un autre exemple, le parapluie moléculaire a démontré sa capacité à transporter de multiples composés.

## 1.3.2 Les parapluies moléculaires

### 1.3.2.1 Principes et structure

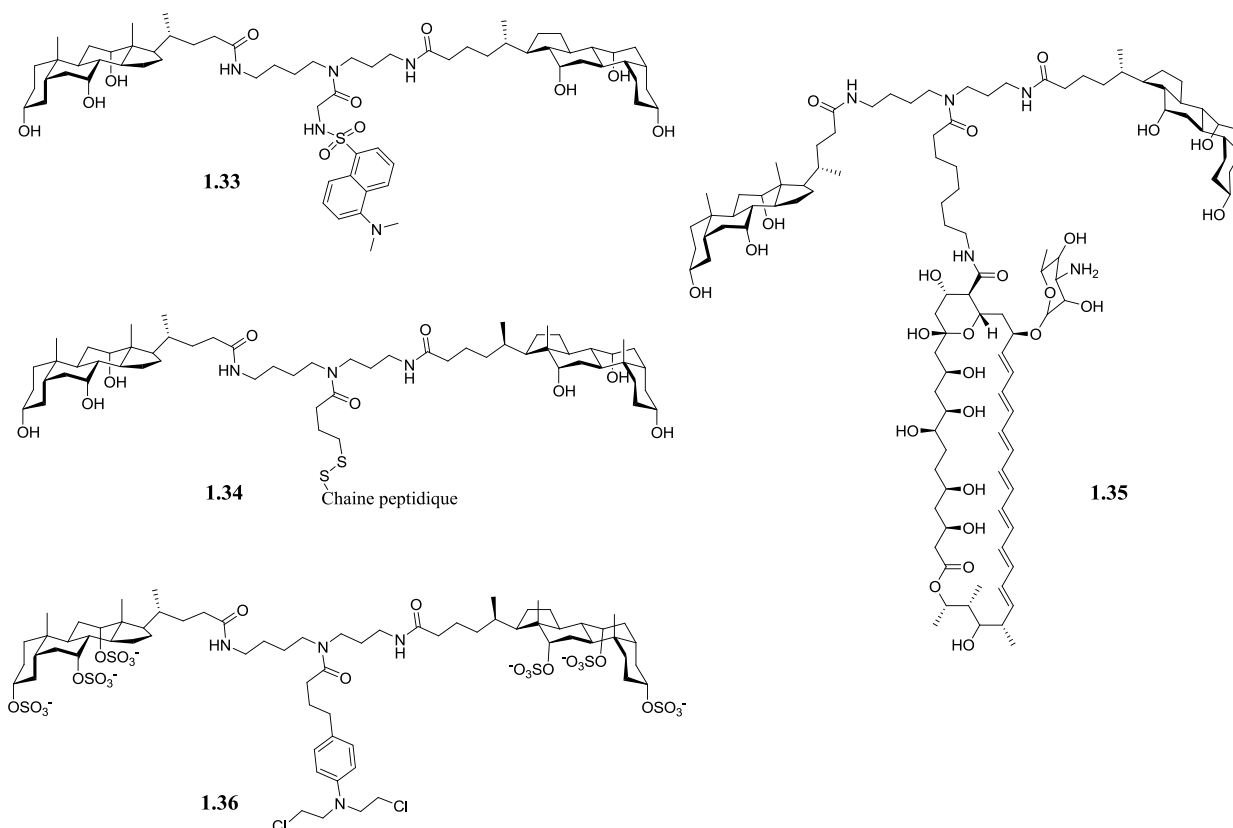
Les parapluies moléculaires ont été développés dans les années 90 par le groupe du professeur Regen pour le transport de larges molécules polaires.<sup>86, 87</sup> Leur structure est formée d'au minimum deux acides choliques reliés entre eux par un bras flexible auquel est fixé l'agent à transporter. Le large squelette de ces acides biliaires est constitué d'une face hydrophile et d'une face hydrophobe, ainsi, dépendamment du solvant dans lequel se trouve la molécule, celle-ci pourra changer de conformation. Dans un solvant polaire, sa partie hydrophile sera exposée à l'environnement alors que dans un solvant apolaire ce sera sa face hydrophobe qui sera tournée vers le milieu. Ces deux conformations peuvent être appelées conformations ouverte ou fermée (Figure 1.23).



**Figure 1.23** : Conformations ouverte et fermée des parapluies moléculaires dépendamment de l'environnement.

La structure de ces parapluies moléculaires a été optimisée par les auteurs. Des parapluies moléculaires possédant une à douze unités stéroïdes ont été synthétisés. Il s'est avéré qu'au minimum deux acides biliaires sont nécessaires pour former une cavité suffisamment grande pour camoufler le composé à transporter. Lorsque le nombre d'unité acide cholique augmente, une meilleure solubilité de l'agent est observée, mais la masse moléculaire de la structure obtenue devient trop importante (autour de 1000 Da), ce qui limite grandement sa diffusion à travers les membranes. Différents produits naturels tels que la spermine, la spermidine ou la L-lysine peuvent également servir d'agents de liaison entre les acides choliques et de points d'attachement la molécule cible.<sup>87-90</sup>

Finalement, le type de molécules transportées par ces parapluies moléculaires peut être de nature très variée, allant de molécules polaires ou apolaires (**1.33**),<sup>86</sup> cationiques,<sup>91</sup> en passant par des chaînes peptidiques (**1.34**),<sup>92</sup> un antifongique comme l'amphotéricine B (**1.35**),<sup>93</sup> ou un anticancéreux, le chlorambucil (**1.36**),<sup>86</sup> (Figure 1.24).



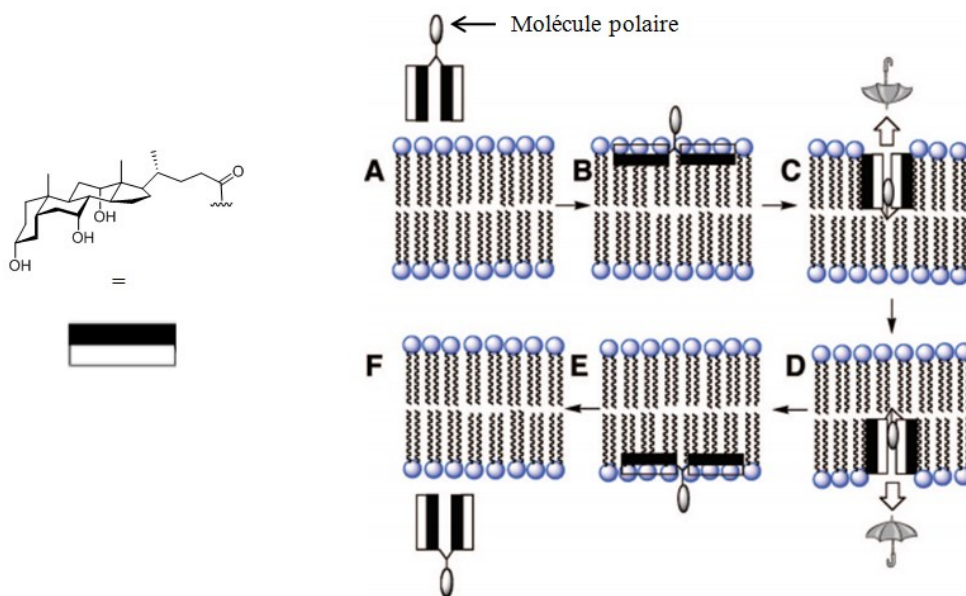
**Figure 1.24** : Exemples de composés transportés par des parapluies moléculaires.

### 1.3.2.2 Mécanismes de transport des parapluies moléculaires

#### 1.3.2.2.1. Pour le transport de grosses molécules

Le mécanisme de transport transmembranaire de ces parapluies moléculaires proposé par Regen *et al.* pour le transport de grosses molécules se fait *via* une diffusion passive à travers les phospholipides.<sup>86</sup> Le parapluie moléculaire approche la membrane dans sa conformation ouverte exposant les parties polaires des acides choliques au milieu hydrophile (Figure 1.25A). L'insertion dans la partie hydrophobe est favorisée par les interactions entre la partie apolaire du parapluie et les chaînes alkyles des phospholipides. Les faces hydrophiles restent alors en contact avec les têtes polaires des lipides (Figure 1.25B). Il s'en suit une adsorption totale de la molécule dans la partie apolaire de la membrane due aux forces

hydrophobes, aux interactions dipôles-dipôles et aux ponts hydrogènes intramoléculaires créés entre l'entité transportée et les groupements hydroxyles des acides choliques (Figure 1.25C). Une translocation de 180° de la molécule s'effectue alors pour permettre son passage dans la deuxième partie de la bicouche lipidique (Figure 1.25D) avant de réaliser les deux premières étapes en sens inverse (Figure 1.25E et F respectivement) afin de permettre la sortie du parapluie moléculaire de l'autre côté de la membrane.



**Figure 1.25** : Mécanisme de transport des parapluies moléculaires à travers la membrane.

Ce mécanisme de transport a été mis en évidence et validé par l'échange de l'agent transporté par un peptide.<sup>94</sup> La glutathione (Glu-Cys-Gly) est un tri-peptide présent en concentration de l'ordre du millimolaire dans le cytoplasme des cellules, et son fort caractère hydrophobe limite sa diffusion passive à travers la membrane. Ainsi en utilisant un dérivé thiolé lié *via* un pont disulfure au parapluie moléculaire, lorsque celui-ci passe la membrane cellulaire et se retrouve en présence de la glutathione, l'échange de l'agent transporté peut s'effectuer. La formation du conjugué parapluie moléculaire-glutathione a été observée par Regen *et al.* appuyant le mécanisme proposé.<sup>86,94</sup>

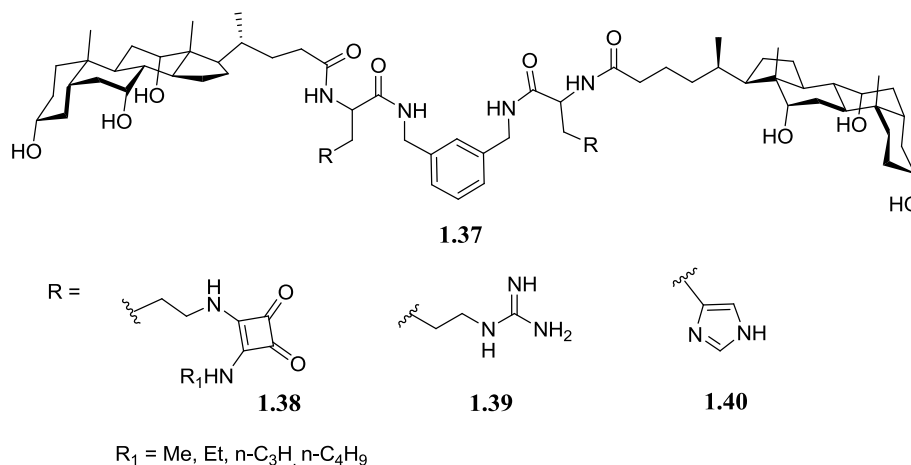
#### 1.3.2.2.2 Pour le transport ionique

Les parapluies moléculaires peuvent également être utilisés pour le transport ionique. En effet, le caractère amphiphile des acides choliques qui assure leur entrée dans la membrane cellulaire fait également de ces stéroïdes de bons motifs pour le transport d'ions. Chen *et al.* sont parmi les premiers depuis 2013 à s'être penchés sur l'utilisation des dérivés d'acide cholique pour le transport exclusif de chlorures à travers la membrane phospholipidique.<sup>95-98</sup>

Ils ont dans un premier temps observé que la présence du lien flexible entre les deux acides choliques n'est plus un avantage et que l'ajout d'un groupement rigide (un aromatique) augmentait le transport anionique (**1.37**).<sup>95</sup> En effet le repliement du parapluie n'est pas nécessaire ici, et la rigidité de la molécule lui permet de couvrir une plus grande partie de la bicouche lipidique assurant le transport ionique *via* une succession de ponts hydrogènes entre les hydroxyles des stéroïdes.

Les groupements latéraux (R, Figure 1.26) de la molécule ont par la suite été modifiés afin d'étudier l'efficacité du transporteur. Chen utilisa des motifs déjà rapportés dans la littérature et connus pour être efficaces pour le transport ionique. Il a alors observé que la présence de groupement squaramides (**1.38**),<sup>63</sup> guanidines (**1.39**),<sup>97</sup> et imidazoles (**1.40**),<sup>98</sup> sur les conjugués d'acides choliques permettait un bon transport d'ions chlorures à travers la membrane, contrairement au parapluie simple. Cela s'explique par la présence du groupement latéral qui fait office de «relais», créant un autre pont hydrogène avec l'anion entre ceux des acides choliques.<sup>77</sup>





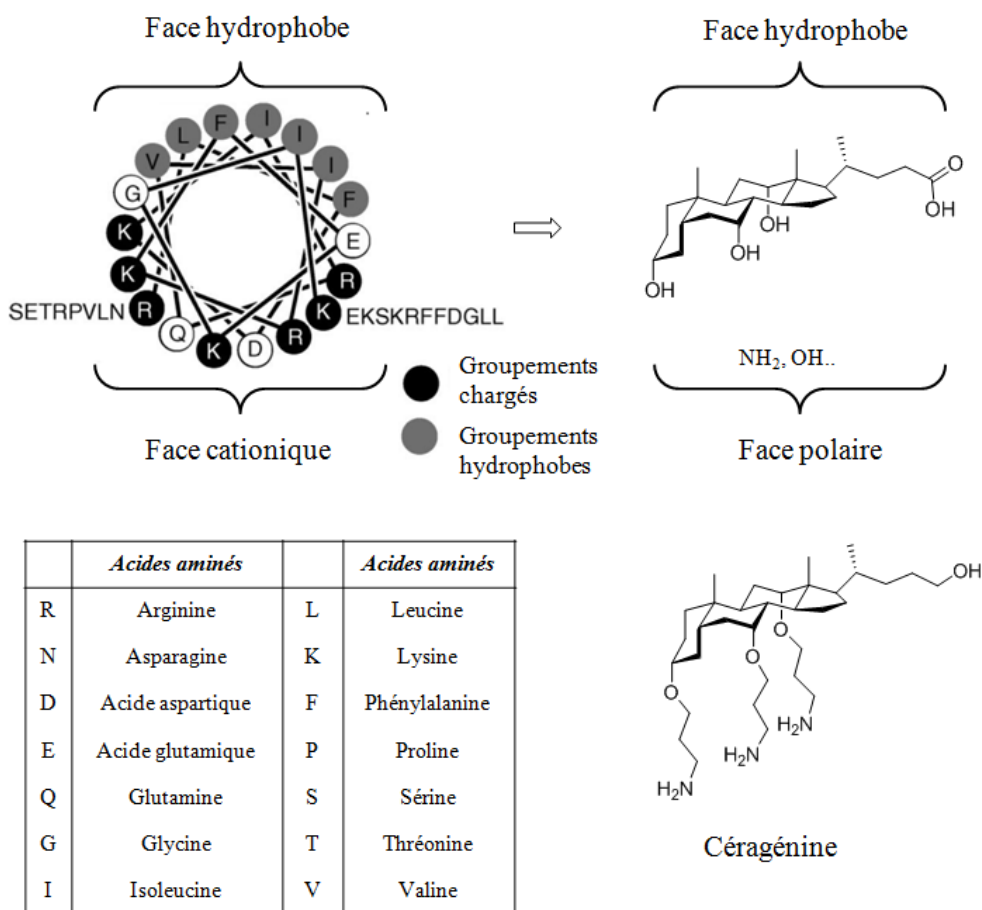
**Figure 1.26** : Exemple des transporteurs mobiles de Chen à base d'acide choliques.<sup>63, 97, 98</sup>

### 1.3.3 Activité biologiques des acides choliques

Parmi la grande collection de peptides possédant une activité antimicrobienne il est possible de tirer une caractéristique structurale commune menant aux propriétés bactéricides. Ces chaînes peptidiques s'agencent toutes en hélice  $\alpha$  exposant les résidus hydrophobes d'un côté de l'assemblage et les groupements cationiques sur la face opposée.<sup>99</sup> Cet assemblage permet au peptide de s'associer à la membrane bactérienne chargée négativement, grâce aux interactions ioniques.<sup>100</sup> Cette observation mena le professeur Savage à exploiter la nature amphiphile de l'acide cholique afin de synthétiser des dérivés céragénines possédant une activité bactéricide<sup>99</sup> (Figure 1.27).

Les tests menés sur des bactéries à Gram-positifs et à Gram-négatifs ont permis d'observer que ces dérivés céragénines sont capables de tuer ces souches bactériennes avec des concentrations de l'ordre du milligramme par litre.<sup>99</sup> De plus, lorsque la céragénine est mise en présence de souches résistantes, celle-ci est capable de stopper leur croissance durant la totalité de l'exposition. Suite à ces résultats concluants, le groupe de Savage étudia plus en détail le mécanisme d'action des conjugués d'acides choliques. Des études de dépolarisation de la membrane ont été menées sur des bactéries à Gram-négatifs.<sup>101</sup> Ces souches possèdent

deux membranes phospholipidiques dont l'une délimite le cytoplasme de la bactérie. Seulement certains des dérivés céragénines sont capables de suffisamment déstabiliser la membrane cytoplasmique, provoquant la perte du fluide interne et induisant la mort cellulaire. Une corrélation entre la capacité d'un composé à déstabiliser la membrane interne et son activité antimicrobienne a donc pu être avancée.<sup>101</sup>



**Figure 1.27** : Similarité structurelle entre un peptide antimicrobien et l'acide cholique exploité par Savage pour concevoir les dérivés céragénines.<sup>99</sup>

Les dérivés d'acides choliques ont montré une versatilité importante. Outre l'utilisation pour le transport anionique ou pour leurs bonnes propriétés antibactériennes, les dérivés d'acides choliques peuvent être utilisés pour le transport de larges molécules.

En effet, le transport de grosses molécules polaires est tout aussi important que le transport ionique. De nombreux «véhicules» de principes actifs ont vu le jour afin de permettre leur acheminement jusqu'à leur cible. Les parapluies moléculaires ont largement été étudiés ces dernières années dans cet objectif. Leur capacité à s'adapter à l'environnement en se repliant sur l'entité à transporter en fait un outil de transport transmembranaire prometteur. Cependant, il faut noter que toutes ces grosses molécules transportées à travers les membranes phospholipides sont liées de manière covalente au parapluie moléculaire. L'approche que nous avons développée et qui sera présentée dans ce mémoire est basée sur l'incorporation d'un parapluie moléculaire dans l'architecture d'un rotaxane. Ainsi, l'entité à transporter, ici un macrocycle biologiquement actif, pourra être une composante supramoléculaire du système rotaxane.

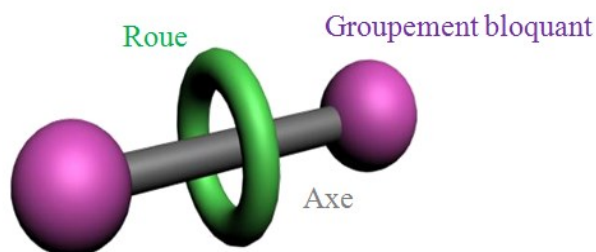
## **1.4 Les rotaxanes**

### **1.4.1 Les molécules enchevêtrées**

Apparus dans les années 1960, les rotaxanes sont des molécules faisant partie de la famille des architectures moléculaires mécaniquement bloquées. Étymologiquement parlant, le terme rotaxane provient du latin « rota » et « axe » que l'on peut littéralement traduire par roue et axe. En effet, les rotaxanes sont des molécules enchevêtrées comportant une roue liée de façon non covalente à un axe, et bloquée sur celui-ci à l'aide de deux groupements bloquants (Figure 1.28).

La synthèse d'un rotaxane se base principalement sur la présence d'un site de reconnaissance. En effet, celui-ci est essentiel afin de permettre un rapprochement et une stabilisation de la roue autour de l'axe avant d'y bloquer mécaniquement cette dernière par l'ajout des groupements bloquants. Cette reconnaissance entre les deux entités se fait par des interactions supramoléculaires qui peuvent être de nature variée, telle que les ponts hydrogènes, les empilements  $\pi$ , les interactions hydrophobes, les interactions métal-ligand, etc...<sup>102</sup>

Généralement rapporté dans la littérature sous la forme [n]-rotaxanes, où n définit le nombre d'unités entrelacées qui forment la structure, le design de ces architectures moléculaires n'est limité que par l'imagination du chercheur. En 2012, Stoddart *et al.* synthétisèrent et caractérisèrent un [20]-rotaxane constitué de 19 roues alignées successivement sur un même axe et stabilisées par des ponts hydrogènes et des interactions  $\pi$ - $\pi$ .<sup>103</sup>

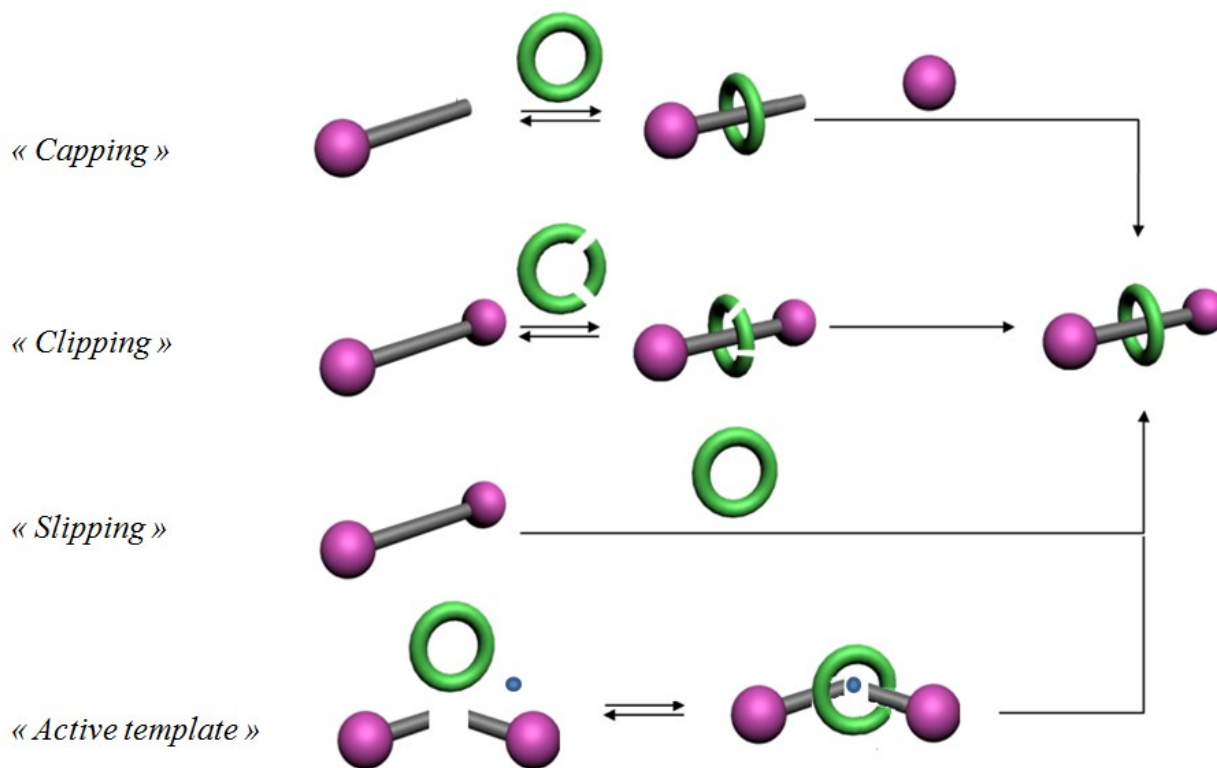


**Figure 1.28** : Représentation schématique d'un [2]-rotaxane.

## 1.4.2 Assemblage de rotaxanes

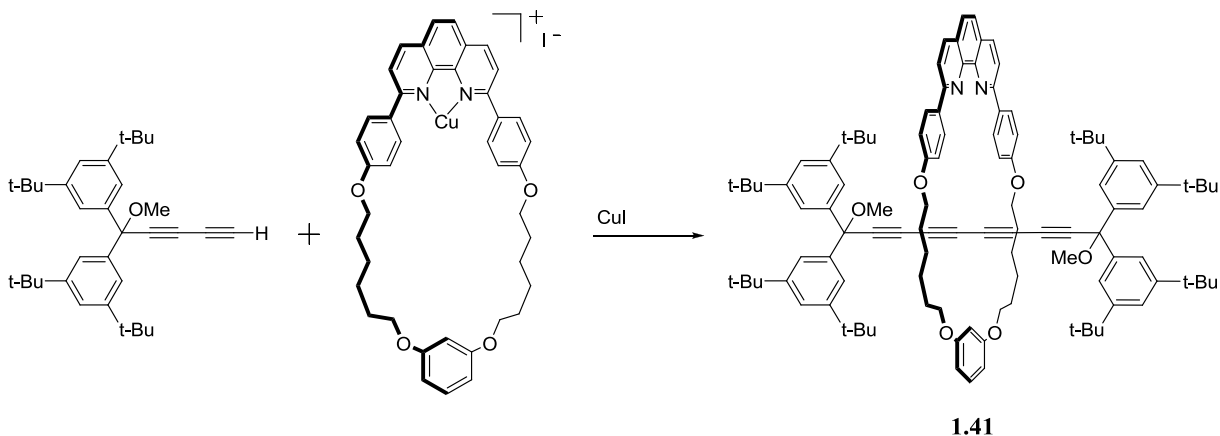
Il existe plusieurs méthodes de synthèse pour réussir à bloquer mécaniquement la roue autour de l'axe et former le rotaxane (Figure 1.29).

La première méthode, le « *capping* », est souvent la plus utilisée dans l'assemblage des rotaxanes. Elle consiste à enfiler la roue sur l'axe déjà muni d'un groupe bloquant puis bloquer celle-ci *via* l'ajout d'un deuxième groupement bloquant. La deuxième méthode utilise l'axe déjà muni de ses groupements bloquants autour duquel on vient directement synthétiser la roue, méthode appelée « *clipping* ». La troisième méthode, le « *slipping* », permet de glisser directement la roue autour de l'axe par chauffage et ne nécessite aucune formation de lien covalent. En refroidissant, la roue est alors cinétiquement piégée autour de son axe.



**Figure 1.29** : Représentation schématique des différentes voies d'assemblage de [2]-rotaxane.

La synthèse par reconnaissance active (ou « *active template* » en anglais) est la plus récente des quatre méthodes et consiste à rapprocher les constituants du rotaxane *via* l'utilisation d'ions ou de métaux servant également à synthétiser la dernière liaison covalente formant la structure enchevêtrée. Tykwinski *et al.* rapportèrent la synthèse d'un [2]-rotaxane possédant un axe cumulène, grâce à la reconnaissance active. L'utilisation d'une roue comportant le motif phénanthroline permet la stabilisation du cuivre qui peut ensuite catalyser l'homo-couplage de l'alcyne *via* un couplage de Glaser, formant le rotaxane désiré **1.41**<sup>104</sup> (Figure 1.30).



**Figure 1.30** : Synthèse du [2]-rotaxane de Tykwinski *et al.* par reconnaissance active.<sup>104</sup>

Ces machines moléculaires peuvent avoir de nombreuses applications. Elles ont souvent été utilisées comme interrupteur moléculaire (« *molecular switch* » en anglais) ou comme « muscle », exploitant le fait que la roue puisse bouger d'un site de reconnaissance à l'autre, le long de l'axe.<sup>105, 106</sup> L'application de stimuli tels que la variation de pH, l'ajout d'espèces ioniques, la photo-isomérisation ou encore le changement de polarité de l'environnement permettent ce mouvement moléculaire.<sup>107</sup> Certains groupes se sont quant à eux intéressés aux applications biologiques des rotaxanes.

### 1.4.3 Applications biologiques des rotaxanes

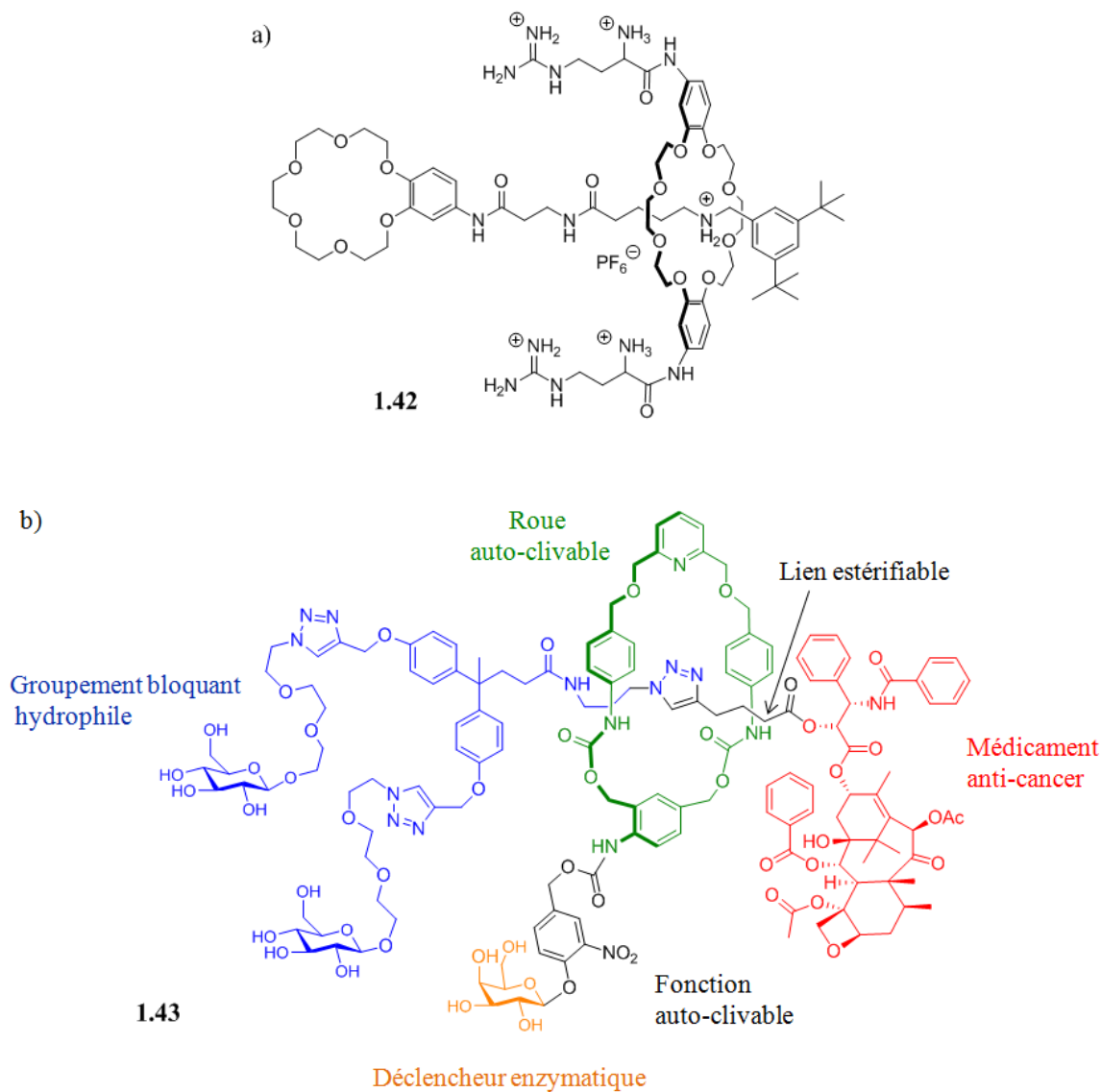
Comme mentionné précédemment dans la partie 1.3.1 (Exemples de transport de larges molécules), l'utilisation de véhicules permettant le relargage de médicaments a largement été rapportée. Cependant, les rotaxanes « autonomes » capables de transporter un agent actif et d'interagir avec des systèmes biologiques restent encore un défi.

Smithrud *et al.* ont synthétisé le rotaxane **1.42** muni d'un groupement éther couronne capable de sélectivement complexer les ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Figure 1.31 a)).<sup>108</sup> La présence de deux groupements arginines sur la roue permet une meilleure pénétration de l'assemblage

supramoléculaire dans les cellules cancéreuses ovariennes. Ainsi, après complexation du rotaxane avec le métal, son insertion dans la cellule augmente la concentration intracellulaire en métaux, menant à la mort cellulaire.

Récemment, Leigh *et al.* ont développé un rotaxane biocompatible capable de libérer spécifiquement un anticancéreux, le paclitaxel.<sup>109</sup> Ce composé est un agent anticancéreux utilisé dans le traitement de plusieurs cancers comme le cancer de l’ovaire, du sein ou des poumons.<sup>110</sup> Cependant, son efficacité est limitée par sa faible solubilité en milieu aqueux et sa forte toxicité, raison pour laquelle la synthèse d’un dérivé soluble dans l’eau et non toxique est un défi d’envergure. Basé sur leurs précédents travaux d’auto-désassemblage *in vitro* de rotaxanes permettant la libération d’un pentapeptide bioactif,<sup>111</sup> Leigh *et al.* ont conçu une nouvelle molécule enchevêtrée (**1.43**)<sup>109</sup> (Figure 1.31 b)). Le médicament est ici lié covalamment à l’axe du rotaxane et fait office de groupement bloquant. La roue présente autour de l’axe permet de camoufler le lien estérifiable menant à la libération du paclitaxel. Ainsi, le relargage de l’agent actif ne peut se faire que par une activation enzymatique provoquant une réaction en cascade. Une fois le rotaxane dans la cellule cancéreuse, la  $\beta$ -galactosidase va sélectivement cliver le galactoside déclencheur (groupement orange sur la Figure 1.31 b)). Ils s’en suivent deux éliminations 1,6 successives permettant l’ouverture de la roue qui se sépare alors de son axe. Le lien ester fixant le médicament à l’axe est maintenant exposé au milieu cellulaire permettant l’approche des estérases qui assurent alors la libération de l’agent actif.

Les tests *in vitro* menés ont permis de démontrer que la molécule enchevêtrée est moins active que le médicament seul dû à sa plus haute hydrophilie. Cependant, le dérivé **1.43** est beaucoup plus sélectif aux cellules cancéreuses qui sur-expriment la  $\beta$ -galactosidase, contrairement au composé actif seul, ce qui compense en grande partie son activité cytotoxique.<sup>109</sup>



**Figure 1.31** : a) Rotaxane développé par Smithrud *et al.* pour le transport de cations<sup>108</sup> et b) structure du rotaxane auto-clivable de Leigh *et al.*<sup>109</sup>

Les rotaxanes sont des molécules enchevêtrées aux multiples usages qui connaissent un essor important ces dernières années. Quel que soit la stratégie employée pour l'assemblage ou le design imaginé, cette architecture a toujours démontré son efficacité, notamment dans le domaine de la chimie pharmaceutique. Cependant, comme dans tous les véhicules d'agents actifs rapportés à ce jour, le principe actif est incorporé à la structure du transporteur nécessitant une dérivation préalable du médicament.



## 1.5 Axes et rotaxanes parapluies

### 1.5.1 Généralités

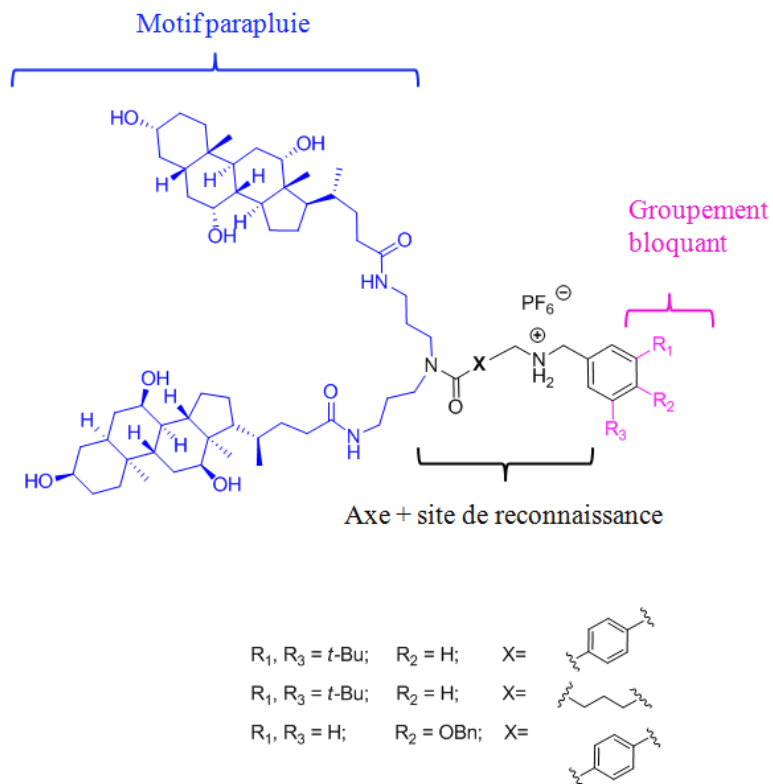
De nombreuses molécules biologiques actives se trouvent être des macrocycles. On peut citer parmi eux la famille des macrotétrolides et plus précisément la famille des nactins, qui sont des composés naturels présentant des activités biologiques.<sup>112</sup> Cependant, leur caractère hydrophile les empêche de traverser la membrane cellulaire.

Le groupe Schmitzer a développé le premier exemple de rotaxane parapluie pour le transport transmembranaire d'anions et de macrocycles biologiquement actifs.<sup>113, 114</sup> Les axes parapluies sont des entités qui regroupent les notions abordées précédemment. Ces molécules sont capables de traverser les membranes cellulaires grâce au caractère amphiphile du motif parapluie, et peuvent transporter soit des anions, soit des macrocycles grâce à la présence des groupements de reconnaissance sur l'axe de l'architecture.

La plus grande force de ce concept est de pouvoir intégrer le principe actif en tant que roue de l'assemblage supramoléculaire sans avoir besoin de dérivation préalable.

### 1.5.2 Concept et design des axes parapluies

La structure d'un axe parapluie est composée de trois parties essentielles : le motif parapluie à l'une des extrémités de l'axe, l'axe possédant un site de reconnaissance et le second groupement bloquant. Le site de reconnaissance, ici un ammonium dialcyle secondaire, permet la complexation avec des ions ou des macrocycles *via* la formation de ponts hydrogènes. De plus, des modifications structurales peuvent être apportées à la molécule, comme la flexibilité de l'axe et la taille du second groupement bloquant (Figure 1.32).



**Figure 1.32** : Structure des axes parapluies développés dans le groupe du Pr. Schmitzer.<sup>115</sup>

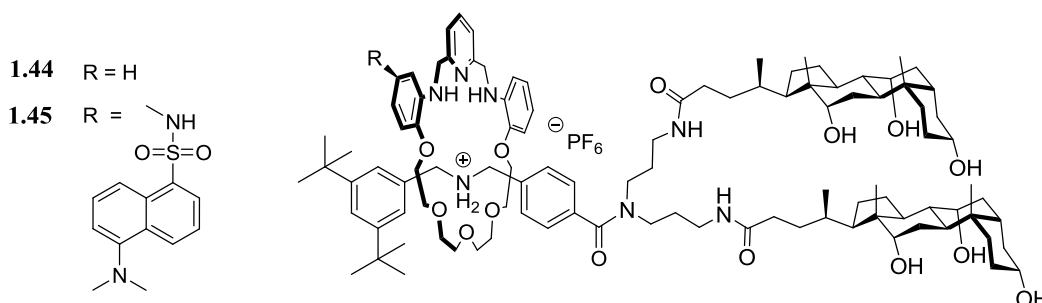
Dans un premier temps, le macrocycle peut être complexé avec l'ammonium secondaire de l'axe parapluie, puis bloqué autour de celui-ci par l'ajout du second groupement bloquant. Ainsi, dans un environnement polaire, le motif parapluie viendra se replier autour de la roue (conformation fermée) camouflant son caractère hydrophile. Dans ces conditions, le rotaxane plus hydrophobe en conformation fermée pourra traverser la membrane phospholipidique assurant le transport de la roue dans la cellule.

### 1.5.3 Mise en évidence du repliement du parapluie sur l'axe

La viabilité du mécanisme de transport par repliement du parapluie sur la roue a été mise en évidence grâce à l'utilisation d'une roue fluorescente. Le groupement dansyle est un fluorophore qui possède une longueur d'onde maximale de fluorescence dépendante de la

polarité du solvant. Ce groupement a donc été attaché à la roue du rotaxane parapluie **1.45** afin de suivre le repliement du parapluie (Figure 1.33).

Dans cet exemple-ci, la roue dansyle du composé **1.45** montre un caractère plus hydrophobe. Ainsi, un solvant à caractère plus apolaire (mélange  $\text{CCl}_4/\text{MeOH}$ ) permettra au parapluie de rester ouvert, exposant le macrocycle à l'environnement. Cependant, lorsque la polarité du solvant est augmentée (ajout d' $\text{H}_2\text{O}$ ), le parapluie vient se replier sur la roue, exposant les faces hydrophobes des acides choliques vers le macrocycle. Cela se traduit par un effet hypsochromique de la longueur d'onde de fluorescence du groupement dansyle, observé par fluorescence.<sup>114</sup> Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence et de confirmer le repliement du motif parapluie autour de la roue dépendamment de la polarité du solvant dans lequel se trouve la molécule.

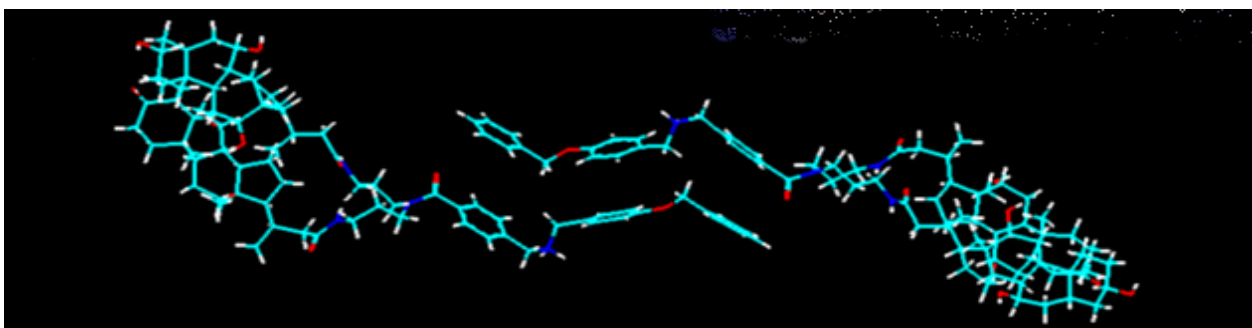
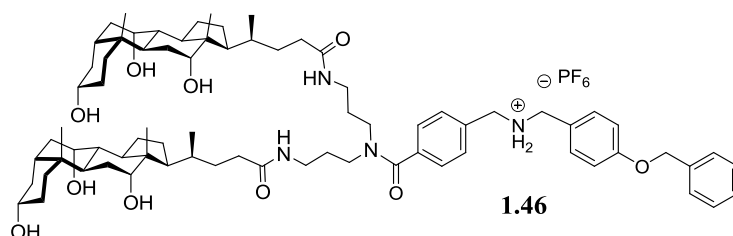


**Figure 1.33** : Structure du rotaxane parapluie possédant une roue fluorescente.

#### 1.5.4 Transport transmembranaire et relargage de la roue

Des études de transport dans les liposomes ont par la suite été menées afin de confirmer l'efficacité des axes et rotaxanes parapluies comme transporteur transmembranaire. Dans un premier temps, ces tests de transport ont permis de démontrer que l'axe parapluie **1.46** était capable d'assurer le transport des ions chlorures à travers la membrane.<sup>113</sup> Grâce à la réalisation d'une modélisation moléculaire dans une membrane phospholipidique, il a été observé que le composé **1.46** s'auto-assemble préférentiellement en une structure dimérique

(Figure 1.34). Les ions chlorures traverseraient donc la membrane *via* une succession d'interactions  $\pi$ -anions (avec les groupements aromatiques de l'axe) et de ponts hydrogènes (avec le site ammonium et les acides choliques). Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Chen *et al.* rapportés précédemment dans la partie 1.3.2.2.2, qui propose le même mécanisme de transport ionique pour les dérivés d'acides choliques.



**Figure 1.34** : Structure de l'axe parapluie **1.46** et sa modélisation moléculaire réalisée dans le vide par un calcul PM6/SCF-MO dans des conditions périodiques afin de démontrer l'assemblage dimérique de l'axe parapluie dans une membrane lipidique.<sup>113</sup>

Par la suite, les propriétés de transport des rotaxanes parapluies **1.44** et **1.45** ont été étudiées et devraient être différentes de celle de l'axe **1.46**. En effet, le site ammonium est maintenant engagé dans la formation de ponts hydrogènes avec la roue ce qui limite sa disponibilité pour former des interactions ioniques. De plus, la présence du macrocycle limite également l'empilement  $\pi$  entre les monomères. Cependant, il a été démontré que même en présence d'une roue qui « bloque » le site de reconnaissance ammonium, le rotaxane parapluie garde toujours sa capacité à transporter les anions.<sup>114</sup>

L'avantage du concept du rotaxane parapluie est de transporter un macrocycle actif à travers les membranes sans dérivation préalable, mais une fois dans la cellule, la molécule doit

être capable de relâcher le médicament. Ayant démontré que l'assemblage supramoléculaire peut traverser les membranes phospholipidiques, nous avons proposé l'utilisation d'un clivage enzymatique pour libérer la roue. L' $\alpha$ -chymotrypsine est une enzyme du pancréas capable de cliver les liens amides par une réaction d'hydrolyse.<sup>116</sup> Ces liens peptidiques sont présents en nombre sur l'axe parapluie et sont tous de potentiels sites de reconnaissance de l'enzyme. Ainsi, après digestion de l'axe parapluie par l'enzyme, le macrocycle a pu être libéré dans le milieu intracellulaire et observé par LC-MS.<sup>114</sup>

Les rotaxanes parapluies développés par notre groupe sous la direction du professeur Schmitzer sont des entités capables de facilement traverser la membrane phospholipidique et présentent la particularité de transporter soit des anions soit des macrocycles. Le concept de repliement du motif parapluie sur la roue du rotaxane afin de permettre son passage dans la membrane lipidique a été observé par fluorescence et confirmé grâce aux tests de transport dans les liposomes.

Ces résultats ont confirmé la viabilité du mécanisme proposé pour le transport et le relargage de médicaments cycliques dans le milieu intracellulaire *via* l'utilisation de rotaxanes parapluies.

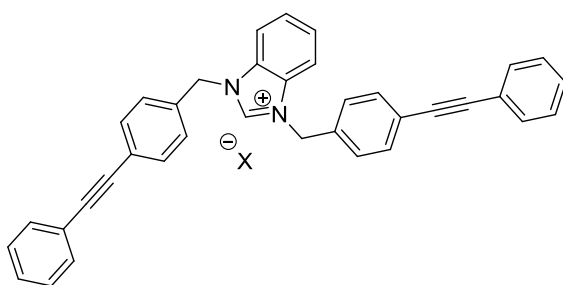
## **1.6 Descriptions de mes projets de recherche**

Basés sur les concepts abordés jusqu'ici, les travaux présentés dans ce mémoire se divisent en deux grandes parties. Inspiré des travaux réalisés dans notre groupe sur les sels de benzimidazolium pour le transport ionique, le premier objectif de cette thèse était d'étudier les propriétés anionophores des dérivés 2,4,7-triphénylbenzimidazoles et de leurs complexes métalliques dans des matrices variées telles que les liposomes ou les bactéries. Le second objectif de cette thèse était de continuer les travaux réalisés dans notre groupe par Christine Chhun sur le design d'axe parapluie possédant des propriétés de transport anionique et de transport de macrocycles biologiquement actifs à travers les membranes cellulaires.

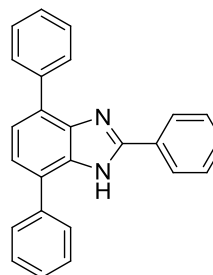
## 1.6.1 Les dérivés 2,4,7-triphénylbenzimidazoles

### 1.6.1.1 Étude des propriétés ionophores du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour le transport transmembranaire d'anions

Au commencement des travaux présentés ici, l'unique exemple d'utilisation des dérivés des sels de benzimidazolium pour le transport ionique avait été rapporté uniquement par notre groupe.<sup>76</sup> Suite aux résultats obtenus, l'étude d'un dérivé benzimidazolium à caractère fortement aromatique et dont la flexibilité était moindre semblait un bon candidat pour le transport anionique (Figure 1.35). Le sel de 2,4,7-triphénylbenzimidazolium a donc été retenu et étudié pour le transport d'ions chlorures. Un des premiers résultats observés fut la déprotonation du sel de chlore en milieu aqueux dû au faible  $pK_a$  de la molécule. Grâce à une analyse de diffraction des rayons X et une modélisation moléculaire dans une bicouche lipidique, il a été observé que ce composé s'auto-assemblait en un canal plein. Les tests de transport ionique avec le 2,4,7-triphénylbenzimidazole ont permis de démontrer la capacité de cette molécule à transporter les ions à travers les membranes phospholipidique dans sa forme déprotonnée et avec une efficacité comparable à nos précédents travaux. Le transport des ions à travers la membrane s'effectue à l'extérieur de la structure, comme le long d'une vis *via* une succession d'interactions anion- $\pi$ .



Sel de benzimidazolium



2,4,7-triphénylbenzimidazole

**Figure 1.35** : Structure du premier transporteur possédant un noyau benzimidazolium étudié dans notre groupe et du 2,4,7-triphénylbenzimidazole utilisé dans ces travaux.

### **1.6.1.2 Utilisation d'analogues du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour la formation d'assemblages métalliques : études de leurs propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques**

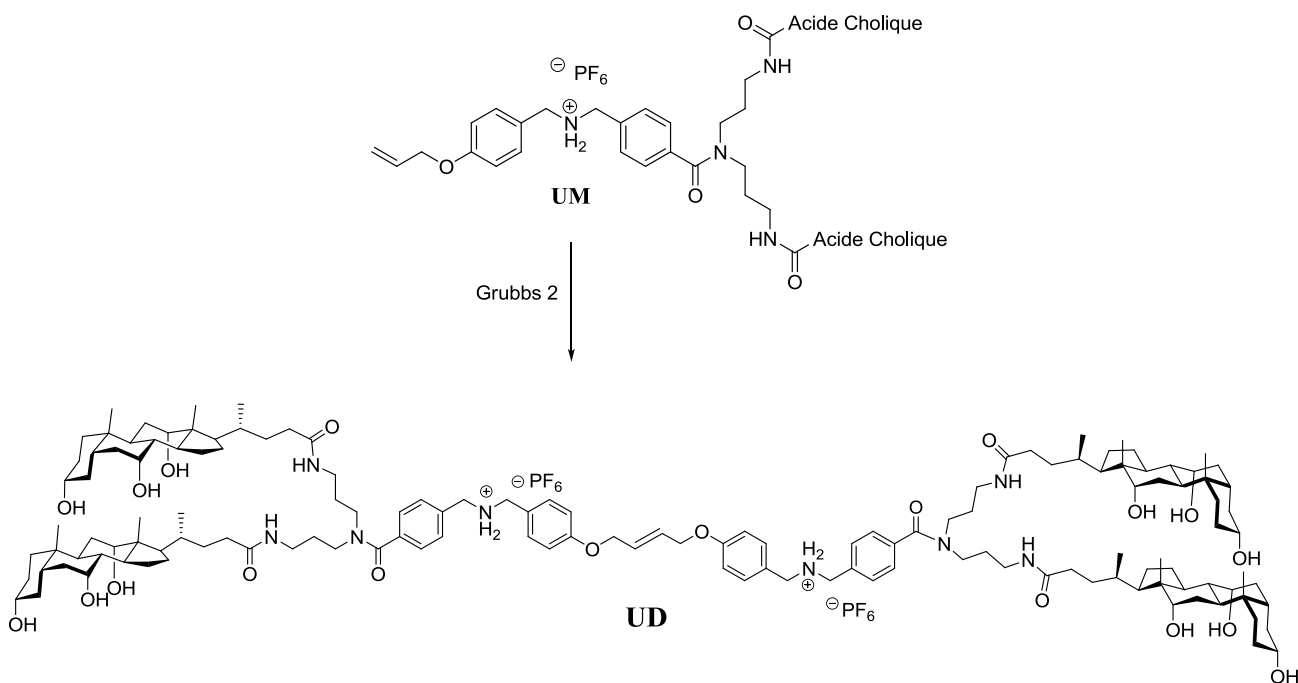
Dans le but d'améliorer l'efficacité du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour le transport anionique, des analogues comportant des sites de coordination, tels un groupement pyridine ou acide carboxylique, ont été synthétisés. L'addition de ces sites de complexation a pour objectif de permettre le contrôle de l'auto-association des molécules *via* la formation d'un complexe métallique. La capacité de ces nouveaux dérivés à former des complexes métalliques a d'abord été observée par UV-vis et fluorescence. Par la suite, des tests de transport dans les liposomes ont permis de montrer que ces transporteurs synthétiques organométalliques (MOST en anglais) forment de larges pores à travers la membrane assurant un meilleur transport d'ions chlorures, que les ligands correspondants seuls. Par la suite, l'étude de ces complexes a été menée dans des membranes plus complexes, comme celles des bactéries à Gram-positifs. Dans notre étude, la combinaison de ces MOST avec la tétracycline permet de réduire la sensibilité d'une bactérie résistante à la tétracycline de 60 fois.

## **1.6.2 Axe et dimère parapluie**

### **1.6.2.1 Axe et dimère parapluie : études de leurs propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques**

L'utilisation des rotaxanes parapluies pour le transport d'ions et macrocycles ayant été démontrée, la modification de l'axe a été réalisée afin d'y envisager la complexation d'un macrocycle biologiquement actif par méthode de « *capping* ». Basé sur l'observation qu'un assemblage dimérique se formait dans la membrane (Chapitre 1.5.4), le groupement terminal de l'axe a été modifié afin de réaliser son homo-dimérisation. Une oléfine terminale a été rajoutée (**UM** « *Umbrella Monomer* » en anglais) pour permettre un couplage par réaction de métathèse (Figure 1.36). Avant de complexer des macrocycles autour de l'axe, le dimère parapluie **UD** (« *Umbrella Dimer* » en anglais) a d'abord été synthétisé et caractérisé, puis des

tests de transport d'ions chlorures ont été menés afin de valider l'insertion de cette large molécule dans la membrane phospholipidique. Aucune différence dans l'efficacité du transport de chlorures n'a été observée entre le monomère et son dimère parapluie, confirmant ainsi l'hypothèse de formation d'un assemblage dimérique comme espèce active dans le processus de transport transmembranaire. Cependant, une différence de sélectivité anionique a été observée pour les ions bicarbonates qui peuvent être transportés uniquement par le dimère parapluie. Finalement, des premiers tests biologiques ont été effectués avec ces deux composés dans des bactéries à Gram-positifs et à Gram-négatifs démontrant la meilleure efficacité du monomère parapluie à inhiber la croissance bactérienne.

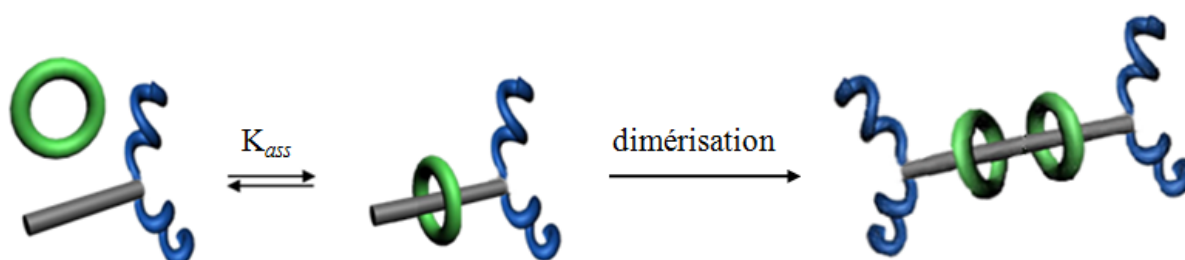


**Figure 1.36 :** Dimérisation de l'axe parapluie **UM**.



### 1.6.2.2 Synthèse de rotaxanes parapluie possédant une roue biologiquement active

Le dimère parapluie remplissait donc tous les critères pour être un bon transporteur de composés macrocycliques. La présence de deux sites ammoniums secondaires sur l'axe du dimère devrait permettre la complexation de deux macrocycles simultanément, formant un [3]-rotaxane (Figure 1.37). Ainsi les premières études de complexation du macrocycle autour de l'axe **UM** suivit de sa dimérisation ont été envisagées. Dans un premier temps, un titrage RMN du monomère parapluie **UM** et de nonactine, un macrocycle biologiquement actif, a été réalisé afin de confirmer la complexation supramoléculaire entre l'axe et sa roue. Par la suite, les tests préliminaires de formation du [3]-rotaxane ont été effectués avec le dibenzo24C8 comme modèle afin de trouver les conditions réactionnelles idéales. Cet éther couronne est connu dans la littérature pour complexer fortement ce type d'ammonium secondaire. Au vu des résultats infructueux, la méthode de « *clipping* » de la roue directement sur le dimère a été abordée afin d'observer la formation du [3]-rotaxane et de valider notre modèle. Malheureusement les conditions des réactions, la solubilité des composants, ainsi que l'encombrement stérique apporté par les deux motifs parapluies n'ont pas permis la formation de la molécule enchevêtrée. Des suggestions et des perspectives seront présentées à la fin de ce mémoire afin d'envisager la suite de ce projet pour aboutir à l'assemblage du [3]-rotaxane.



**Figure 1.37** : Formation du [3]-rotaxane parapluie par « *capping* » grâce à la dimérisation.

## 1.7 Bibliographie

1. N. A. Campbell and J. B. Reece, *Biologie*, **2007**, 1334.
2. D. W. Ball, J. W. Hill and R. J. Scott, Introduction to Chemistry general organic and biological. En ligne " <http://2012books.lardbucket.org/> ". Consulté le 9 aout 2016, 2011.
3. J. T. Davis, O. Okunola and R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3843.
4. P. R. Brotherhood and A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3633.
5. J. T. Littleton and B. Ganetzky, *Neuron*, **2000**, 26, 35.
6. A. Olschewski, Y. Li, B. Tang, J. Hanze, B. Eul, R. M. Bohle, J. Wilhelm, R. E. Morty, M. E. Brau, E. K. Weir, G. Kwapiszewska, W. Klepetko, W. Seeger and H. Olschewski, *Circ. Res.*, **2006**, 98, 1072.
7. V. Vasiliou, K. Vasiliou and D. W. Nebert, *Hum. Genomics*, **2008**, 3, 281.
8. S. Freeman, *Biological Science, 2nd Edition*, Hardcover, 2004.
9. M. M. Bi, S. Hong, H. Y. Zhou, H. W. Wang, L. N. Wang and Y. J. Zheng, *Int. J. Mol. Sci.*, **2014**, 15, 218.
10. R. Planells-Cases and T. J. Jentsch, *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, 1792, 173.
11. T. J. Jentsch, T. Maritzen and A. A. Zdebik, *J. Clin. Invest.*, **2005**, 115, 2039.
12. P. Maisonneuve, B. C. Marshall, E. A. Knapp and A. B. Lowenfels, *J. Natl Cancer Inst.* **2013**, 105, 122.
13. R. C. Boucher, *Eur. Respir. J.*, **2004**, 23, 146.
14. C. J. Haynes and P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 8203.
15. J. S. Lee, Y. S. Kim, S. Park, J. Kim, S. J. Kang, M. H. Lee, S. Ryu, J. M. Choi, T. K. Oh and J. H. Yoon, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2011**, 77, 4967.
16. T. Sato, H. Konno, Y. Tanaka, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman and S. Ohkuma, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 21455.
17. J. L. Seganish and J. T. Davis, *Chem. Comm.*, **2005**, 5781.
18. S. Rastogi, E. Marchal, I. Uddin, B. Groves, J. Colpitts, S. A. McFarland, J. T. Davis and A. Thompson, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 3834.

19. E. Marchal, S. Rastogi, A. Thompson and J. T. Davis, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 7515.
20. P. A. Gale, R. Perez-Tomas and R. Quesada, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 2801.
21. S. J. Edwards, I. Marques, C. M. Dias, R. A. Tromans, N. R. Lees, V. Felix, H. Valkenier and A. P. Davis, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 2004.
22. M. J. Spooner and P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 4883.
23. S. Matile, A. Vargas Jentzsch, J. Montenegro and A. Fin, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 2453.
24. H. Li, H. Valkenier, L. W. Judd, P. R. Brotherhood, S. Hussain, J. A. Cooper, O. Jurček, H. A. Sparkes, D. N. Sheppard and A. P. Davis, *Nat. Chem.*, **2015**, *8*, 24.
25. M. Olivari, R. Montis, L. E. Karagiannidis, P. N. Horton, L. K. Mapp, S. J. Coles, M. E. Light, P. A. Gale and C. Caltagirone, *Dalton. Trans.*, **2015**, *44*, 2138.
26. C. J. E. Haynes, N. Busschaert, I. L. Kirby, J. Herniman, M. E. Light, N. J. Wells, I. Marques, V. Félix and P. A. Gale, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 62.
27. N. J. Andrews, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell Jr and P. A. Gale, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, 256.
28. W. Van Rossom, D. J. Asby, A. Tavassoli and P. A. Gale, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 2645.
29. N. Busschaert, I. L. Kirby, S. Young, S. J. Coles, P. N. Horton, M. E. Light and P. A. Gale, *Angew. Chem.*, **2012**, *51*, 4426.
30. N. Busschaert, R. B. Elmes, D. D. Czech, X. Wu, I. L. Kirby, E. M. Peck, K. D. Hendzel, S. K. Shaw, B. Chan, B. D. Smith, K. A. Jolliffe and P. A. Gale, *Chem Sci*, **2014**, *5*, 3617.
31. M. Wenzel, M. E. Light, A. P. Davis and P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 7641.
32. N. Madhavan, E. C. Robert and M. S. Gin, *Angew. Chem.*, **2005**, *44*, 7584.
33. N. Madhavan and M. S. Gin, *Chem. Biochem.*, **2007**, *8*, 1834.
34. N. Maulucci, F. De Riccardis, C. B. Botta, A. Casapullo, E. Cressina, M. Fregonese, P. Tecilla and I. Izzo, *Chem. Commun.*, **2005**, 1354.
35. G. A. Cook, R. Pajewski, M. Aburi, P. E. Smith, O. Prakash, J. M. Tomich and G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 1633.

36. M. Oblatt-Montal, G. L. Reddy, T. Iwamoto, J. M. Tomich and M. Montal, *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*, **1994**, *91*, 1495.
37. E. K. Elliott, M. M. Daschbach and G. W. Gokel, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 5871.
38. L. You and G. W. Gokel, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 5861.
39. G. A. Cook, O. Prakash, K. Zhang, L. P. Shank, W. A. Takeguchi, A. Robbins, Y.-X. Gong, T. Iwamoto, B. D. Schultz and J. M. Tomich, *Biophys. J.*, **2004**, *86*, 1424.
40. U. Bukovnik, J. Gao, G. A. Cook, L. P. Shank, M. B. Seabra, B. D. Schultz, T. Iwamoto, J. Chen and J. M. Tomich, *Bioch. Biophys. Acta*, **2012**, *1818*, 1039.
41. P. L. Boudreault and N. Voyer, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1459.
42. J. D. Savoie, F. Otis, J. Burck, A. S. Ulrich and N. Voyer, *Biopolymers*, **2015**, *104*, 427.
43. V. Gorteau, G. Bollot, J. Mareda and S. Matile, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 3000.
44. A. L. Sisson, M. R. Shah, S. Bhosale and S. Matile, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 1269.
45. V. Gorteau, M. D. Julliard and S. Matile, *J. Membr. Sci.*, **2008**, *321*, 37.
46. P. Talukdar, G. Bollot, J. Mareda, N. Sakai and S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 6528.
47. T. Saha, S. Dasari, D. Tewari, A. Prathap, K. M. Sureshan, A. K. Bera, A. Mukherjee and P. Talukdar, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 14128.
48. E. Iengo, P. Cavigli, D. Milano and P. Tecilla, *Inorg. Chim. Acta*, **2014**, *417*, 59.
49. U. Devi, J. R. Brown, A. Almond and S. J. Webb, *Langmuir*, **2011**, *27*, 1448.
50. M. Boccalon, E. Iengo and P. Tecilla, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 20310.
51. T. M. Fyles and C. C. Tong, *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 655.
52. C. P. Wilson and S. J. Webb, *Chem. Commun.*, **2008**, 4007.
53. J. Sabin, G. Prieto, J. M. Ruso, R. Hidalgo-Alvarez and F. Sarmiento, *Eur. Phys. J. E.*, **2006**, *20*, 401.
54. R. Ferdani, R. Li, R. Pajewski, J. Pajewska, R. K. Winter and G. W. Gokel, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 2423.
55. K. D. Legg and D. M. Hercules, *J. Phys. Chem.*, **1970**, *74*, 2114.
56. B. A. McNally, A. V. Koulov, B. D. Smith, J. B. Joos and A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2005**, 1087.
57. S. K. Berezin and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2458.

58. J. Gravel and A. R. Schmitzer, *Supramolecular Chem.*, **2014**, *27*, 364.
59. J. Kempf, N. Noujeim and A. R. Schmitzer, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 42293.
60. M. Vidal, C.-R. Elie, S. Campbell, A. Claing and A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Comm.*, **2014**, *5*, 463.
61. C. R. Elie, G. David and A. R. Schmitzer, *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 2358.
62. D. W. Smith, *J. Chem. Educ.*, **1977**, *54*, 540.
63. Z. Li, L. Q. Deng, J. X. Chen, C. Q. Zhou and W. H. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 11761.
64. S. Zhang and Y. Zhao, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 260.
65. N. Busschaert, C. Caltagirone, W. Van Rossom and P. A. Gale, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 8038.
66. O. O. Ajani, D. V. Aderohunmu, C. O. Ikpo, A. E. Adedapo and I. O. Olanrewaju, *Archiv der Pharmazie*, **2016**, *349*, 475.
67. X.-P. Li, M. Pan, S.-R. Zheng, Y.-R. Liu, Q.-T. He, B.-S. Kang and C.-Y. Su, *Cryst. Growth Des.*, **2007**, *7*, 2481.
68. N. Şireci, Ü. Yilmaz, H. Küçükbay, M. Akkurt, Z. Baktir, S. Türktekin and O. Büyükgüngör, *J. Coord. Chem.*, **2011**, *64*, 1894.
69. S. Budagumpi and S. Endud, *Organometallics*, **2013**, *32*, 1537.
70. B. Bildstein, M. Malaun, H. Kopacka, K.-H. Ongania and K. Wurst, *J. Organomet. Chem.*, **1998**, *552*, 45.
71. S. Ermler, M. Scholze and A. Kortenkamp, *Mutagenesis*, **2013**, *28*, 417.
72. D. Joshi and K. Parikh, *Med. Chem. Res.*, **2013**, *23*, 1290.
73. D. Song and S. Ma, *Chem. Med. Chem*, **2016**, *11*, 646.
74. F. C. Tenover, *Am. J Med. Sci*, **2006**, *119*, S3.
75. G. Sathaiah, A. Ravi Kumar, A. Chandra Shekhar, K. Raju, P. Shanthan Rao, B. Narsaiah, A. Raghuram Reddy, D. Lakshmi and B. Sridhar, *Med. Chem. Res.*, **2012**, *22*, 1229.
76. C. R. Elie, A. Hebert, M. Charbonneau, A. Haiun and A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 923.
77. C. C. Peng, Z. Li, L. Q. Deng, Z. F. Ke and W. H. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 2442.

78. C.-C. Peng, M.-J. Zhang, X.-X. Sun, X.-J. Cai, Y. Chen and W.-H. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**.
79. K. K. Coti, M. E. Belowich, M. Liong, M. W. Ambrogio, Y. A. Lau, H. A. Khatib, J. I. Zink, N. M. Khashab and J. F. Stoddart, *Nanoscale*, **2009**, *1*, 16.
80. Y. Tian, R. Guo, Y. Jiao, Y. Sun, S. Shen, Y. Wang, D. Lu, X. Jiang and W. Yang, *Nanoscale Horiz.*, **2016**, *1*, 480.
81. H. I. Chang and M. K. Yeh, *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, *7*, 49.
82. T. M. Allen and P. R. Cullis, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2013**, *65*, 36.
83. N. Beztsinna, Y. Tsvetkova, M. Bartneck, T. Lammers, F. Kiessling and I. Berque-Bestel, *Bioconjugate chem.*, **2016**.
84. L. Zhao, L. Zhu, F. Liu, C. Liu, D. Shan, Q. Wang, C. Zhang, J. Li, J. Liu, X. Qu and Z. Yang, *Int. J. Pharmaceutics*, **2011**, *410*, 83.
85. A. M. Caminade and C. O. Turrin, *J. Mat. Chem. B*, **2014**, *2*, 4055.
86. V. Janout and S. L. Regen, *Bioconjugate chem.*, **2009**, *20*, 183.
87. V. Janout, M. Lanier and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1573.
88. V. Janout, M. Lanier and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 640.
89. W. H. Chen, X. B. Shao and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12727.
90. W. H. Chen, V. Janout, M. Kondo, A. Mosoian, G. Mosoyan, R. R. Petrov, M. E. Klotman and S. L. Regen, *Bioconjugate chem.*, **2009**, *20*, 1711.
91. M. Mehiri, W. H. Chen, V. Janout and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1338.
92. L. L. Cline, V. Janout, M. Fisher, R. L. Juliano and S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 2210.
93. V. Janout, W. A. Schell, D. Thevenin, Y. Yu, J. R. Perfect and S. L. Regen, *Bioconjugate chem.*, **2015**, *26*, 2021.
94. V. Janout, B. Jing and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15862.
95. Y. M. Lu, L. Q. Deng, X. Huang, J. X. Chen, B. Wang, Z. Z. Zhou, G. S. Hu and W. H. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 8221.
96. Y.-M. Lu, L.-Q. Deng and W.-H. Chen, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 43444.
97. L. Q. Deng, Z. Li, Y. M. Lu, J. X. Chen, C. Q. Zhou, B. Wang and W. H. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 745.

98. Z. Li, L. Q. Deng, Y. Chen, T. Wu and W. H. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**.
99. X. Z. Lai, Y. Feng, J. Pollard, J. N. Chin, M. J. Rybak, R. Bucki, R. F. Epand, R. M. Epand and P. B. Savage, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1233.
100. N. Malanovic and K. Lohner, *Biochim Biophys. Acta*, **2015**.
101. R. F. Epand, J. E. Pollard, J. O. Wright, P. B. Savage and R. M. Epand, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2010**, *54*, 3708.
102. V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo and J. F. Stoddart, *Angew. Chem.*, **2000**, *39*, 3348.
103. M. E. Belowich, C. Valente, R. A. Smaldone, D. C. Friedman, J. Thiel, L. Cronin and J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 5243.
104. M. Franz, J. A. Januszewski, D. Wendinger, C. Neiss, L. D. Movsisyan, F. Hampel, H. L. Anderson, A. Gorling and R. R. Tykwinski, *Angew. Chem.*, **2015**, *54*, 6645.
105. C. S. Kwan, A. S. Chan and K. C. Leung, *Org. Lett*, **2016**, *18*, 976.
106. H. Liu, W. J. Hu, Y. A. Liu, J. S. Li, B. Jiang and K. Wen, *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 6457.
107. C. J. Bruns and J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 2186.
108. D. B. Smithrud, X. Wang, P. Tarapore and S. M. Ho, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 27.
109. R. Barat, T. Legigan, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, E. Péraudeau, J. Clarhaut, P. Poinot, A. E. Fernandes, V. Aucagne, D. A. Leigh and S. Papot, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 2608.
110. T. M. Mekhail and M. Markman, *Expert Opin. Pharmacother.*, **2002**, *3*, 755.
111. A. Fernandes, A. Viterisi, F. Coutrot, S. Potok, D. A. Leigh, V. Aucagne and S. Papot, *Angew. Chem.*, **2009**, *48*, 6443.
112. Z. Žižka, *Folia Microbiologica*, **1998**, *43*, 7.
113. C. Chhun and A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Comm*, **2011**, *2*, 987.
114. C. Chhun, J. Richard-Daniel, J. Kempf and A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem*, **2013**, *11*, 6023.
115. C. Chhun, Axe et Rotaxane Parapluie, vers de nouveaux transporteurs transmembranaires de chlorures et de médicaments cycliques, Ph. D Thesis, Université de Montréal, 2012.
116. A. Case and R. L. Stein, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 3335.

**Chapitre 2 : Etude des propriétés ionophores du  
2,4,7-triphénylbenzimidazole pour le transport  
transmembranaire d'anions.**



## 2.1 Préface

Au commencement de ces travaux, un seul exemple de transporteur anionique contenant le motif benzimidazolium avait été rapporté par notre groupe, mais les performances de ces molécules dans ce domaine restaient à améliorer. Il en était ressorti que le sel de benzimidazolium, lorsque dérivé avec deux bras phényléthynylbenzyle, était capable de s'auto-assembler en canal à travers la membrane phospholipidique. Basée sur cette observation, nous avons décidé d'étudier les propriétés ionophores d'une petite molécule planaire et dont la flexibilité était limitée, afin de favoriser son auto-association dans la membrane. Ce chapitre s'attardera donc sur la synthèse et la caractérisation du 2,4,7-triphénylbenzimidazole et son sel de chlorure correspondant. L'efficacité de la molécule à transporter les anions sous sa forme déprotonnée (à pH = 6,4) sera analysée. Par la suite, l'auto-assemblage de la molécule dans la membrane en hélice, son mécanisme de transport et la sélectivité anionique seront discutés.

Ma contribution à cet article fut de réaliser la totalité du travail expérimental présenté ici, ainsi que de rédiger la première version du manuscrit. Les analyses de diffraction des rayons X ont été réalisées par moi-même sous la supervision de Michel Simard.

Nadim Noujeim a proposé l'idée d'utiliser le motif 2,4,7-triphénylbenzimidazole comme transporteur transmembranaire.

La modélisation moléculaire présentée ici pour appuyer les propositions mécanistiques, ainsi que la version finale de la rédaction du manuscrit ont été réalisées par professeur Andreea R. Schmitzer.

Les informations supplémentaires de cet article se trouvent aux pages 166 - 174 de ce document.

## **2.2 Article 1 : 2,4,7-Triphenylbenzimidazole : the monomeric unit of supramolecular helical rod-like transmembrane transporters**

Julie Kempf, Nadim Noujeim and Andreea R.Schmitzer

Département of Chemistry, Université de Montréal, C.P 6128 Succursale Centre-ville,  
Montréal, Québec, H3C 3J4, Canada

*RSC Advances*, **2014**, *4*, 42293-42298

Reprinted with minor corrections, with permission from RSC Advances, Julie Kempf, Nadim Noujeim and Andreea R. Schmitzer, “2,4,7-Triphenylbenzimidazole: the monomeric unit of supramolecular helical rod-like transmembrane transporters”, **2014**, *4*, 42293-42298. Copyright (2014) Royal Society of Chemistry.

### 2.2.1 Abstract

We describe the ability of 2,4,7-triphenylbenzimidazole to form a robust self-assembly inside phospholipid bilayers. The 2,4,7-triphenylbenzimidazole monomers possess a planar structure and a lipophilicity that allow them to self-assemble into helicoidal rod-like aggregates promoting anionic diffusion *via* helical pathways on their aromatic exterior. Their potent anionophoric activity is demonstrated by very low EC<sub>50</sub> values (70 μM).

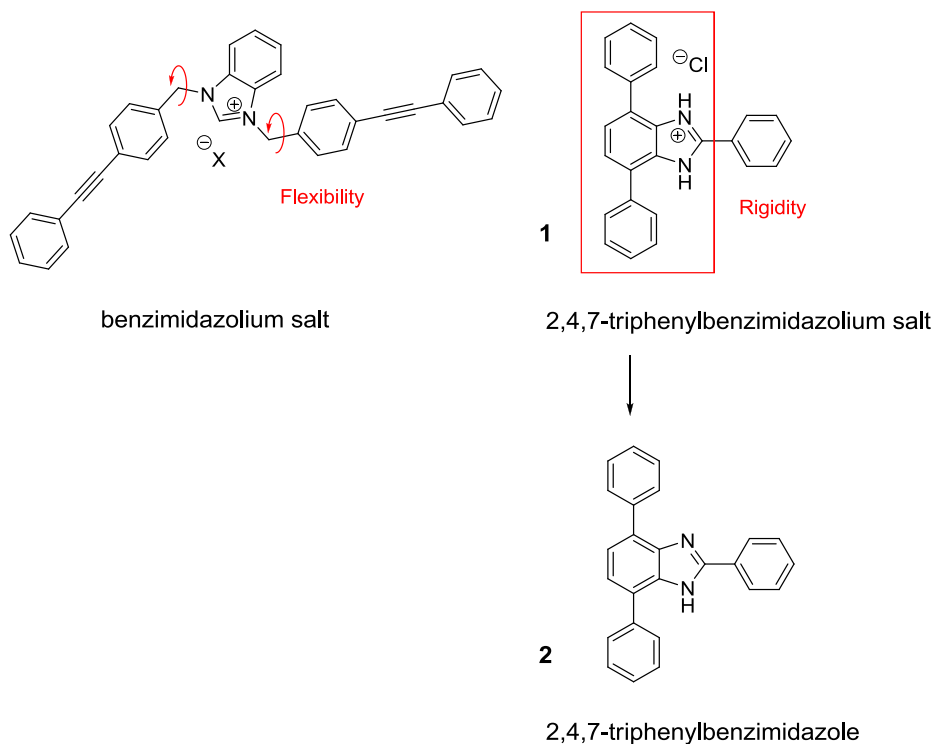
### 2.2.2 Introduction

The cell membrane is a highly lipophilic barrier that regulates all exchanges between the intracellular and extracellular environment. This phospholipid bilayer exhibits a certain permeability and fluidity, allowing the passage of small polar molecules like water or carbon dioxide<sup>1,2</sup> and repelling charged molecules, such as ions. Ions are essentials in many biological and cellular regulation processes<sup>1</sup> and chloride is one of the most important anions in the organism, being involved in the regulation of the cells volume.<sup>3,4</sup> Dent's diseases, Bartter syndrome and cystic fibrosis are only a few examples of diseases resulting from a deficiency in the chloride transport process across the cell membrane.<sup>5</sup> Cystic fibrosis, a common lethal genetic disease in Caucasians, with approximately 70 000 cases in the entire world in 2013,<sup>6</sup> is the consequence of a mutation of the transmembrane conductance regulator protein (CFTR),<sup>7,8</sup> leading to an interruption of the chloride efflux across the cell membrane. A major effect of this ion concentration perturbation is the formation of sticky mucus in the lungs,<sup>9</sup> causing bacterial infections that often result in an elevated morbidity of the patients.

Over the past ten years, many research groups have focused on the development of different strategies to compensate for chloride transport failure using synthetic anion transporters. Different classes of supramolecular assemblies using weak interactions such as hydrogen bond<sup>10-12</sup>,  $\pi$ -anion<sup>13-16</sup> and  $\pi$ -cation<sup>17</sup> interactions have been developed as anion transporters.

Our group has recently reported the anionophoric properties of benzimidazolium salts,<sup>18-20</sup> forming dimeric channels, where anions can circulate through a succession of anion-

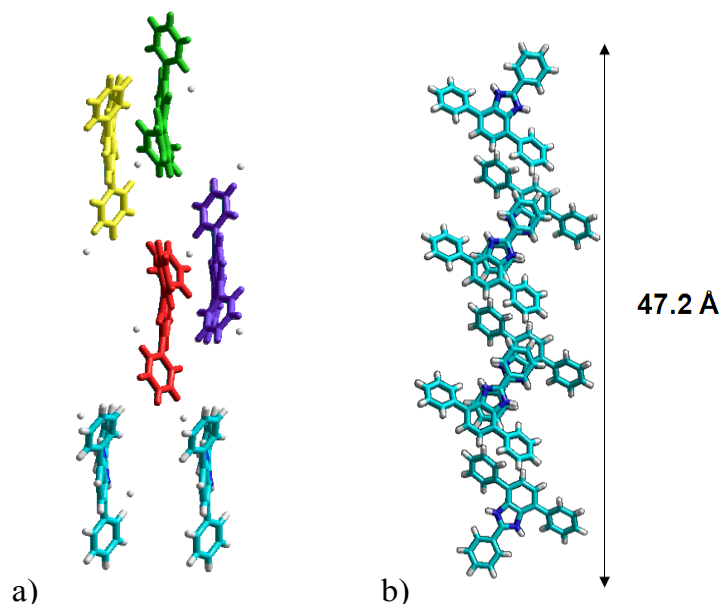
$\pi$  interactions with the aromatic rings of the (4-phenylethynyl)benzyl units. The 2,4,7-triphenylbenzimidazole motif was previously reported by Loeb *et al.* as template for the assembly of 2-pseudorotaxanes and was also incorporated into metal organic frameworks (MOF's)<sup>21-22</sup>. The 2,4,7-triphenylbenzimidazole scaffold can be seen as a rigid analog of our previously reported benzimidazolium salts, possessing self-association properties and multiple  $\pi$ -anion interaction sites. We report here the anionophoric properties of 2,4,7-triphenylbenzimidazole and its analogous chloride salt (Figure 2.1). We describe the benefit of the aromaticity and planarity of the 2,4,7-triphenylbenzimidazole unit for chloride transport across lipid membranes, demonstrating that the anionophoric properties of 2,4,7-triphenylbenzimidazole result from the formation of a new type of aromatic rigid rod and discussing the kinetics and the mechanism of the chloride transport process.



**Figure 2.1** : Structure of the benzimidazolium salts previously studied in our group, the 2,4,7-triphenylbenzimidazolium salt **1** and its unprotonated analog **2**.

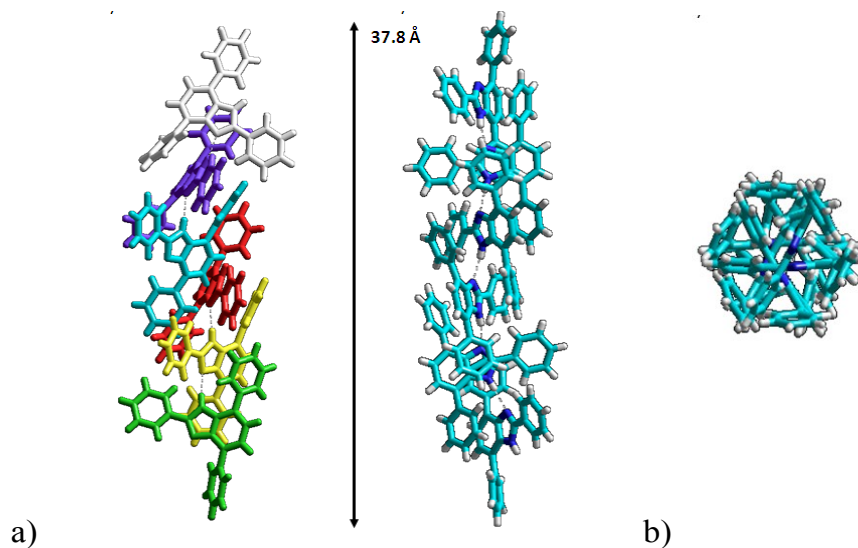
### 2.2.3 Results and discussion

The 2,4,7-triphenylbenzimidazolium chloride salt **1** was synthesized as previously described in the literature.<sup>21</sup> Crystals of **1** were grown by slow diffusion of hexane in chloroform and their self-assembly in the solid state is shown in Figure 2.2. The maximization of the  $\pi$ - $\pi$  interactions between all the aromatic rings results in the formation of interpenetrated aromatic sheets formed by 4 monomers. The positive charges of the benzimidazolium cations are located inside the tetramer.



**Figure 2.2** : Packing motif of **1** illustrating the self-assembly in the solid state. Chloride anions are shown in grey in a) and are not shown for clarity in b). The 4 monomers forming the unit cell are represented in 4 different colors in a).

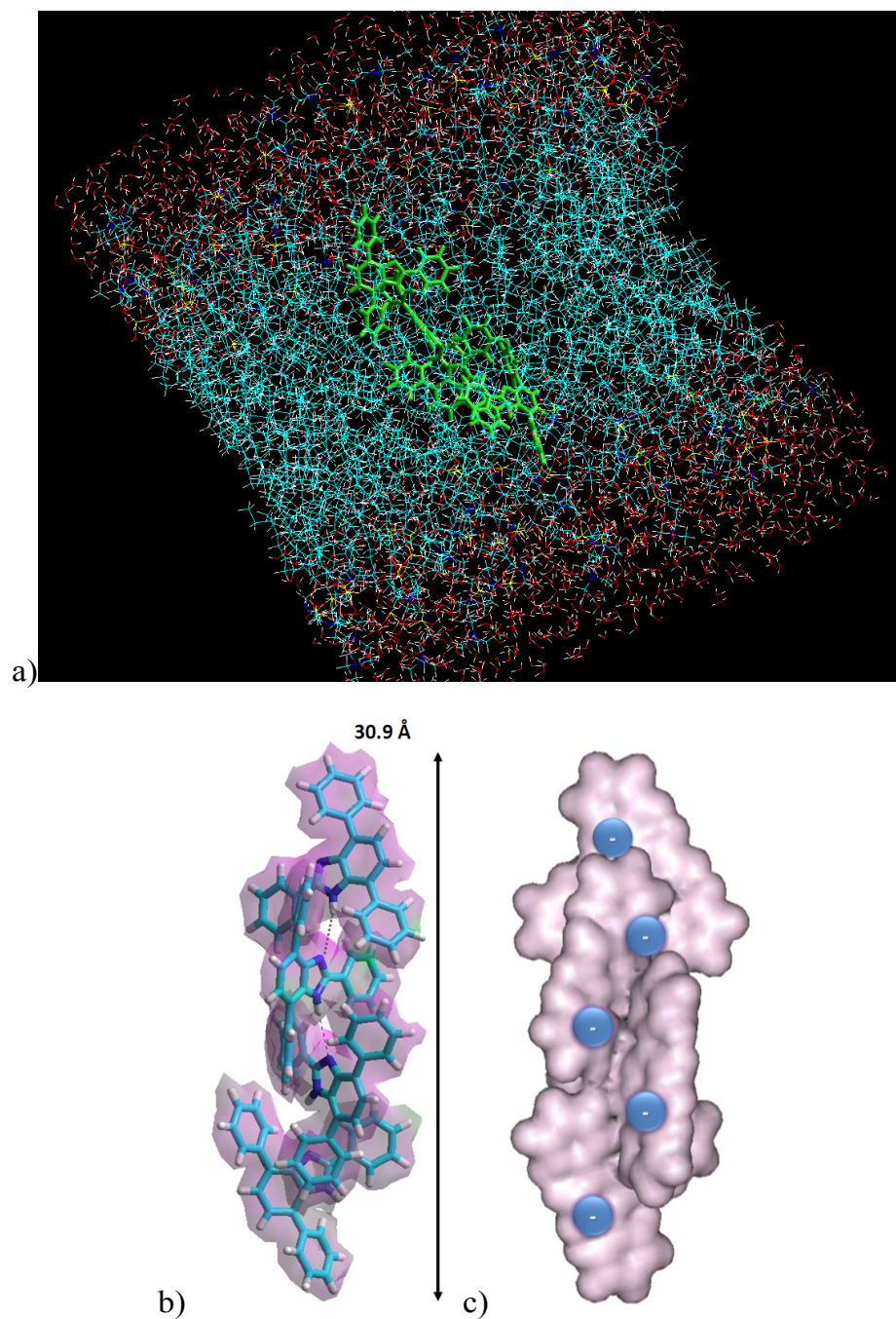
Due to its high aromaticity, compound **1** has a  $pK_a = 4.48 \pm 0.10$ , indicating that 98 % of the molecules are deprotonated in the conditions generally used for chloride transport assays ( $pH = 6.4$ ). Crystals of the unprotonated 2,4,7-triphenylbenzimidazole **2** were obtained by slow diffusion of hexane in a chloroform solution and their self-assembly in the solid state is shown in Figure 2.3.



**Figure 2.3** : Packing motif of **2** illustrating the self-assembly of **2** in the solid state: side views in a), and top view of the rod in b). The formation of the helix can be observed when different colors are used.

The crystal organization of **2** shows the formation of helical rods promoted by the formation N-H $\cdots$ N hydrogen bonds between the benzimidazole moieties. This supramolecular self-assembly is also stabilized by  $\pi$ -stacking interactions between the triphenyl aromatic rings forming a hydrophobic aromatic exterior of the rod (Figure 2.3 a and b)).

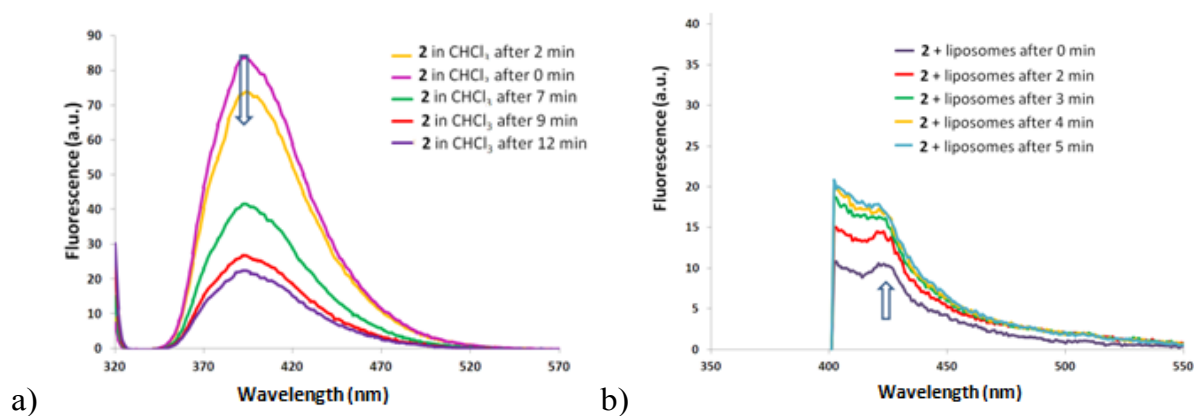
The possibility to preserve this kind of aromatic rod-like self-assembled structure in the presence of phospholipids was evaluated by a molecular modeling study of four monomers of **2** in an egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) bilayer. Figure 2.4 shows the assembly of the four monomers in a rod-like helical supramolecular structure that matches the thickness of the hydrophobic part of the bilayer (around 30 Å).<sup>23,24</sup> This rod-like structure is less compact, compared to the organization in the crystal, but the same H-bonds and  $\pi$ -stacking interactions were observed in the self-assembled structure in the presence of phospholipids. This compact helical rod does not form an open channel across the phospholipid membrane, but could allow anions to slide along the aromatic hollows observed at the surface of the rod, by a succession of anion- $\pi$  interactions on the exterior edges of the supramolecular structure (Figure 2.4 c))



**Figure 2.4**: Molecular modeling results obtained by semi-empirical PM3 geometry optimization of **2** in an EYPC bilayer of 50 x 50 Å. a) Self-assembly of the tetramer shown in green in the hydrophobic interior of the bilayer. b) Details of the H bonds formed in the tetramer. c) Exterior surface of the aromatic rod and possible anion- $\pi$  interactions.

The self-association of **2** in a hydrophobic medium was experimentally followed by fluorescence. The fluorescence of **2** was measured in chloroform in order to mimic the lipophilic environment inside a phospholipid bilayer. The self-association of **2** at a concentration of 2.0 mmol/L in chloroform was confirmed by the decrease of the fluorescence intensity observed after a few minutes (Figure 2.5 a)). The decrease of the fluorescence intensity may be the result of the Dexter exchange transfer, where the photon absorbed by one monomer is transferred to another one spatially close, *via* a non radiative path.<sup>25,26</sup>

A different behavior was observed when **2** was added to an EYPC liposomes solution in sodium nitrate/phosphate buffer (Figure 2.5 b)). In this case, the maximum fluorescence band of **2** was shifted to 423 nm, due to the stabilization of the excited state in a polar environment. Contrary to our previous results obtained in chloroform, an increase of fluorescence was observed after a few minutes. This result suggests the formation of a less compact aggregate, where electron transfer between different monomers cannot occur but H bonds are still present to maintain the self-association. This is in accordance with the molecular modeling results, where a less compact aggregate was formed in the bilayer with a kinetic five times slower than the self-association of **2** in chloroform.



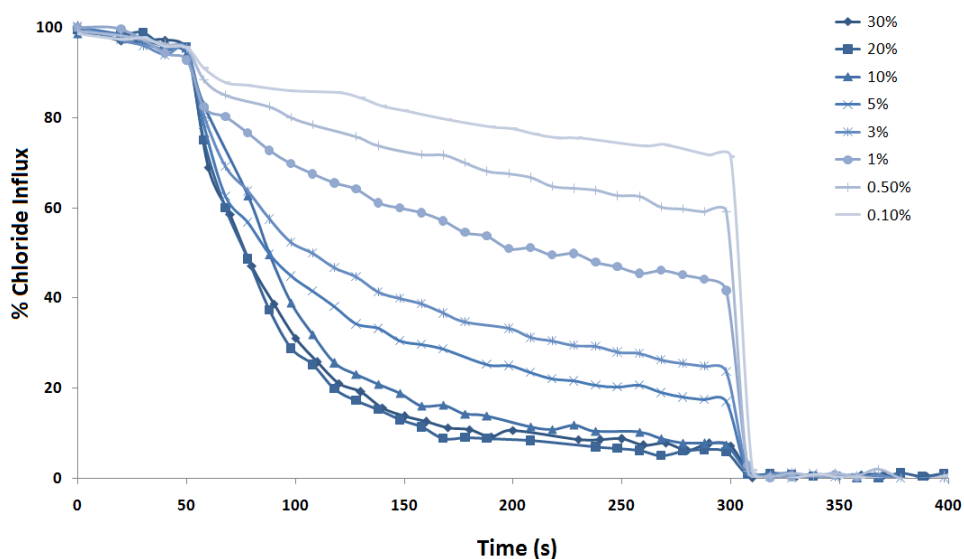
**Figure 2.5** : a) Fluorescence of **2** (0.2 mmol/l) in  $\text{CHCl}_3$  at 37 °C. b) Fluorescence of **2** (10 mol %, 1.0 mmol/l) in the presence of liposomes at 37 °C. Intravesicular: 100 mM  $\text{NaNO}_3$ , 10 mM phosphate buffer. Extravesicular: 100 mM  $\text{NaNO}_3$ , 100 mM  $\text{NaCl}$ , 10 mM phosphate buffer (pH 6.4).



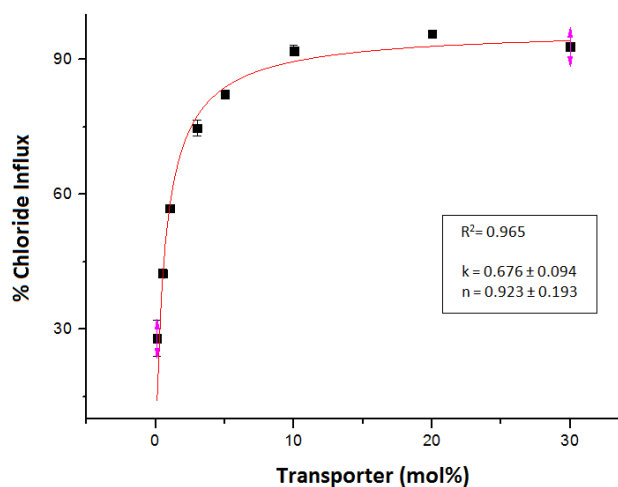
The chloride transport properties of **2** were evaluated using EYPC liposomes containing lucigenin, a fluorescent probe, which fluorescence is quenched in the presence of chloride anions.<sup>27</sup> For these studies, lucigenin was encapsulated in the liposomes and chloride anions were present in the extravesicular solution.<sup>28</sup> The concentration of **2** (in MeOH) was varied from 0.1 to 30 mol % relative to the concentration of EYPC (10 mM) and the decrease of fluorescence as a function of time was observed. A decrease of the fluorescence intensity of lucigenin when the transporter was added was specific to the capacity of the transporter to translocate chlorides inside the liposomes and quench lucigenin's fluorescence (Figure 2.6).

Based on kinetic results shown in Figure 2.6, and using a dose response analysis, the transport efficiency ( $EC_{50}$ ) of **2** was determined. The  $EC_{50}$  value in a  $NO_3^-/Cl^-$  antiport system was  $0.67 \pm 0.1$  mol % (relative to EYPC concentration), almost five times lower than the  $EC_{50}$  value of our previously reported benzimidazolium salts (2.99 mol %),<sup>20</sup> and comparable to the efficiency of other classes of synthetic transporters reported in the literature.<sup>12,29</sup> The Hill coefficient  $n$  obtained from the dose response analysis is  $0.92 \pm 0.19$ . The Hill coefficient generally reports the stoichiometry of the stable supramolecular aggregate required to perform the chloride transport process across the membrane. In this case, the Hill parameter close to 1 suggests the formation of a discrete self-assembled aggregate in the phospholipid bilayer, responsible of the chloride transport process.<sup>30</sup>

a)

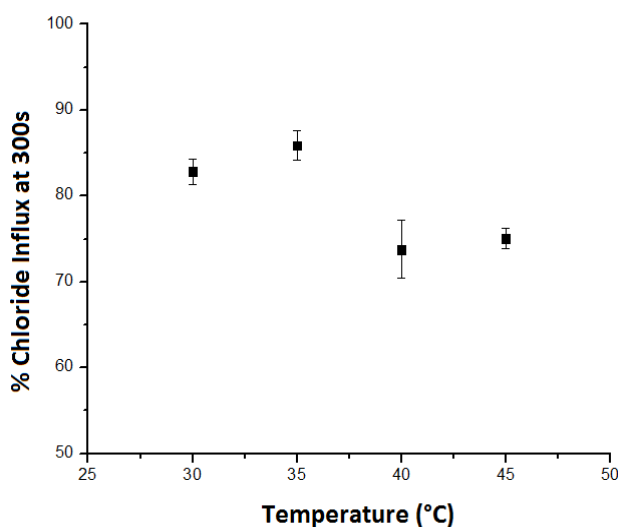


b)



**Figure 2.6** : a) Efflux of  $\text{Cl}^-$  in EYPC liposomes (10 mM) containing 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 20 and 30 mol % (relative to phospholipid) of **2** at 37 °C. Intravesicular: 100 mM  $\text{NaNO}_3$ , 10 mM phosphate buffer, lucigenin 2 mM. Extravesicular: 100 mM  $\text{NaNO}_3$ , 10 mM phosphate buffer (pH 6.4). 100 mM  $\text{NaCl}$  was added before experiments. **2** was added at 50 s and Triton X was added at 300 s. Each curve is the average of three independent measurements. (b) Hill plot analysis obtained from data shown in a).

In order to gain a better understanding of the mechanism of transport of **2**, similar chloride transport studies were performed in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) liposomes. These phospholipids possess a phase transition temperature at 41°C; below and above this temperature the liposomes are respectively in the gel and the fluid state.<sup>1,31</sup> In the gel state, a reduction of chloride efflux may be observed in the case of a mobile carrier, and no or slight variation of chloride transport is usually noted for transmembrane channels. Figure 2.7 shows the maximum of chloride efflux after 250 seconds of transport obtained with 10 mol% of **2** at different temperatures. These results support the formation of a transmembrane channel, as the fluidity of the membrane did not affect the chloride efflux rate.

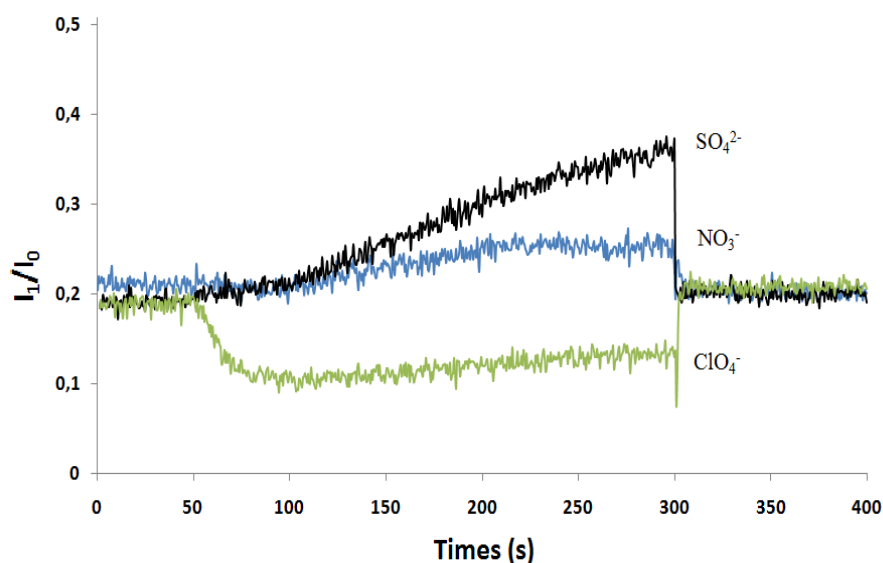


**Figure 2.7** : Chloride efflux at 250 s in DPPC liposomes (10 mM) at 30°C, 35°C, 40°C and 45°C obtained using 10 mol% of **2** (relative to DPPC concentrations). The data at each temperature are the average of triplicates.

As increasing the temperature may also influence the diffusion process, chloride transport studies were also performed in EYPC/cholesterol (ratio 7:3) liposomes. Cholesterol rigidifies the liposome membrane by increasing the energy barrier of phospholipid rotation, lateral diffusion or phospholipid flip-flop inside the membrane.<sup>32,33</sup> In this case, a mobile transporter may encounter some difficulties to pass through the phospholipid/cholesterol membrane, while a transmembrane assembly may not be influenced by the presence of

cholesterol.<sup>34</sup> Obtaining the same chloride transport rate in the presence of **2** in EYPC and EYPC/cholesterol liposomes confirms the DPPC results and the formation of a transmembrane assembly responsible for chloride transport (see ESI Figure A1.2).

The permeation of different anions and electron transfer processes in hybrid membranes were previously reported by Creager *et al.*, when studying electroactive species.<sup>22</sup> They postulated that the anion exchange in the membrane is dependent on the hydrophobic nature of the anion and the ionic content of the external buffer.<sup>37,38</sup>



**Figure 2.8** : HPTS-based transport assay. Intravesicular: 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 6.4), HPTS 0.1 mM. Extravesicular: 100 mM NaX ( $X^- = \text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) or  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 mM phosphate buffer (pH 6.4). 10 mol% of **2** was injected at 50 s, Triton X was injected at 300 s. The Y-axis “ $I_1/I_0$ ” refers to the ratio of HPTS fluorescence emission at 510 nm, where  $I_0$  is the excitation at 403 nm (acidic form of HPTS) and  $I_1$  the excitation at 460 nm (basic form of HPTS). Each curve represents the average of three independent measurements.

We thus decided to investigate the ability of **2** to exchange other ions for the transported chloride anions in liposomes containing 8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate (HPTS) (Figure 2.8). This pH-sensitive probe possesses a protonated and a deprotonated form with excitation wavelengths at 403 nm and 460 nm respectively, and the ratio between the

protonated ( $I_0$ ) and the deprotonated ( $I_1$ ) form is directly related to the transport of protons across the phospholipid bilayer.<sup>39</sup> For these studies intracellular media was composed of a solution of NaCl (100 mM, 10 mM phosphate buffer pH=6.4) and the variation of the intravesicular pH is indicative of proton transport across the phospholipid membrane.

The anion selectivity for **2** follows the Hofmeister series  $\text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$ . Indeed, alkalinization of the intracellular media by release of protons under the effect of the transporter was observed only when the extravesicular anion was more hydrophilic than the internal chloride anion.<sup>39</sup> For nitrate which possesses a hydration enthalpy close to that of chloride ( $\Delta H = -320$  kJ/mol and  $\Delta H = -390$  kJ/mol respectively), a very low alkalinization of the intracellular media was observed (Figure 2.8). This result suggests a low transport of protons and confirms the  $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$  antiport process previously observed in the lucigenin assays when sodium nitrate was used as intracellular buffer. In the case of the more hydrophilic  $\text{SO}_4^{2-}$  anion ( $\Delta H = -1080$  kJ/mol), an increase with time of the  $I_1/I_0$  ratio revealed a proton transport across the bilayer. In the presence of this anion, the antiport process is unfavoured due to the anion hydration layer which makes it too hydrophilic to cross the phospholipid membrane. The  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  symport mechanism was favoured and probably occurred in parallel to the low  $\text{SO}_4^{2-}/\text{Cl}^-$  antiport mechanism. The opposite behaviour was observed for  $\text{ClO}_4^-$  which is more lipophilic ( $\Delta H = -260$  kJ/mol)<sup>40</sup> than the internal chloride. Protons were transported inside the liposomes, suggesting a faster  $\text{H}^+/\text{ClO}_4^-$  symport process. The rapid acidification of the liposome internal media was followed by a second, slower process, where protons were transported outside the liposomes and observed as an increase of the  $I_1/I_0$  ratio.

Based on these results, investigations of the pH influence on chloride transport in EYPC liposomes containing lucigenin were conducted. Several chloride transport assays with different external phosphate buffers at pH 6.00, 6.23 and 6.83 were performed but no influence of the pH was observed on the maximum of chloride influx (data not shown).

The results obtained in the HPTS assays suggest a faster transport of  $\text{ClO}_4^-$  compared to  $\text{Cl}^-$  in the presence of **2**. Binding affinity studies of compound **2** for  $\text{ClO}_4^-$  and  $\text{Cl}^-$  were performed by NMR titrations in  $\text{CDCl}_3$  with tetrabutylammonium chloride (TBACl) and

tetrabutylammonium perchlorate (TBAClO<sub>4</sub>). A low association constant of  $K_a \approx 10 \text{ M}^{-1}$  and a 1:1 binding stoichiometry were obtained for both Cl<sup>-</sup> and ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> anions. This lack of difference in the association constant values obtained by NMR titrations suggests that the most important parameter in the transport process is the lipophilicity of the transported anion. The lipophilic character of **2** (log P = 7.29, calculated with HyperChem) allows it to penetrate the lipophilic interior of the bilayer, where the monomers can self-assemble into the helical rod described earlier. When the helicoidal rod is formed the transport of different anions depends only on the hydration of these anions.

Having studied the role of the extravesicular anion on the transport, several extravesicular solutions with different cations were used in order to determine if a M<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport mechanism can simultaneously occur.<sup>41</sup> The size and the lipophilicity of the cations were modified and chloride transport studies in lucigenin-loaded EYPC liposomes were performed. All the transport assays performed with Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NMe<sub>4</sub><sup>+</sup> showed no variations in the chloride transport rate (see ESI, Figure A1.3), suggesting that no M<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport processes occurred.

Chloride transport can occur by a transport mechanism or by the destabilization of the membrane in the presence of **2**. The integrity of the liposomes during the transport assays was confirmed by dynamic light scattering (DLS) measurements.<sup>42</sup> A blank was performed with liposomes in presence of 50  $\mu\text{l}$  of MeOH and an average diameter of 120 nm was obtained. When 30 mol% of **2** (relative to the concentration of EYPC) in MeOH were added to the liposomes, the diameter of the liposomes increased from 120 nm to 135 nm. This 10% increase in the liposome size is usually the result of the insertion of the transporter into the phospholipid membrane.<sup>43</sup> All the liposomes were monodisperse after addition of the transporters showing that the liposomes were intact and eliminating the hypothesis of liposome destruction. Considering that such a high loading of **2** in the liposome membrane does not affect the integrity of the bilayer, the use of a smaller amount of transporter **2** should not influence the stability of the liposomes either.

## 2.2.4 Conclusion

In conclusion, we described here the ability of 2,4,7-triphenylbenzimidazole to form a robust self-assembly in the phospholipid bilayer. Its planar structure and its lipophilicity make this compound an attractive scaffold for the development of active chloride transporters, the one described here possessing an EC50 value of 70  $\mu\text{M}$ . The 2,4,7-triphenylbenzimidazole monomers self-assemble into a helicoidal rod-like aggregate promoting anionic diffusion via a helical pathway on its aromatic exterior. To the best of our knowledge, this is the first example of a self-assembled aromatic rod-like supramolecular structure containing benzimidazole units, able to efficiently transport anions in phospholipid bilayers. These results are encouraging us to optimize the structure of the 2,4,7-triphenylbenzimidazole unit, by increasing the conjugation and the planarity of the molecule as this might result in improved chloride transport properties.

## 2.2.5 Acknowledgments

We are grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, the Canada Foundation for Innovation and Université de Montréal for financial support.

## 2.2.6 Notes and References

<sup>a</sup> Département de Chimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. E-mail: [ar.schmitzer@umontreal.ca](mailto:ar.schmitzer@umontreal.ca)

<sup>†</sup> Electronic Supplementary Information (ESI) available: experimental details for measurement of chloride transport using the lucigenin and HPTS assays, DLS measurements of liposomes, <sup>1</sup>H NMR titrations, molecular modeling procedures and details of the crystal structures. See DOI: 10.1039/c4ra06887d

1. J. T. Davis, O. Okunola and R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 3843.
2. A. Missner and P. Pohl, *Chem. Phys. Chem.*, **2009**, *10*, 1405.
3. A. S. Verkman and L. J. V. Galletta, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2009**, *8*, 153.
4. M. Suzuki, T. Morita and T. Iwamoto, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **2006**, *63*, 12.
5. T. J. Jentsch, T. Maritzen and A. A. Zdebik, *J. Clin. Invest.*, **2005**, *115*, 2039.
6. P. Maisonneuve, B. C. Marshall, E. A. Knapp and A. B. Lowenfels, *J. Natl. Cancer. Inst.*, **2013**, *105*, 122.
7. J. Eggermont, *Pro.c Am. Thorac. Soc.*, **2004**, *1*, 22.
8. A. A. Aleksandrov, L. A. Aleksandrov and J. R. Riordan, *Pflugers. Arch.*, **2007**, *453*, 693.
9. C. J. Haynes and P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 8203.
10. A. V. Jentsch, D. Emery, J. Mareda, S. K. Nayak, P. Metrangolo, G. Resnati, N. Sakai and S. Matile, *Nat. Commun.*, **2012**, *3*, 905.
11. P. A. Gale, N. Busschaert, C. J. E. Haynes, L. E. Karagiannidis and I. L. Kirby, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 205.
12. C. J. E. Haynes, N. Busschaert, I. L. Kirby, J. Herniman, M. E. Light, N. J. Wells, I. Marques, V. Félix and P. A. Gale, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 62.
13. R. E. Dawson, A. Hennig, D. P. Weimann, D. Emery, V. Ravikumar, J. Montenegro, T. Takeuchi, S. Gabutti, M. Mayor, J. Mareda, C. A. Schalley and S. Matile, *Nat. Chem.*, **2010**, *2*, 533.
14. A. Frontera, P. Gamez, M. Mascal, T. J. Mooibroek and J. Reedjik, *Angew Chem.*, **2011**, *50*, 9564.
15. L. M. Salonen, M. Ellermann and F. Diederich, *Angew. Chem.*, **2011**, *50*, 4808.
16. H. T. Chifotides and K. R. Dunbar, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 894.
17. J. Mareda and S. Matile, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 28.
18. C. R. Elie, N. Noujeim, C. Pardin and A. R. Schmitzer, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 1788.
19. C. R. Elie, M. Charbonneau and A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Comm*, **2012**, *3*, 1231.
20. C. R. Elie, A. Hebert, M. Charbonneau, A. Haiun and A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 923.



21. N. Noujeim, K. Zhu, V. N. Vukotic and S. J. Loeb, *Org. Lett.*, **2012**, 2484.
22. N. Farahani, K. Zhu, N. Noujeim and S. J. Loeb, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 4824.
23. N. Sakai, B. Baumeister and S. Matile, *Chem. Bio. Chem.*, **2000**, *2*, 123.
24. J. Sabin, G. Prieto, J. M. Ruso, R. Hidalgo-Alvarez and F. Sarmiento, *Eur. Phys. J. E.*, **2006**, *20*, 401.
25. M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 534.
26. D. M. Adams, L. Brus, C. E. D. Chidsey, S. Creager, C. Creutz, C. R. Kagan, P. V. Kamat, X. M. Lieberman, O. S. Lindsay, R. A. Marcus, R. M. Metzger, M. E. Michel-Beyerle, J. R. Miller, M. D. Newton, D. R. Rolison, O. Sankey, K. S. Schanze, J. Yardley and X. Zhu, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 6668.
27. B. A. McNally, A. V. Koulov, B. D. Smith, J. B. Joos and A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2005**, 1087.
28. R. Ferdani, R. Li, R. Pajewski, J. Pajewska, R. K. Winter and G. W. Gokel, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 2423.
29. N. J. Andrews, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell Jr and P. A. Gale, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, 256.
30. A. V. Jentzsch, A. Hennig, J. Mareda and S. Matile, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 2791.
31. J. L. Seganish, J. C. Fettinger and J. T. Davis, *Supramol. Chem.*, **2006**, *18*, 257.
32. W. F. Bennett, J. L. MacCallum and D. P. Tieleman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1972.
33. R. D. Kornberg and H. M. McConnell, *Biochem.*, **1971**, *10*, 1111.
34. P. B. Cranwell, J. R. Hiscock, C. J. E. Haynes, M. E. Light, N. J. Wells and P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 874.
35. A. Hosseini, J. P. Collman, A. Devadoss, G. Y. Williams, C. J. Barile and T. A. Eberspacher, *Langmuir*, **2010**, *26*, 17674.
36. J. S. Summer and S. E. Creager, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 8739.
37. G. K. Rowe and S. E. Creager, *Langmuir*, **1991**, *7*, 2307.
38. G. K. Rowe and S. E. Creager, *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 5500.
39. S. K. Berezin and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2458.
40. D. W. Smith, *J. Chem. Ed.*, 540.

41. M. G. Fisher, P. A. Gale, J. R. Hiscock, M. B. Hursthouse, M. E. Light, F. P. Schmidtchen and C. C. Tong, *Chem. Commun.* **2009**, 3017.
42. O. Garbuzenko, Y. Barenhotz and A. Priev, *Chem. Phys. Lipids* **2005**, 117.
43. M. Vidal and A. Schmitzer, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 9998.

**Chapitre 3 : Utilisation d'analogues du 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour la formation d'assemblages métalliques : études de leur propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques**

### 3.1 Préface

Les résultats prometteurs obtenus dans le Chapitre 2 ont motivé les recherches présentées dans ce chapitre. Nous avons synthétisé deux analogues du 2,4,7-triphénylbenzimidazole, possédant des sites de coordination métalliques dans le but d'étudier la possibilité de former des complexes organo-métalliques dans la membrane phospholipidique et d'étudier l'efficacité de ces complexes comme transporteurs transmembranaires. En effet, l'addition d'un métal permet de contrôler leur auto-association dans la membrane, formant ainsi de larges pores qui facilitent le transport transmembranaire. La synthèse des nouvelles molécules et leurs caractérisations ont donc été menées dans ce chapitre. Les analyses physico-chimiques démontrant la formation des complexes métalliques ont été réalisées avant d'effectuer les tests de transport anionique en utilisant une microélectrode. Suite aux résultats satisfaisants obtenus avec ces complexes métalliques, les premiers tests biologiques sur des bactéries à Gram-positifs (*Bacillus thuringiensis*) et sur une souche à Gram-positif résistante à la tétracycline ont été réalisés.

Ma contribution dans cet article a été de réaliser l'ensemble du projet. La synthèse et la caractérisation des molécules, les analyses physico-chimiques, ainsi que les études de transport d'anions et les tests antimicrobiens ont été effectuées par moi-même. J'ai résolu la structure par diffraction des rayons X sous la supervision de Michel Simard. La première version de l'article qui regroupe toutes ces manipulations a été rédigée par moi-même.

Pr. Andreea R. Schmitzer a réalisé les modélisations moléculaires présentes dans ce papier et a procédé à la révision du manuscrit.

Les informations supplémentaires de ce chapitre se trouvent aux pages 175 – 213 de cette thèse.

### **3.2 Article 2 : Metal-organic synthetic transporters (MOST) : from chloride transmembrane transport towards a new strategy to fight resistant bacteria**

Julie Kempf and Andreea R.Schmitzer

Département of Chemistry, Université de Montréal, C.P 6128 Succursale Centre-ville,  
Montréal, Québec, H3C 3J4, Canada

Publication soumise à *Journal of the American Chemical Society*

### 3.2.1 Abstract

We present the synthesis of two functionalized 2,4,7-triphenylbenzimidazole ligands and demonstrate the formation of their respective metal assemblies in phospholipid membranes. Anion transport experiments demonstrate the formation of metal-organic synthetic transporters (MOST) directly in phospholipid membranes. The formation of MOST in phospholipid membranes results in efficient architectures for chloride transport. We also demonstrate the insertion of these ligands and the formation of their metal-organic assemblies in bacterial membranes; the use of MOST to make resistant bacterial membranes more porous and permeable to antibiotics. As a potential strategy to combat resistant bacteria, we also demonstrate that a combination of MOST with tetracycline lowers the sensitivity of the resistant bacteria to tetracycline by 60-fold.

### 3.2.2 Introduction

Metal–organic frameworks (MOFs) materials are one of the most exciting, high-profile developments in nanotechnology in the last twenty years.<sup>1,2</sup> Composed of metal nodes (metal ions, clusters, chains or layers) connected by organic linkers, they show some of the highest porosity known. This property is ideal for gas capture or storage<sup>3, 4</sup> and drug delivery<sup>5</sup> applications. In particular, nontoxic and biodegradable MOFs have been used for the encapsulation and controlled delivery of a large number of therapeutic molecules, including several challenging antitumor and antiretroviral drugs such as busulfan, cidofovir and azidothymidine triphosphate.<sup>6</sup> In addition, metal–ligand assemblies (MLAs) are known to be capable of undergoing spontaneous reconstitution. This allows for the introduction of new functions in specific environments and is very attractive for mimicking the behavior of different biological systems involving metals.<sup>7</sup>

Ion transport across cell membranes is one of the most important processes in living cells and is regulated by a wide variety of transporters such as channels, mobile carriers and pumps.<sup>8</sup> There is a growing interest in understanding the mechanism of ion transport and this has opened the door to the synthesis of a wide variety of synthetic ion transporters.<sup>9, 10</sup>

Nevertheless, the design of efficient synthetic ion transporters, and more precisely ion channels, remains a real challenge. It is essential not only to predict the self-association of a compound into a pore-forming architecture, but also to understand the interactions with the surrounding membrane. For example, water or simple ions might interfere with and affect the integrity of the supramolecular architecture.<sup>11-13</sup> For this reason, the assembly of well-defined metal-organic channels in phospholipid bilayers may be a way to induce transmembrane transport.

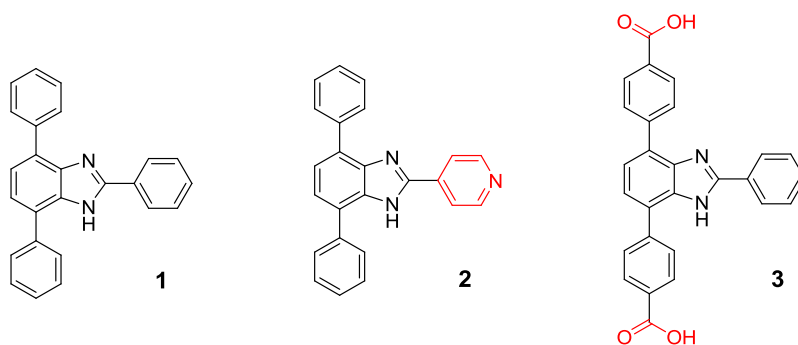
Since, functionalized platinum complexes have been shown to behave as metal-organic anion receptors in solution.<sup>14-16</sup> and many anion receptors have been incorporated into the structure of transmembrane ion transporters, it is surprising that only a few MLAs or MOFs have been studied as ion transport candidates. Large MLAs such as Cu<sup>2+</sup>-based polyhedrons<sup>17,18</sup> and oligo-porphyrins with Rh<sup>3+</sup><sup>19, 20</sup>, Pd<sup>2+</sup><sup>21</sup> or Zn<sup>2+</sup><sup>22</sup> were studied for their ionophoric properties. The large pores formed by the metal oligo-porphyrin assemblies were shown to be very effective for the transport of large molecules such as carboxyfluorescein or tetrabutylammonium cation across phospholipid bilayers. Due to the complexity of the synthetic pathway and the poor membrane insertion of these bulky assemblies, smaller components were designed to form synthetic ion channels by coordination with metals. The formation of the so-called “Fujita-Stang” motif between a bipyridine and an amphiphilic palladium derivative was studied by Fyles *et al.*<sup>23</sup> However, multiple unknown assemblies between this ligand and the metal were formed and the desired molecular square was not observed in the phospholipid membrane.

Webb *et al.* also investigated the pyridyl-palladium coordination for the formation of a reversible metal-organic channel in a phospholipid bilayer.<sup>24, 25</sup> Addition of Pd<sup>2+</sup> to an amphiphilic cholate derivative that had been previously inserted in the phospholipid bilayer resulted in a metal-ligand assembly that spanned the phospholipid bilayer and activated the proton/sodium transport process.

The assembly of discrete molecular units into extended networks is generally observed during MOF synthesis. Consequently, this synthetic approach allows reactions under mild conditions. Generally, little is known about the metal- ligand species preformed in solution before the assembly process. Therefore, MOFs are typically obtained by means of

solvothermal synthesis.<sup>26, 27, 28</sup> The similar *in situ* formation of a metal-organic synthetic transporter (MOST) in the phospholipid bilayer has yet to be demonstrated and exploited in transmembrane ion transport. This is presumably due to aqueous/membrane partitioning of the ligand and the metal, as well as the presence of other ions can interfere with the assembly of the MOST.

We have previously demonstrated that 2,4,7-triphenylbenzimidazole **1** inserts into phospholipid bilayers and then self-assembles into rods that promote chloride transport (Figure 3.1).<sup>29</sup> With the addition of supplementary donor atoms (pyridine and carboxylate) on to this scaffold, we demonstrate herein how the assembly of MOSTs in the phospholipid bilayer, can be used to induce the transmembrane transport of ions and other molecules, particularly antibiotics. This is particularly important, as infections from resistant bacteria have become quite common, as some pathogens have become resistant to multiple antimicrobials. Identification of new antibacterial agents and alternative treatments is crucial to increase our ability to fight infectious diseases .<sup>30</sup>



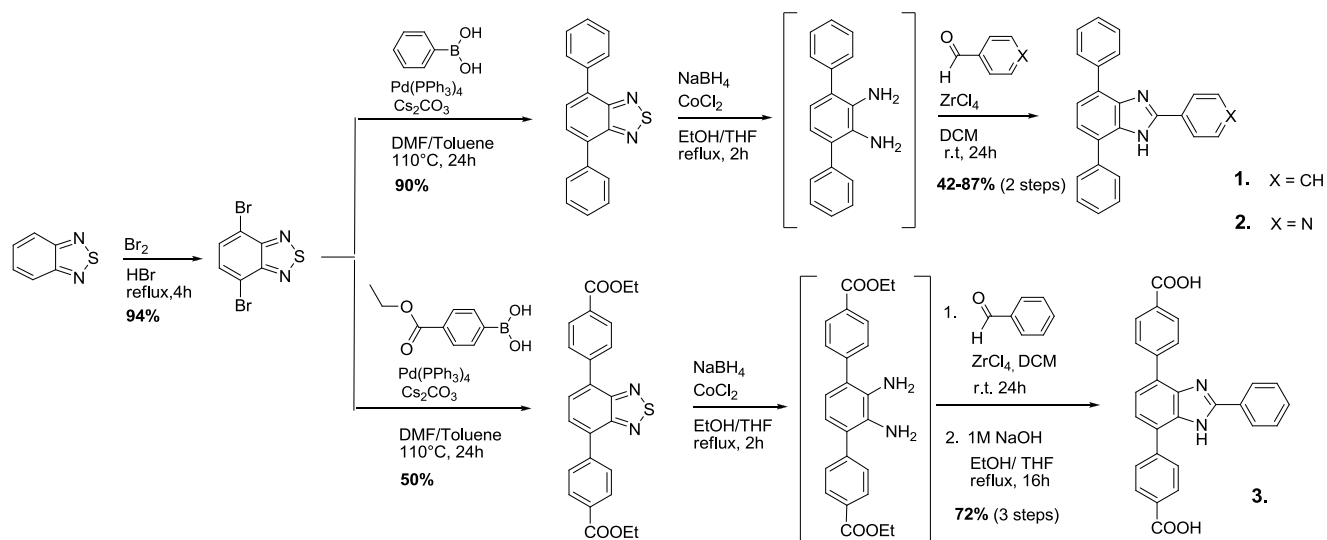
**Figure 3.1:** Structure of the 2,4,7-triphenylbenzimidazole (**1**) and its two analogues with donor groups (red) (**2** and **3**).



## 3.2.3 Results and discussion

### 3.2.3.1 Synthesis

Ligands **2** and **3** were synthesized according to the previously reported procedure for **1**.<sup>31, 32</sup> A pyridyl moiety was added in position 2 of the benzimidazole unit and two carboxylic acids were added in the *para* position of the aromatic rings to obtain ligands **2** and **3**, respectively. The synthetic pathway is shown in Scheme 3.1.



**Scheme 3.1:** Synthesis of ligands **1**, **2** and **3**.

### 3.2.3.2 Insertion into the phospholipid membrane

The insertion of ligands **2** and **3** into the phospholipid membrane, as well as the direct formation of the MOST in a phospholipid membrane, were first monitored by fluorescence. Ligands were added to egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) liposomes in a sodium/phosphate buffer (pH = 7.2). As shown in Figure 3.2a, the maximum of fluorescence of **2** (in dichloromethane) was shifted from 440 nm (in dichloromethane) to 435 nm when incorporated in the phospholipid bilayer, due to the stabilization of the excited state by the presence of a more polar environment (probably close to the charged groups of the phospholipid).<sup>29</sup> After addition of an aliquot of a PdCl<sub>2</sub> solution (in MeOH), a significant

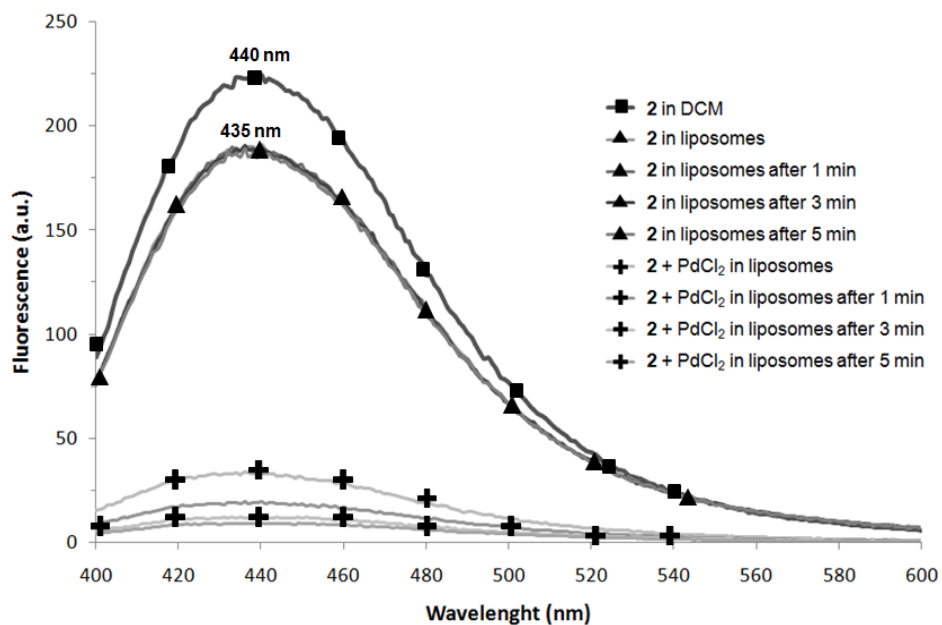
decrease of the fluorescence intensity was observed. This is likely the result of a re-organization of **2** in the membrane and formation of a metal-ligand complex, where photon transfer from one molecule to another one spatially close, can occur.<sup>29</sup> The same behavior was observed for ligand **3**, but quenching of the fluorescence, induced by the addition of Pd<sup>2+</sup> ions, was less pronounced in this case suggesting a less dramatic structural change in the self-assembly of ligand **3** due to metal complexation (Figure 3.2b).

### 3.2.3.3 Formation of the metal-ligand complexes

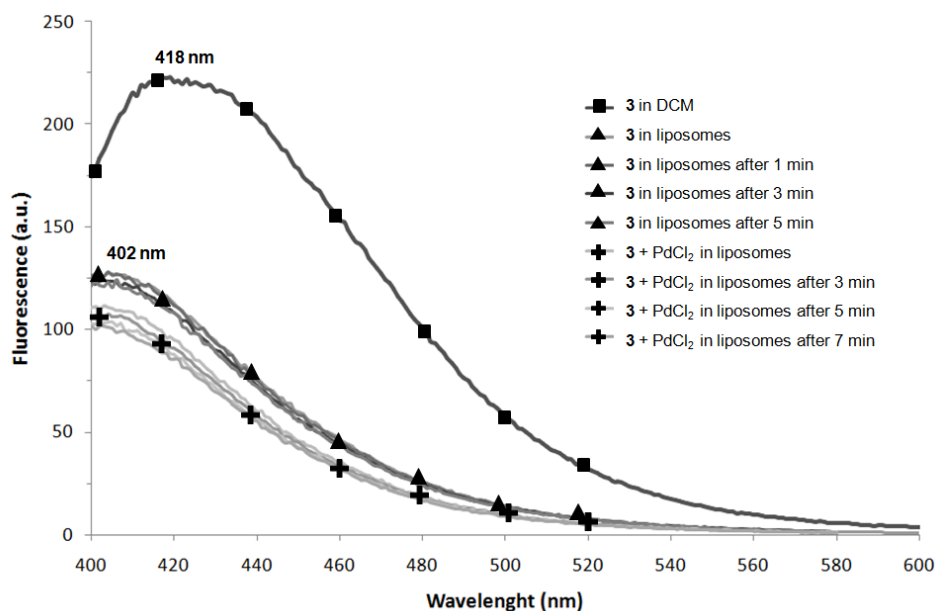
Evidence for the formation of the metal-ligand complexes and their stoichiometry were obtained by UV-vis titration. These experiments were first performed in DCM in order to mimic the hydrophobicity of the phospholipid bilayer. Different amounts of a PdCl<sub>2</sub> solution were added to the ligand solution to observe the complexation. In the case of ligand **1**, a 1:1 complex was formed by complexation to Pd<sup>2+</sup> by the benzimidazole moiety as indicated by the shift of the absorption band corresponding to the n- $\pi^*$  transition, to shorter wavelengths<sup>33</sup> (see ESI, Figure A2.1). When PdCl<sub>2</sub> was added to ligand **2** (Figure 3.3a), the coordination of the more accessible pyridyl unit, was translated into a red shift of the band corresponding to the n- $\pi^*$  transition at 318 nm. This is characteristic of the formation of pyridine:palladium complexes,<sup>34, 35</sup> where the formation of a 2:1 complex was favored (Figure 3.3a). A 1:1 complex is formed between ligand **3** and the metal after the addition of 1 equivalent of PdCl<sub>2</sub> (Figure 3.3b). The proposed structures of the palladium complexes formed in an apolar environment are shown in Figure 3.4.

UV-vis titrations were also performed with HAuCl<sub>4</sub>, AgBF<sub>4</sub>, RuCl<sub>3</sub> and Pd(OAc)<sub>2</sub> and the stoichiometry of the complexes are summarized in Table 3.1 (UV-vis spectra are provided in Figures A2.2 - A2.9). Ligand **2** forms 2:1 complexes with Pd<sup>2+</sup> and Au<sup>3+</sup> and 1:1 complexes with Ru<sup>3+</sup> and Ag. Ligand **3** forms complexes with 1:1 general stoichiometry, which may also correspond to higher 2:2, 3:3, *n:n* stoichiometries, with all the studied metals. However addition of other metals than palladium to ligand **3**, resulted in the formation of different complexes with the benzimidazole unit, as a shift corresponding to the n- $\pi^*$  transition band was observed (ESI Figures A2.3, A2.5, A2.7 and A2.9).

a)

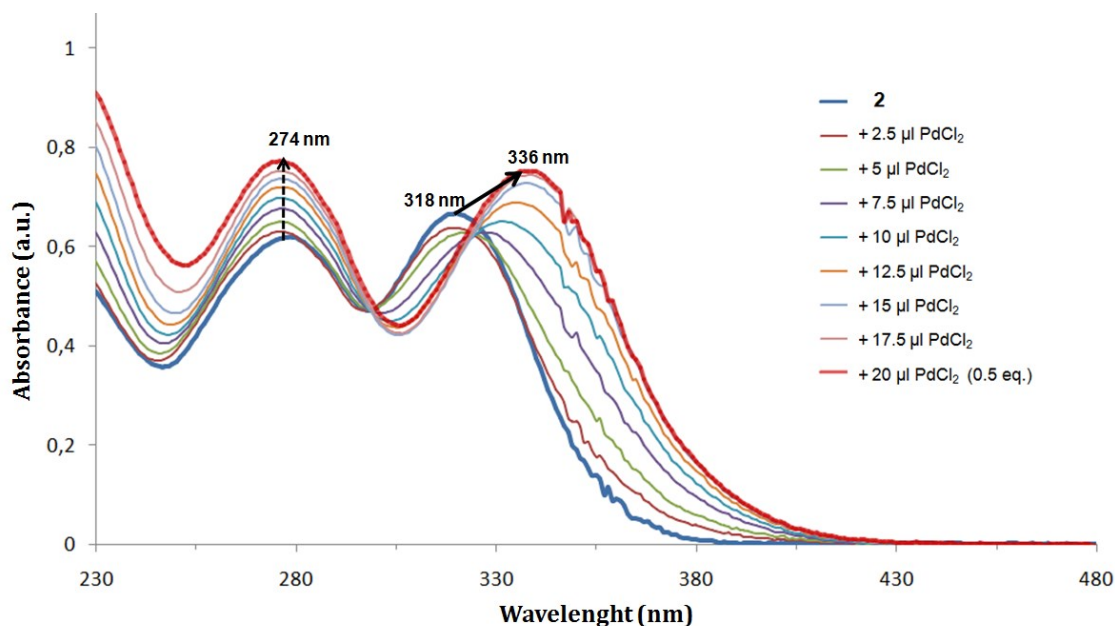


b)

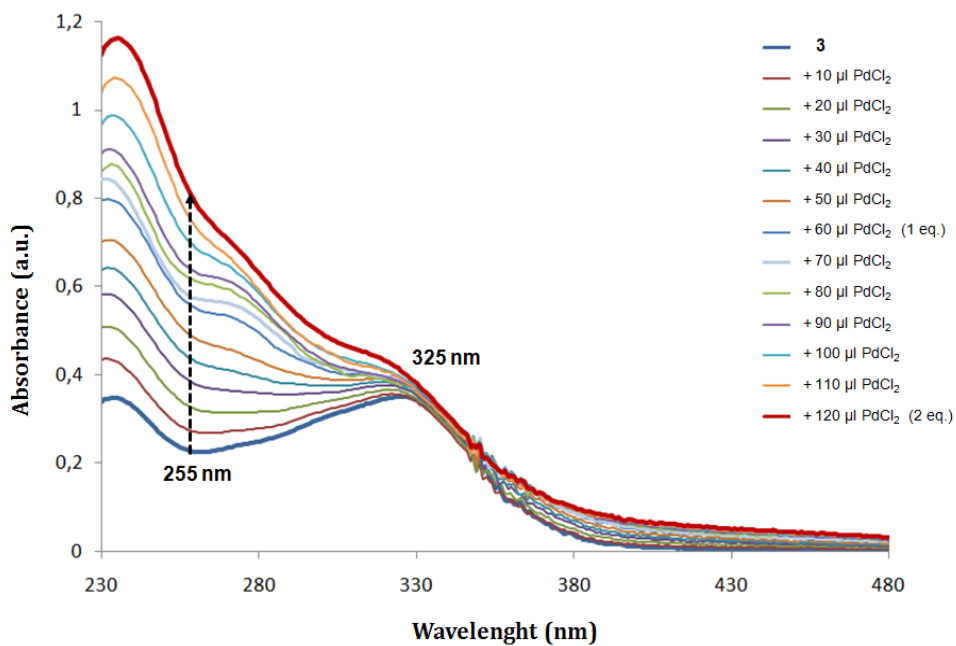


**Figure 3.2:** Fluorescence of a) **2** and b) **3** in dichloromethane (DCM) (0.016 mM, squares), in liposomes at 25 °C (15 mol% of each molecule, triangle) and after the addition of 0.5 equivalent of PdCl<sub>2</sub> (relative to the **2** and **3** concentration respectively, crosses). Intravesicular solution: 5 mM phosphate buffer with 500 mM NaCl. Extravesicular solution: 5 mM phosphate buffer with 500 NaNO<sub>3</sub> (pH = 7.2).

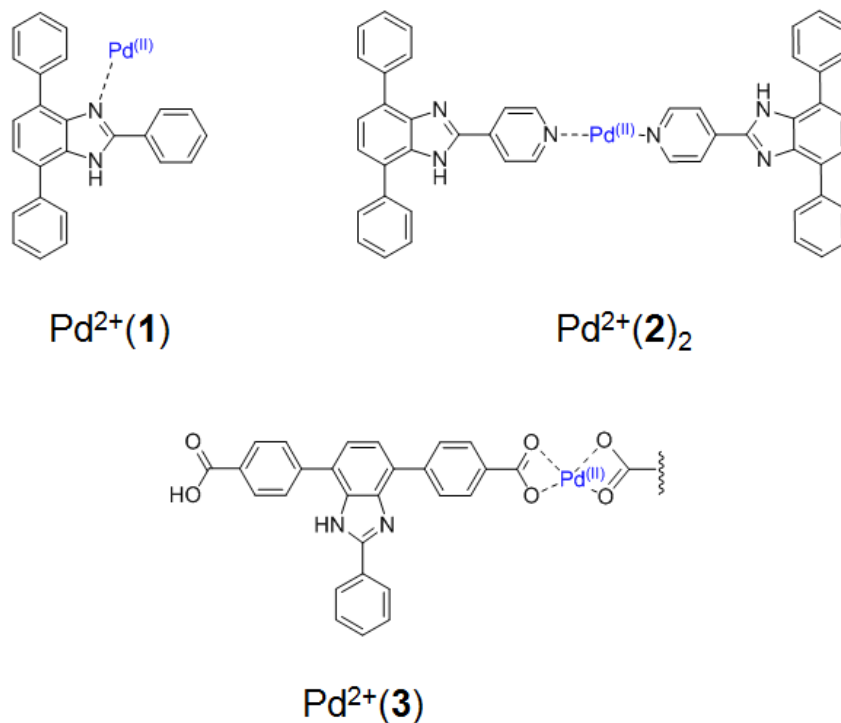
a)



b)



**Figure 3.3** : UV-visible spectra of: a) **2** and b) **3** (concentration 0.033 mM) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in presence of various concentration of  $\text{PdCl}_2$  (methanol solution at 2.5 mM).  $\text{PdCl}_2$  equivalents reported in the legend are relative to the ligands.



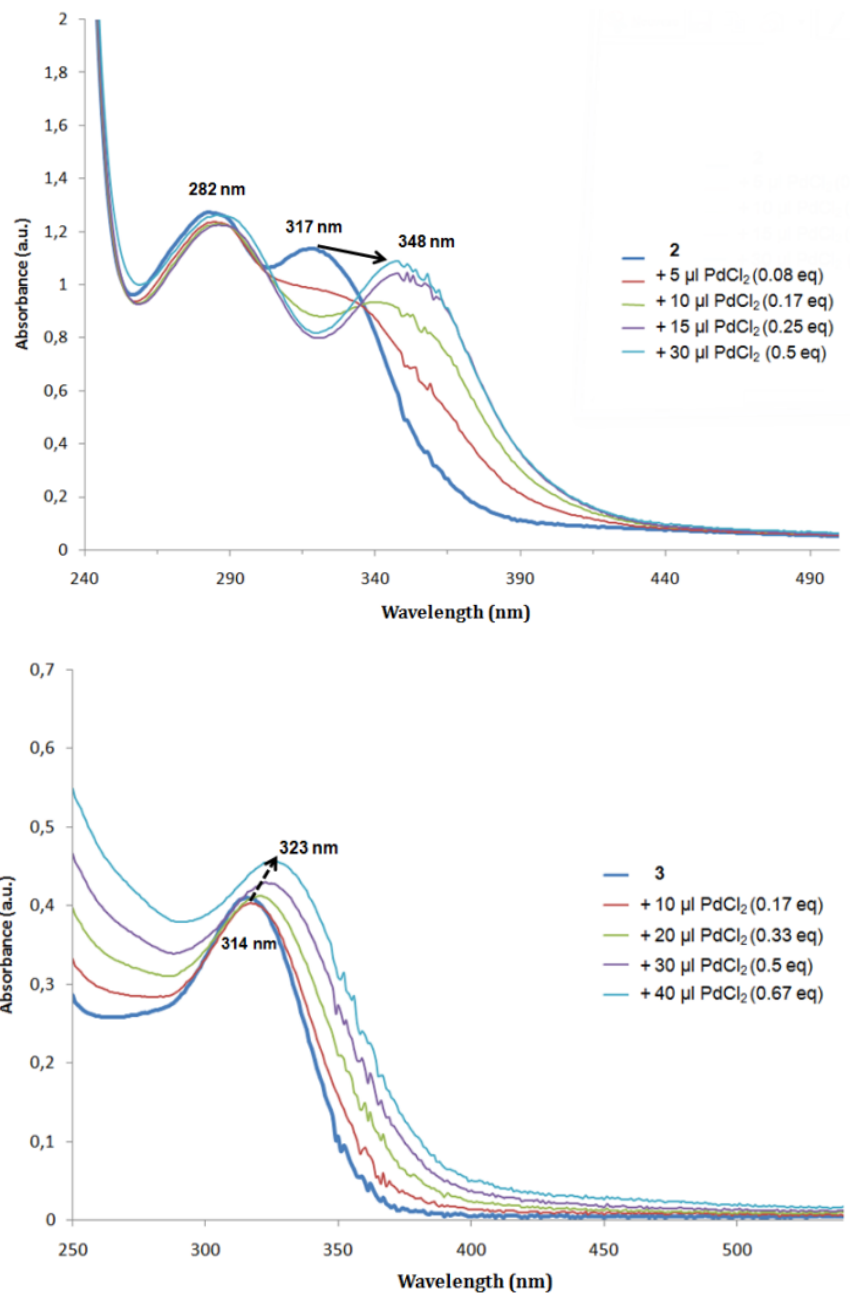
**Figure 3.4** : Schematic representation of the metal complexes of **1**, **2** and **3** with palladium. Chloride ions and coordinated solvents are not shown.

**Table 3.1** : Stoichiometry of the complexes formed by **1**, **2** and **3** with different metals.

	PdCl <sub>2</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	RuCl <sub>3</sub>	HAuCl <sub>4</sub>	AgBF <sub>4</sub>
<b>1</b>	1:1	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>2</b>	2:1	2:1	1:1	2:1	1:1
<b>3</b>	1:1	1:1	1:1*	1:1*	1:1*

\*Metal complex formed with the benzimidazole moiety

Formation of metal-ligand assemblies in the presence of liposomes was also monitored by UV-vis. The UV-vis spectra of both ligands **2** and **3** in the presence of liposomes are indistinguishable from those obtained in DCM, confirming their insertion in the apolar environment of the phospholipid membrane.

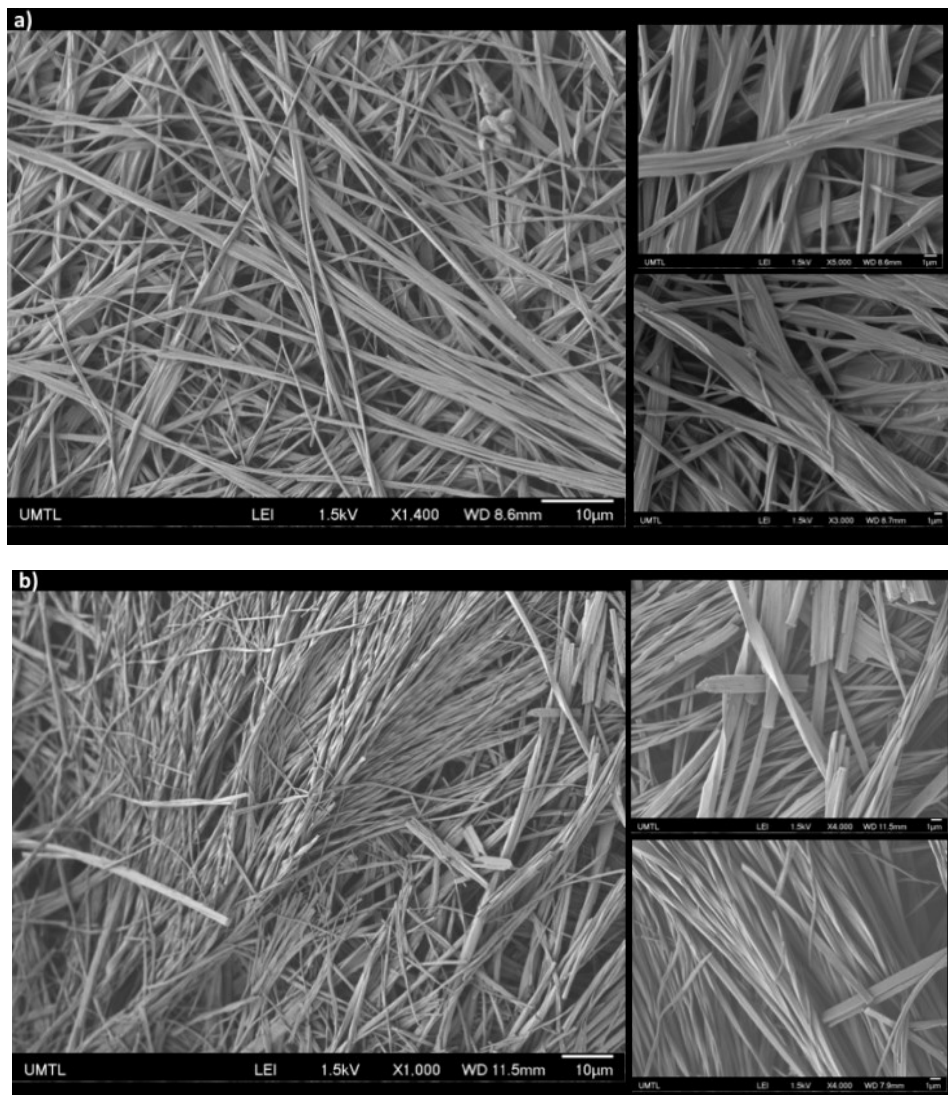


**Figure 3.5** : UV-visible spectra of **2** and **3** (final concentration 0.05 mM) in aqueous solution of liposomes (5 mM) in presence of various concentrations of PdCl<sub>2</sub>.

When 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> was added to the liposomes solution containing ligands **2** or **3**, a red shift of the band corresponding to the n- $\pi^*$  transition was observed. In the case of ligand **2**, the increase in the amount of palladium to one equivalent did not induce any further

change, compared to ligand **3**, where an increase of absorption at 323 nm was observed at 0.67 equivalents of PdCl<sub>2</sub> (Figure 3.5). Unfortunately, at higher concentrations of PdCl<sub>2</sub> precipitation occurred in these aqueous conditions, the 1:1 conditions not having been reached.

The palladium complex obtained by the addition of 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> to ligand **2** in acetonitrile was isolated as a dark orange powder and characterized by NMR and mass spectrometry (see ESI Figure A2.11 – A2.13). Upon complexation with PdCl<sub>2</sub> a significant change in the <sup>1</sup>H NMR spectra was observed, since the signal of the *ortho* and *meta* protons of the pyridine nitrogen were significantly shifted downfield. Due to the lack of solubilities of ligand **3** in acetonitrile and of PdCl<sub>2</sub> in DMSO, the formation of the complex of **3** with Pd(OAc)<sub>2</sub> was monitored in DMSO. Addition of 0.1 equivalents of Pd resulted in the appearance in the <sup>1</sup>H NMR spectra of a sharp peak corresponding to the carboxylic proton. However, upon addition of 0.2 equivalents of Pd(OAc)<sub>2</sub> a precipitate was formed and surprisingly instant gel formation was observed when a 0.5 equimolar amount of Pd(OAc)<sub>2</sub> was added. Gel formation was confirmed by the vial inversion technique. The fast gelation process suggests that there is a rapid complexation between the palladium and the carboxylates, giving rise to large aggregates. Interestingly, ligand **2** gave the same supramolecular gelation under the same conditions, upon addition of 0.5 equivalents of Pd(OAc)<sub>2</sub> in DMSO. The morphological properties of these metallo gels were studied through scanning electron microscopy (SEM) (Figure 3.6). Both palladium complexes form large fibers that exhibit some fine structure and appear to be multi-layered. The fibers are relatively straight with only slight twisting, which is more pronounced in the case of **3**. Regular shape indicates that the fibers are formed by well-ordered molecular packing. The smallest fibers have an approximate width of 40 nm. The small fibers are layered together into thicker bundles of long fibers that have an approximate width of 0.3 μm. The regular shape and the extreme ratio between width and length in this system must arise from a strong anisotropic growth process resulting in the possible presence of 1-D or 2-D structures in the system.



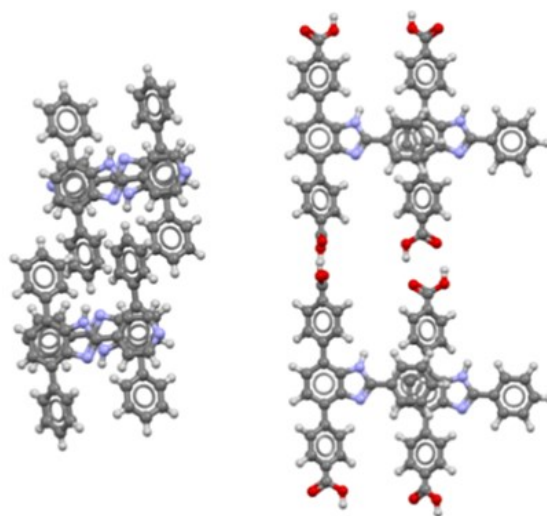
**Figure 3.6** : SEM images of hierarchically self-assembled gel microstructures (dried samples): a)  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  and b)  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$ .

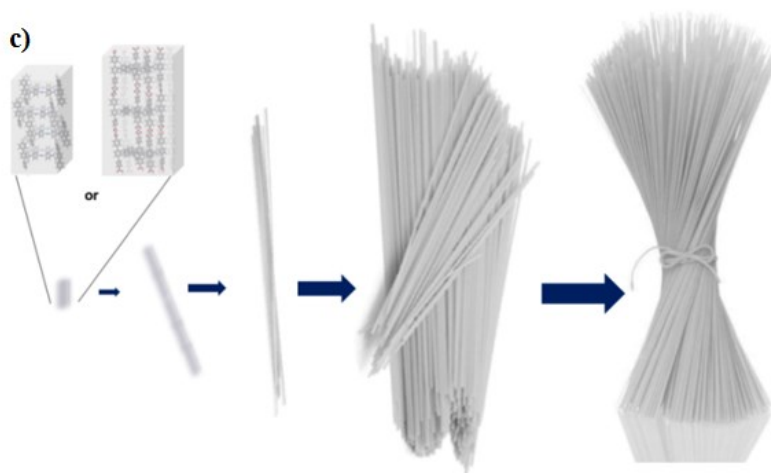
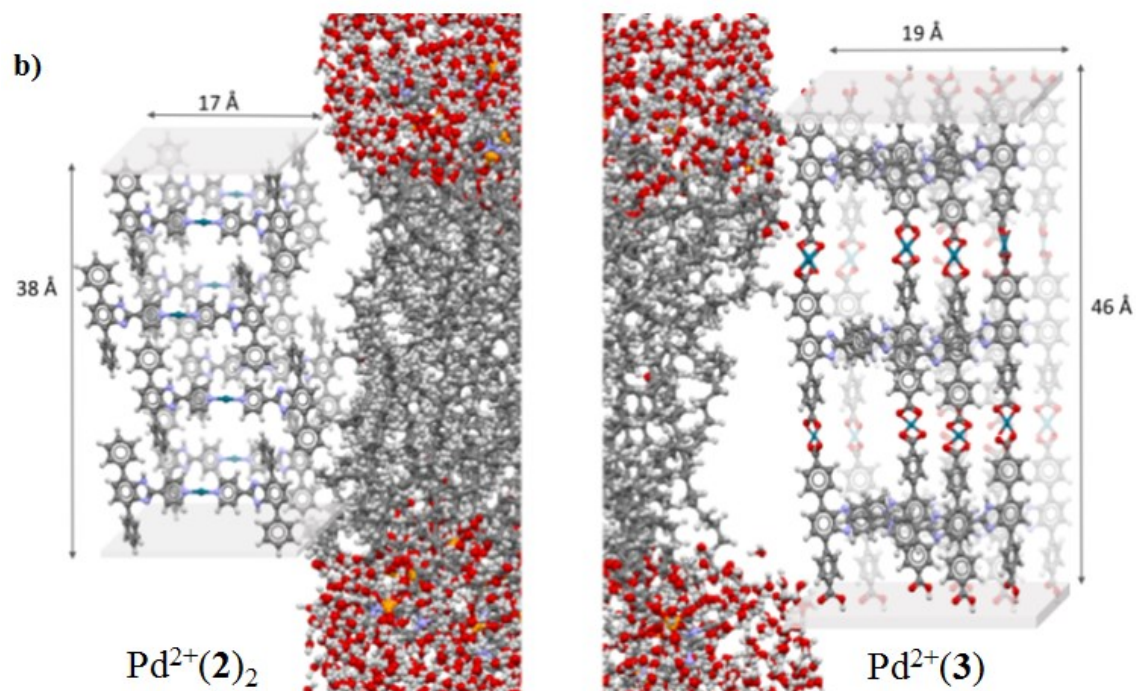
We previously reported the crystal structure of ligand **1**.<sup>29</sup> Unfortunately, crystals suitable for X-ray analysis were obtained only for ligand **2** by dissolving it in hot acetonitrile and subsequent slow evaporation of the solvent (see ESI). The supramolecular organization of **2** in the solid state reveals the formation of an aromatic channel, where the repeating unit is a dimer (Figure 3.7a). Starting with this structure, models were generated for the  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$ , **3** and  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  using the PM6/SCF-MO method (Figure 3.7a). In a second step, the energy minimized



$\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  and  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  complexes were placed in a phosphatidylcholine bilayer and a 200 ps molecular dynamics study was performed. As shown in Figure 3.7b, both resulting palladium complexes possess porous structures, compared to the self-assembly of the ligands alone. The  $\pi$ - $\pi$  interactions observed for **2** in the crystal are no more the governing interactions, but  $\text{CH}$ - $\pi$  interactions become the major interactions in the metal complexes. In the case of ligand **3**, oligomers are formed through the coordination of palladium to the carboxylic acids, compared to the complexed palladium on the pyridine groups in the case of **2**.  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  complex remains embedded in the hydrophobic part of the bilayer, while  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  complex spans the entire bilayer, with the carboxylic acids exposed to the hydrophilic portion of the phosphatidylcholine layer. Both palladium complexes form rectangular prism structures in the phospholipid bilayer by the self-assembly of several palladium dimers (in the case of **2**) or oligomers (in the case of **3**). Three monomers are required in the case of  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  to span the entire bilayer, while in the case of  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  four monomers self-assemble to form the length of the rectangular prism. These models can be used to interpret the observed self-association of  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  and  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  into long fibers and bundles. Importantly, the formation of these types of self-assembled structures can be seen as the type of organized repeating unit that have the potential to produce a gel (Figure 3.7c) and help to rationalize the self-association of metal-ligand assemblies in the polarized environment of the phospholipid bilayer.

a)





**Figure 3.7 :** Molecular modeling: a) PM6/SCF-MO optimized geometries of **2** and **3** in the gas phase. b) Palladium complexes  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  and  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  in an EYPC bilayer after a 200 ps molecular dynamics simulation. The resulting metal-ligand complexes were extracted from the phospholipid bilayer for clarity and only a partial view of the phospholipid is shown. c) Proposed hierarchical association in the gel.

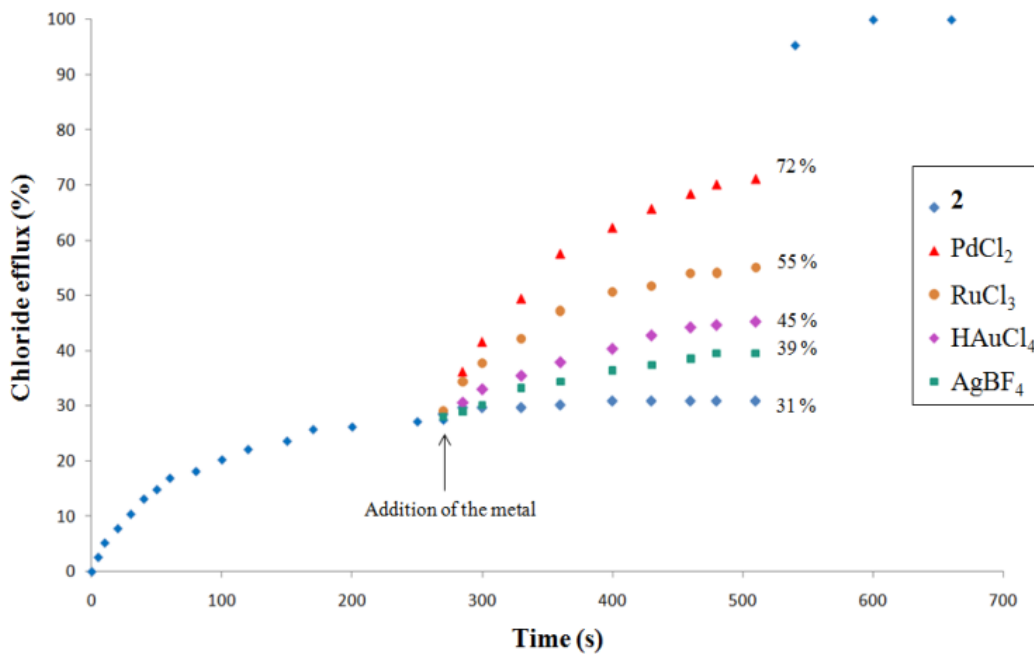
### 3.2.3.4 Chloride transport

Having previously reported the anionophoric properties of **1**,<sup>29</sup> we investigated the ability of **2**, **3** and their respective metal complexes to induce anion transport across a synthetic phospholipid membrane. Chloride transport studies were performed in the same EYPC large unilamellar liposomes (LUVs). The intravesicular solution of the liposomes was 5 mM phosphate buffer with 500 mM NaCl (pH = 7.2) and the chloride efflux mediated outside the liposomes was measured with a chloride-selective micro-electrode.

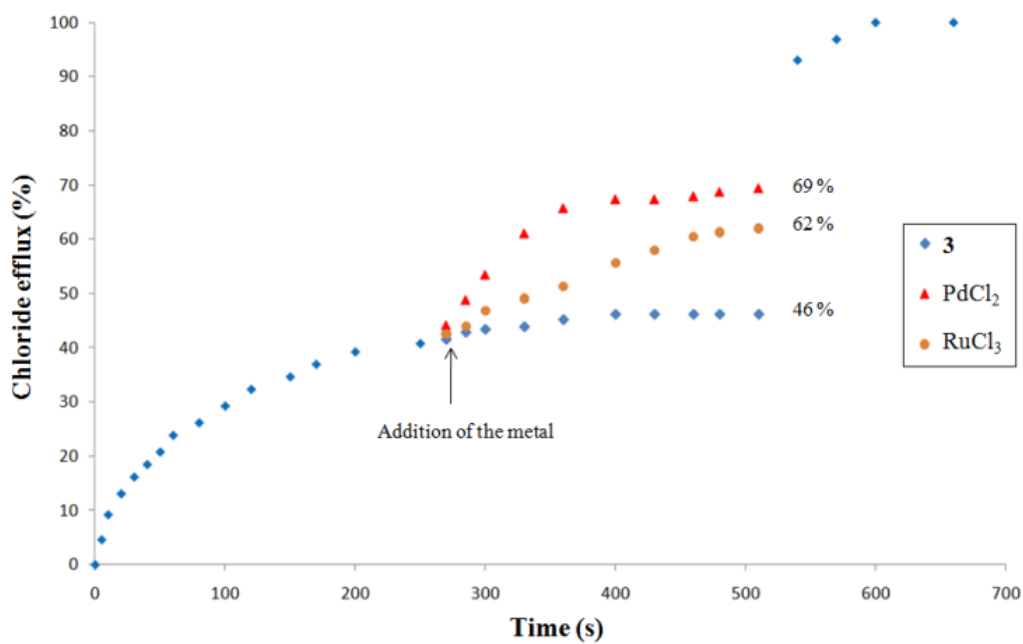
Kinetic experiments were carried out by varying the concentration of ligands from 2.5 mol% to 25 mol% relative to the EYPC concentration (5 mM). The quantity of chloride released in the extravesicular solution (5 mM phosphate buffer and 500 mM NaNO<sub>3</sub>, pH = 7.2) was directly correlated to the efficiency of the compound to mediate chloride transport. At the end of the experiment, a solution of Triton X was used to lyse the liposomes and record the maximum of chloride efflux. Based on these kinetic results, a Hill plot analysis was performed to determine the half-maximum effective concentration of the compounds after 500 seconds (EC<sub>50,500s</sub>) at 25 °C.

The structural modifications of the 2,4,7-triphenylbenzimidazole scaffold affected the transport efficiency, as the EC<sub>50,500s</sub> values were respectively 0.34 mM (6.9 mol% relative to EYPC concentration) for **1**, 1 mM (20.0 mol%) for **2** and 0.63 mM (12.6 mol%) for **3** (See ESI, Figures A2.14 – A2.19). If in the case of ligand **1**, addition of palladium did not induce any major change in the transport properties (see ESI Figure A2.20), however, a completely different scenario occurred when metals were added to ligands **2** and **3**. For example, the addition of 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> (relative to the concentration of **2**) at 270 s after the chloride efflux was initiated by **2**, resulted in the assembly of an active MOSTs in the phospholipid bilayer and an increase in transport efficiency.

a)



b)



**Figure 3.8** : a) Chloride efflux obtained after the addition of 0.5 equivalents of different metal sources (relative to the concentration of transporter) at 270 s in the presence of 12.5 mol% (relative to the EYPC concentration) of a) **2** and b) **3** in liposomes at 25 °C. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

Initially, metals (0.5 equivalents relative to **2**) that were previously used to perform UV-vis titrations were studied for their efficiency to form MOSTs in the phospholipid bilayer. An increase of chloride efflux was observed in presence of the Pd<sup>2+</sup> and Ru<sup>3+</sup>, compared to **2** alone. Although if HAuCl<sub>4</sub> and AgBF<sub>4</sub> were able to form a complex with **2** in apolar solvents, their solubility in the extravascular aqueous solution limited their insertion in the hydrophobic part of the phospholipid membrane and prevented the formation of the MOSTs. Consequently, only PdCl<sub>2</sub> and RuCl<sub>3</sub> were studied for further transport experiments.

The addition of the Pd<sup>2+</sup> and Ru<sup>3+</sup> to **3** resulted in the same increase of the chloride efflux rate, demonstrating the assembly of the MOSTs in the phospholipid bilayer (Figure 3.8). For both ligands, the most efficient MOSTs were assembled with palladium. Different amounts of PdCl<sub>2</sub> were added at 270 s during the chloride transport experiment in presence of the three ligands and the maximums of chloride efflux at 500 s are reported in Table 3.2.

**Table 3.2** : Chloride efflux at 500 s obtained after the addition of different concentrations of PdCl<sub>2</sub> at 270 s in presence of **1**, **2** and **3**.

<b>Ligand</b>	<b>No. of equiv. of PdCl<sub>2</sub></b> (added at 270 s)	<b>% Cl efflux</b> (measured at 500 s)
<b>1</b>	0	41
	0.5	50
	1	50
<b>2</b>	0	31
	0.25	53
	0.5	74
	1	75
<b>3</b>	0	41
	0.25	56
	0.5	69
	1	69

Addition of the metals alone only induced a slight chloride efflux (Figures A2.26 and A2.31). It is important to underline that the increase in chloride efflux is not due to the presence of a higher concentration of chloride (displaced from the palladium complex by the solvent), as only 0.015 mM chloride could be generated from 2.5 mM PdCl<sub>2</sub> (the highest concentration used), compared to the 500 mM NaCl present in the extravesicular solution.

No significant influence of the amount of Pd<sup>2+</sup> was observed in the case of **1**. A maximum of chloride efflux was obtained when 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> were added to ligand **2**, showing the formation of a 2:1 stoichiometry in the MOST. Addition of 1 equivalent of PdCl<sub>2</sub> to **3** (required to form the 1:1 complex previously observed by UV-vis) did not increase the chloride efflux, suggesting the formation of a 2:1 complex inside the phospholipid membrane. Consequently, the same experiment was repeated with RuCl<sub>3</sub> confirming the formation of the 2:1 metal-ligand assembly in the phospholipid membrane with **2** and **3** (see ESI, Figures A2.32 and A2.33). Thus, in the phospholipid membrane, only 0.5 equivalent of metal (Pd<sup>2+</sup> or Ru<sup>3+</sup>) is necessary to assemble active MOSTs. This result, put together with the molecular modeling results (where a 3:2 complex was formed in the phospholipid bilayer) and the adduct observed by mass spectrometry (Figure A2.13), suggests the formation of stable 2:1 complexes in solution and oligomers of higher stoichiometry in the phospholipid bilayer.

Additional kinetic experiments were carried out to extract the EC<sub>50,500s</sub> for each MOST. Transmembrane chloride transport was initiated by addition of **1**, **2** and **3** and 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> at 270 s. The maximum of chloride efflux obtained at 500 s was measured and a new Hill analysis was performed. The EC<sub>50,500s</sub> obtained for Pd(**1**), Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> and Pd<sup>2+</sup>(**3**) were respectively 0.35 mM (7.0 mol%), 0.47 mM (9.5 mol%) and 0.54 mM (10.9 mol%). The chloride efflux induced by Pd(**2**)<sub>2</sub> was increased from 31 to 75 %, while that induced by Pd<sup>2+</sup>(**3**) was increased only from 41 to 69 % (see ESI, Figures A2.20 – A2.25).

We also performed chloride transport experiments with the preformed metal-organic complex for ligands **2** and **3**. Complexes Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> and Pd<sup>2+</sup>(**3**) were initially prepared in methanol and added to the liposome solution. As shown in Table 3.3, the preformed complexes did not induce the same chloride efflux as the MOST assembled *in situ* in the phospholipid bilayer. This suggests that the preformed complexes are not stable in the

extravesicular aqueous solution, as the chloride efflux is very similar to that obtained with the ligand alone. To confirm this hypothesis, a new aliquot of 0.5 equivalent of PdCl<sub>2</sub> was added 270 s after the addition of the preformed Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub>. An increased chloride efflux was observed, reaching the same maximum as the previous ones, confirming that the initially preformed complex disassembles in aqueous media; the ligand alone permeates the bilayer and when additional PdCl<sub>2</sub> is added, the MOST is formed directly in the phospholipid bilayer.

We also confirmed by UV-vis spectroscopy that only 15 % of the preformed Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> penetrates the phospholipid bilayer. The entire formation of the complex can only be achieved through addition of another aliquot of PdCl<sub>2</sub> (see ESI Figure A2.10). An intermediate transport efficiency was obtained with the preformed Pd<sup>2+</sup>(**3**), which confirms its higher stability in aqueous media.

**Table 3.3** : Chloride efflux at 500s obtained for ligands **2**, **3** and their respective preformed complex Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> and Pd<sup>2+</sup>(**3**), with or without the addition of PdCl<sub>2</sub> at 270 s.

	% Cl <sup>-</sup> efflux (at 500 s)	
	Without PdCl <sub>2</sub>	Upon addition of 0.5 eq. of PdCl <sub>2</sub> at 270 s
<b>2</b>	30	74
Preformed Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub>	30	68
<b>3</b>	41	67
Preformed Pd <sup>2+</sup> ( <b>3</b> )	53	68

In order to determine the mechanism of the chloride efflux induced by the MOSTs, transport experiments were performed in 7/3 EYPC/cholesterol liposomes. Cholesterol rigidifies and orders the membrane by increasing the energy barrier of the movement of phospholipid inside the bilayer (rotation, lateral diffusion or phospholipid flip-flop).<sup>36</sup> In the case of a

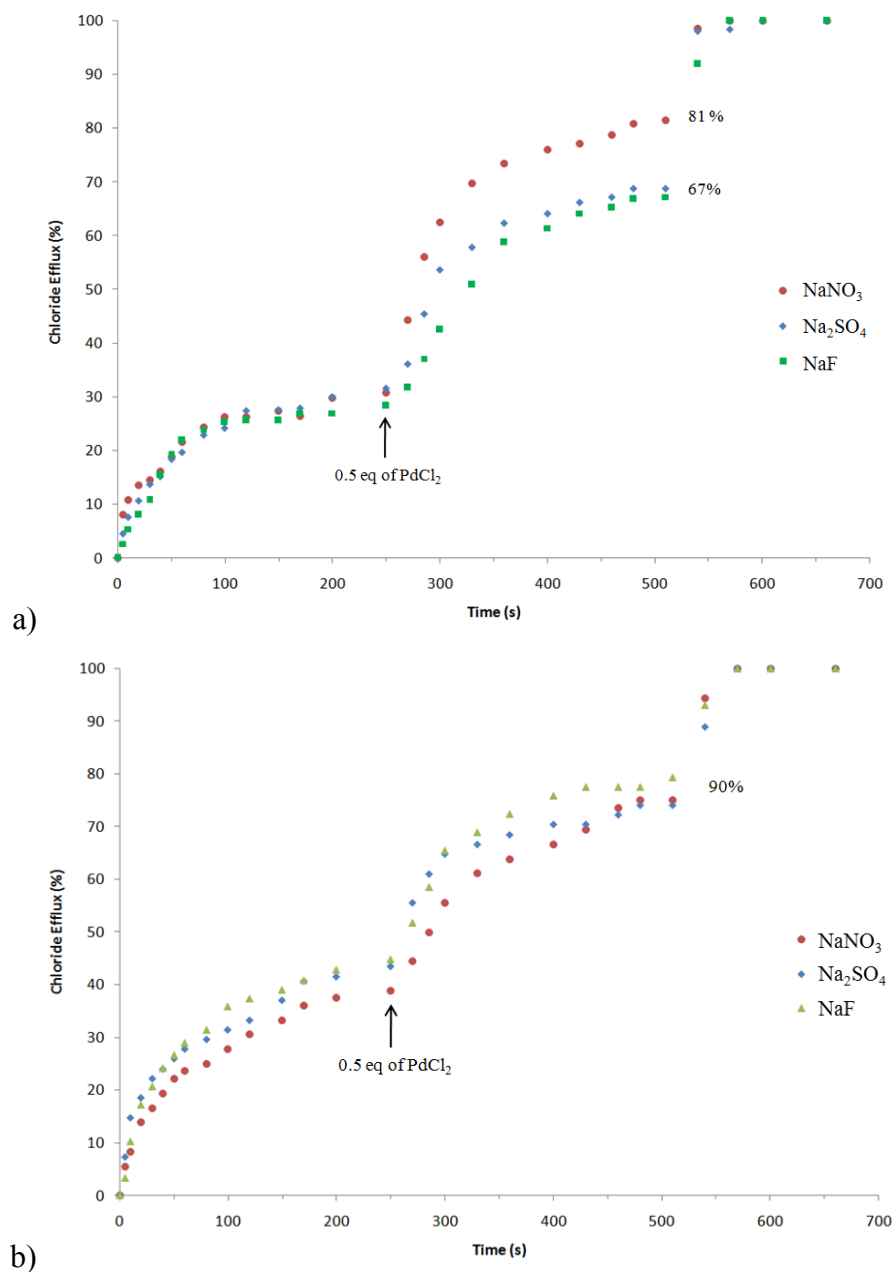
transmembrane channel, the transport efficiency is not influenced by the rigidity of the membrane, whereas the chloride efflux in the case of a mobile carrier is significantly reduced. The chloride efflux experimentally obtained in EYPC and EYPC/cholesterol liposomes are summarized in Table 3.4 (details and graphics for these experiments available in Figures A2.36 – A2.38). No drastic decrease of the chloride efflux was observed in the presence of cholesterol, suggesting the formation of porous transmembrane architectures for both ligands.

**Table 3.4** : Chloride efflux at 500 s obtained for transporter **1**, **2** and **3**, with or without addition of PdCl<sub>2</sub> at 270 s, in EYPC or EYPC/cholesterol liposomes.

<b>Ligand</b>	<b>No. of equiv. of PdCl<sub>2</sub></b>	<b>EYPC % Cl efflux (at 500 s)</b>	<b>EYPC / cholesterol % Cl efflux (at 500 s)</b>
<b>1</b>	-	41	40
	0.5	50	40
<b>2</b>	-	30	30
	0.5	74	60
<b>3</b>	-	41	42
	0.5	67	64

A slight decrease of the chloride efflux efficiency in the EYPC/cholesterol liposomes for the metal assemblies was observed and may be associated to the dynamics of the self-assembly of the MOST. Indeed, the ligands may have reduced mobility inside this rigidified membrane, which may slow down the self-association process and thus, the chloride transport.





**Figure 3.9 :** Chloride efflux obtained after the addition of 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> (relative to the concentration of the transporter) at 270 s in the presence of 12.5 mol% (relative to the EYPC concentration) of a) **2** or b) **3** in liposomes bathing in different phosphate buffer at 25 °C. (5 mM phosphate salt (pH = 7.2) with 500 mM NaX (X= NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup>) or 250 mM Na<sub>2</sub>X (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)). Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

The anion selectivity of the MOST was also investigated. Chloride transport was conducted in presence of different external buffer solutions. The external nitrate ion was replaced by fluoride and sulfate. The size and the hydrophilicity of the external anions had no influence on the chloride efflux in the presence of Pd<sup>2+</sup>(**3**) MOST, suggesting that a symport Cl<sup>-</sup>/cation<sup>+</sup> mechanism was dominant. However, the symport Cl<sup>-</sup>/cation<sup>+</sup> and the antiport Cl<sup>-</sup>/anion<sup>-</sup> probably occurs at the same time for Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> which saw its efficiency slightly reduced in presence of fluoride and sulfate (Figure 3.9).

The formation of MOST in the phospholipid membrane to ensure anion transport is an important finding and our hypothesis was that a MOST could also disrupt ion homeostasis in living organisms. As we previously reported that benzimidazolium transmembrane transporters possess antimicrobials properties,<sup>37</sup> the toxicity of the MOST to Gram-positive wild-type and tetracycline-resistant bacteria was investigated. Our hypothesis was that if MOST can be formed in the bacterial membranes and they possess a porous structure, they could act as the hydraphiles reported by Gokel *et al.*<sup>38</sup>, making the bacterial membrane more permeable to ions and antibiotics.

### 3.2.3.5 Antimicrobial activity

The bacterial membrane is a complex environment containing different proteins and a peptidoglycan layer in addition to the phospholipid bilayer.<sup>39</sup> The ability of a synthetic compound to penetrate the artificial phospholipid membrane of a liposome and the one of living bacteria can be very different.

The formation of MOSTs in complex bacterial membranes, their ability to disrupt ion homeostasis and the affect on the survival rate of living bacteria was investigated. We first determined the minimum inhibitory concentration (MIC) for ligands **1**, **2** and **3** alone in Gram-positive wild-type *Bacillus thuringiensis* (HD73) (Table 3.5).

The first observation that can be made from this study is that the efficiency of the different ligands to transport chloride in liposomes (EC<sub>50</sub>) cannot be correlated to their ability

to kill Gram-positive *Bacillus thuringiensis*. Ligand **3** is the only one possessing a MIC of 35 - 40  $\mu\text{M}$  against *Bacillus thuringiensis*. These experiments were also performed with the preformed complex  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  and  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$ , but no difference was noted in terms of MIC values. These results were not surprising, since we previously demonstrated that the metal-ligand complexes were not stable in aqueous environment. However, if 0.5 equivalent of  $\text{PdCl}_2$  (relative to the ligand concentration) was added after 1 h of incubation of the bacteria with the ligand **3**, the MIC of  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  complex was reduced 2-fold. This result demonstrates the formation of the MOST in the bacterial membrane and its capacity to alter its permeability.

**Table 3.5 :** Antibacterial activity (MIC) and chloride transport efficacy ( $\text{EC}_{50,500\text{s}}$ ) of **1**, **2** and **3**.

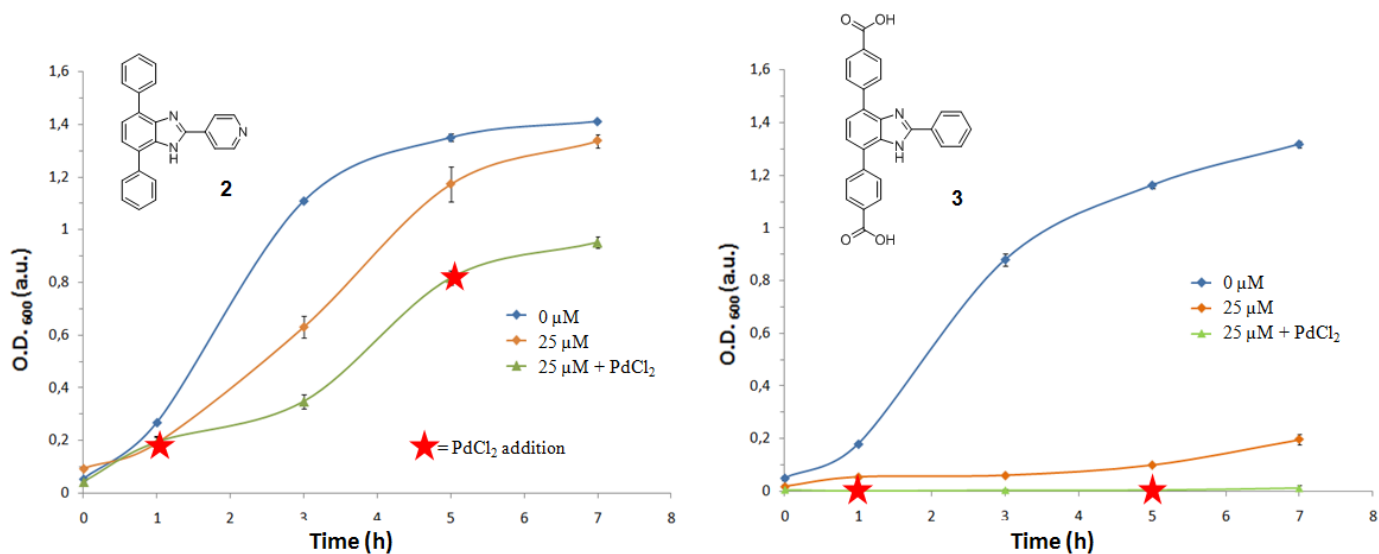
Ligand	No. of equiv. of $\text{PdCl}_2$ *	Bacteria <i>B. thuringiensis</i> MIC ( $\mu\text{M}$ )**	Liposomes $\text{EC}_{50,500\text{s}}$ (mol %)
<b>1</b>	-	> 100	6.9
	0.5	> 100	7.0
<b>2</b>	-	> 100	20.0
	0.5	> 100	9.5
<b>3</b>	-	35 - 40	12.6
	0.5	15 - 20	10.9

\* $\text{PdCl}_2$  was not toxic even at 100  $\mu\text{M}$  (Figure A2.41)

\*\*100  $\mu\text{M}$  was the limit of solubility in the bacterial growth media

Intrigued by the lack of antibacterial activity of **2** and its  $\text{Pd}^{2+}$  complex after 24 hours of incubation, we performed a kinetic experiment on the bacterial growth (Figure 3.10). Addition of 0.5 equivalent of  $\text{PdCl}_2$  to 25  $\mu\text{M}$  of **2** results in an increase of the doubling time from  $82 \pm 1$  min to  $234 \pm 1$  min in the first two hours. However, in the following two hours the doubling time decreases to  $77 \pm 1$  min, showing the disassembly of the metal-ligand complex. A more pronounced effect can be observed after the addition of the second aliquot of  $\text{PdCl}_2$ , when a doubling time of  $269 \pm 1$  min was observed. However, after 24 h of incubation,

the global bacterial growth was not affected by the presence of **2** and Pd<sup>2+</sup> in solution. These kinetic experiments suggest that the Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> MOST forms rapidly in the bacterial membrane but is not stable enough to persist and function over a long period of time.



<b>2</b> (μM)	Doubling Time G (min) 1-3 h	Doubling Time G (min) 3-5 h	Doubling Time G (min) 5-7 h
0	43 ± 1	141 ± 10	nd
25	82 ± 1	66 ± 10	235 ± 2
25 + PdCl <sub>2</sub>	234 ± 1	77 ± 10	269 ± 1

<b>3</b> (μM)	Doubling Time G (min) 1-3 h	Doubling Time G (min) 3-5 h	Doubling Time G (min) 5-7 h
0	52 ± 0.5	129 ± 10	nd
25	1602 ± 100	922 ± 40	376 ± 50
25 + PdCl <sub>2</sub>	1527 ± 200	1748 ± 300	>100000

**Figure 3.10** : Optical density of *Bacillus thuringiensis* obtained after several hours of incubation with different concentration of **2** and **3**. On the right, 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> (relative to the ligand concentration) were added after 1h and 5h of incubation of the ligand with bacteria. Doubling time G was defined as the time taken by bacteria to double in number during the exponential phase.  $G = t / (3.3 \log b / B)$  with  $t$  = time interval in minutes,  $b$  = number of bacteria at the end of the time interval and  $B$  = number of bacteria at the beginning of the time interval.<sup>40</sup>

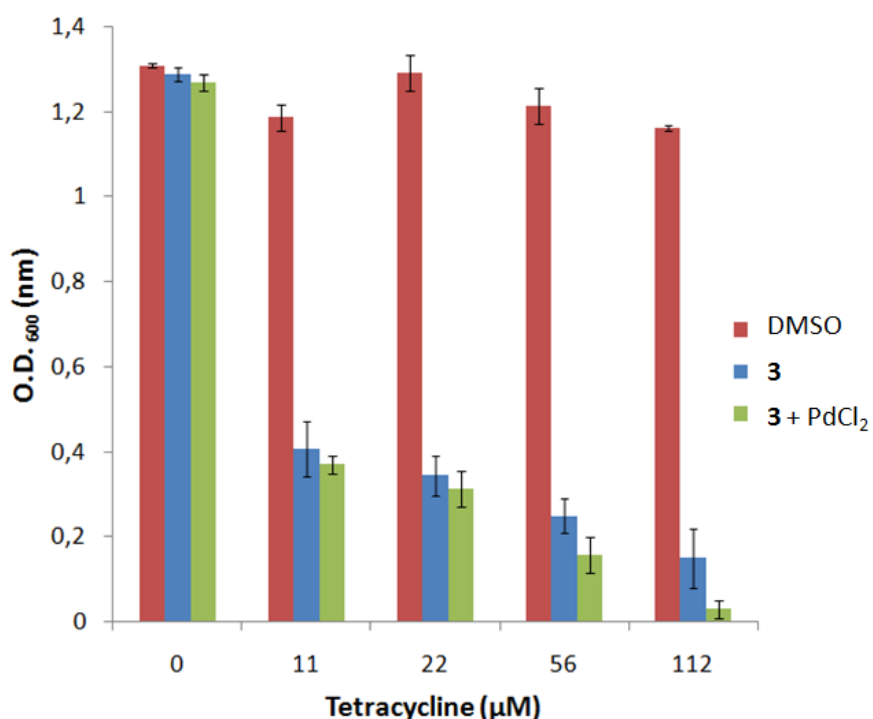
The higher stability of the Pd<sup>2+</sup>(**3**) compared to Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> can also be inferred from these experiments, as a notable difference in the doubling time can be observed upon the addition of the first aliquot of PdCl<sub>2</sub> to **3**. In the case of ligand **3** alone, the bacterial growth reached its maximum after 24 hours of incubation, but a complete inhibition of the bacterial growth was observed with the Pd<sup>2+</sup>(**3**) complex.

Antibiotic resistance has become a major problem in the treatment of Gram-positive bacterial infections.<sup>41</sup> These organisms are able to escape antibiotic activity through several mechanisms including β-lactamase production, altered penicillin-binding proteins, aminoglycoside-modifying enzymes, modification of the target site of the antibiotic and active efflux.<sup>41, 42</sup> Therapeutic strategies to kill these resistant Gram-positive bacteria include the use of a higher antibiotic dosage, the use of alternative, non-conventional drugs, alone or in combination and the development of new drugs.<sup>43</sup> Bacteria use natural efflux pumps to eject foreign substances such as antibiotics. Based on the ability of the MOST to open pores through the membrane we thought interesting to exploit the possibility to facilitate the passage of small antibiotic molecules in the porous architectures they form in the bacterial membrane. To mimic a resistant strain, we used a *B. thuringiensis* tetracycline-resistant strain, possessing a plasmid that expresses an efflux pump in the bacterial membrane that limits the access of tetracycline to the ribosome.<sup>42</sup> The presence of this plasmid confers a resistance to tetracycline up to 670 μM (See ESI, Figure A2.47).

Firstly, we determined that **3** and MOST Pd<sup>2+</sup>(**3**) at 25 μM were non-toxic to this strain (Figure 3.11). As a reminder, at the same concentration, both **3** and MOST Pd<sup>2+</sup>(**3**) were toxic to the wild-type *B. thuringiensis*, but the presence of the efflux pump may affect their capacity to stay into the bacterial membrane after 24 h. Bacterial growth was monitored in the presence of **3** and Pd<sup>2+</sup>(**3**) MOST at 25 μM in the presence of different tetracycline concentrations, below the MIC (670 μM). For each tetracycline concentration, a blank with only DMSO was performed to confirm the bacterial growth under these conditions.

As shown in Figure 3.11, the presence of **3** and Pd<sup>2+</sup>(**3**) MOST decreased the tolerance of these resistant bacteria to tetracycline. Pd<sup>2+</sup>(**3**) MOST appears to be more effective than **3**, inhibiting the bacterial growth at lower concentrations of tetracycline (Figure 3.11). Even at

11  $\mu\text{M}$  tetracycline (60-fold lower than the MIC), the bacterial growth rate is surprisingly reduced. The combination of 25  $\mu\text{M}$  of  $\text{Pd}^{2+}$ (**3**) MOST and tetracycline (110  $\mu\text{M}$ ) completely inhibits the bacterial growth, whereas the same concentrations of tetracycline alone have no influence on the bacterial growth of this resistant strain. It may be that formation of the  $\text{Pd}^{2+}$ (**3**) MOST in the bacterial membrane may compensate for the tetracycline efflux induced by the pump, allowing a faster influx or an increased amount of tetracycline into the bacteria. This also suggests that MOSTs possess a porous architecture, as tetracycline, which is much larger than chloride, can be transported into bacteria. This result points to a synergy between MOST and tetracycline, demonstrating the importance and potential application of MOST as a strategy to fight resistant bacteria.



**Figure 3.11** : Tetracycline-resistant *Bacillus thuringiensis* growth in presence of 5  $\mu\text{l}$  DMSO (used as a blank to monitor the effect of the DMSO on the bacterial growth) or 25  $\mu\text{M}$  of **3** (5  $\mu\text{l}$  in DMSO). The  $\text{PdCl}_2$  aliquot (2.5  $\mu\text{l}$  in DMSO) was added after 1 h of incubation with **3**. Maximum of bacteria growth was measured after 24 h of incubation at 37  $^\circ\text{C}$ .

### 3.2.4 Conclusion

We have successfully synthesized two 2,4,7-triphenylbenzimidazole derivatives and demonstrated the formation of their respective metal assemblies in phospholipid membranes. Anion transport experiments performed with these ligands and their metal complexes allowed us to show their efficiency as chloride transporters in liposomes. The formation of MOST Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> and Pd<sup>2+</sup>(**3**) in the phospholipid membrane results in efficient assemblies in terms of chloride transport. We also demonstrated the insertion of the ligands and formation of their metal-organic assembly in complex bacterial membranes and successfully applied MOST to make bacterial membrane more permeable to antibiotics. Finally, as a potential strategy to combat resistant bacteria, we showed that a combination of **3** and Pd<sup>2+</sup>(**3**) with tetracycline lowers the sensitivity of resistant bacteria to tetracycline by 60-fold. Work is in progress in our group to demonstrate the generality and the therapeutic interest to use MOST in pathologically relevant resistant strains.

### 3.2.5 Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQ-NT) and the Université de Montréal for the financial support. We also thank Le Centre Régional de RMN and Le Centre Régional de Spectrométrie de masse of the Université de Montréal. We thank prof. J.N. Pelletier for access to instruments in her laboratory and helpful discussion of this manuscript.

### 3.2.6 Notes and References

<sup>a</sup> Département de Chimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. E-mail: ar.schmitzer@umontreal.ca

† Electronic Supplementary Information (ESI) available:

1. G. Ferey, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 191.
2. J. R. Long and O. M. Yaghi, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1213.
3. L. J. Murray, M. Dinca and J. R. Long, *Chem.Soc.Rev.*, **2009**, *38*, 1294.
4. R. E. Morris and P. S. Wheatley, *Angew. Chem.*, **2008**, *47*, 4966.
5. P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P. K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Ferey, R. E. Morris and C. Serre, *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 1232.
6. P. Horcajada, C. Serre, M. Vallet-Regi, M. Sebban, F. Taulelle and G. Ferey, *Angew. Chem.*, **2006**, *45*, 5974.
7. N. Ahmad, H. A. Younus, A. H. Chughtai and F. Verpoort, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 9.
8. E. Gouaux and R. Mackinnon, *Science*, **2005**, *310*, 1461.
9. P. A. Gale, N. Busschaert, C. J. E. Haynes, L. E. Karagiannidis and I. L. Kirby, *Chem.Soc.Rev.*, **2014**, *43*, 205.
10. N. Busschaert, C. Caltagirone, W. Van Rossom and P. A. Gale, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 8038.
11. N. Sakai and S. Matile, *Langmuir*, **2013**, *29*.
12. S. Matile, A. Vargas Jentzsch, J. Montenegro and A. Fin, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 2453.
13. T. Saha, S. Dasari, D. Tewari, A. Prathap, K. M. Sureshan, A. K. Bera, A. Mukherjee and P. Talukdar, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 14128.
14. M. G. Fisher, P. A. Gale, M. E. Light and S. J. Loeb, *Chem. Commun*, **2008**, 5695.
15. C. R. Bondy, P. A. Gale and S. J. Loeb, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5030.
16. S. Ma, M. M. Smulders, Y. R. Hristova, J. K. Clegg, T. K. Ronson, S. Zarra and J. R. Nitschke, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 5678.
17. O. V. Kulikov, R. Li and G. W. Gokel, *Angew. Chem*, **2009**, *48*, 375.
18. M. Jung, H. Kim, K. Baek and K. Kim, *Angew. Chem.*, **2008**, *47*, 5755.
19. M. Boccalon, E. Iengo and P. Tecilla, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 20310.
20. F. De Riccardis, I. Izzo, D. Montesarchio and P. Tecilla, *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 2781.
21. U. Devi, J. R. Brown, A. Almond and S. J. Webb, *Langmuir*, **2011**, *27*, 1448.



22. A. Satake, M. Yamamura, M. Oda and Y. Kobuke, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6314.
23. T. M. Fyles and C. C. Tong, *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 655.
24. C. P. Wilson and S. J. Webb, *Chem. Commun*, **2008**, 4007.
25. C. P. Wilson, C. Boglio, L. Ma, S. L. Cockcroft and S. J. Webb, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 3465.
26. C. Janiak, *Dalton Trans.*, **2003**, 2781.
27. G. A. Santillan and C. J. Carrano, *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 930.
28. M. Eddaoudi, D. B. Moler, H. Li, B. Chen, T. M. Reineke, M. O'Keeffe and O. M. Yaghi, *Acc. Chem. Res*, **2001**, *34*, 319.
29. J. Kempf, N. Noujeim and A. R. Schmitzer, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 42293.
30. S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi and M. A. Zoroddu, *Coord. Chem. Rev.*, **2015**, *284*, 329.
31. N. Noujeim, K. Zhu, V. N. Vukotic and S. J. Loeb, *Org. Lett.*, **2012**, 2484.
32. K. Zhu, C. A. O'Keefe, V. N. Vukotic, R. W. Schurko and S. J. Loeb, *Nat. Chem.*, **2015**, *7*, 514.
33. N. Şireci, Ü. Yilmaz, H. Küçükbay, M. Akkurt, Z. Baktir, S. Türktekin and O. Büyükgüngör, *J. Coord. Chem.*, **2011**, *64*, 1894.
34. A. Krogul, J. Cedrowski, K. Wiktorska, W. P. Ozimiński, J. Skupińska and G. Litwinienko, *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 658.
35. D. Ray, J. T. Foy, R. P. Hughes and I. Aprahamian, *Nat Chem.*, **2012**, *4*, 757.
36. M. R. Krause and S. L. Regen, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 3512.
37. C. R. Elie, G. David and A. R. Schmitzer, *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 2358.
38. J. L. Atkins, M. B. Patel, Z. Cusumano and G. W. Gokel, *Chem. Commun*, **2010**, *46*, 8166.
39. N. Malanovic and K. Lohner, *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, *5*, 936
40. T. J. Daskivich, M. M. Regan and W. K. Oh, *J. Urol.*, **2006**, *176*, 1927.
41. E. Bouza and R. Finch, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2012**, *7*, 3.
42. B. S. Speer, N. B. Shoemaker and A. A. Salyers, *Clin. Microbio. Rev.*, **1992**, *5*, 387.
43. J. M. Rybak, K. E. Barber and M. J. Rybak, *Exp. Op. Pharma.*, **2013**, *14*, 1919.

**Chapitre 4 : Axe et dimère parapluie : études de leurs propriétés de transport transmembranaire et de leurs applications biologiques.**

## 4.1 Préface

Durant son doctorat dans le groupe Schmitzer, Christine Chhun a conçu et synthétisé plusieurs axes et rotaxanes parapluie. Les premières bases du transport d'ions chlorures et de macrocycle *via* l'utilisation de ces rotaxanes parapluie ont alors été démontrées. Le relargage de la roue *via* digestion enzymatique par la chymotrypsine est venu conclure ses 4 années de recherche. Avec tous ces résultats à notre disposition, le design d'une structure capable de transporter des macrocycles biologiquement actif a été pensé. L'objectif de transporter ces macrocycles actifs à travers la membrane nécessitait une modification de son axe parapluie afin de permettre l'insertion de la roue avant son « *capping* » autour de l'axe. L'idée de dimériser l'axe et de bloquer simultanément deux roues pour former un [3]-rotaxane nous a semblé la méthode la plus appropriée. Cela permettait également de limiter le nombre d'étapes de synthèse menant à cet imposant assemblage enchevêtré.

Ainsi, ce chapitre s'attardera sur la synthèse et la caractérisation d'un axe parapluie comportant une oléfine terminale, ainsi qu'à la formation du dimère correspondant *via* un couplage par métathèse. Par la suite, les propriétés de transport anionique de l'axe et son dimère ont été déterminé grâce aux tests dans des liposomes qui ont également permis de vérifier l'intégrité de la membrane en présence de ces larges molécules. La sélectivité ionique et le mécanisme de transport des molécules sont également discutés. Finalement, les premiers tests biologiques de l'axe et du dimère parapluie dans des bactéries à Gram-positifs (*Bacillus thurigiensis*) et à Gram-négatifs (*Escherichia coli*) seront présentés.

J'ai réalisé l'ensemble des synthèses et analyses présentes dans cet article, ainsi que la première version du manuscrit. La supervision du projet ainsi que la révision finale de l'article ont été réalisées par Pr. Andreea R. Schmitzer.

Les informations supplémentaires de ce chapitre se trouvent aux pages 214 - 232 de cette thèse.

## 4.2 Article 3 : Membrane active cationic cholic acid-based molecular umbrellas

Julie Kempf and Andreea R.Schmitzer

Département of Chemistry, Université de Montréal, C.P 6128 Succursale Centre-ville,  
Montréal, Québec, H3C 3J4, Canada

*RSC Advances*, **2016**, *6*, 42713-42719

Reprinted with minor corrections, with permission from RSC Advances, Julie Kempf and Andreea Schmitzer, « Membrane active cationic cholic acid-based molecular umbrellas », **2016**, *6*, 42713-42719. Copyright (2016) Royal Society of Chemistry.

### 4.2.1 Abstract

Herein, we report the synthesis of an umbrella thread and its covalent dimer and their transmembrane transport properties under physiological conditions. The anion selectivity and the transport mechanism of the two compounds are discussed, as well as their interaction with microbial membranes. All the transport results indicate the formation of pores inside the phospholipid membranes. Both umbrella compounds principally favor the anion exchange across the membrane but the umbrella monomer (**UM**) and its self-assembled dimer (**UD**) formed in the bilayer are more sensitive to the hydrophilicity of the transported anion and favor the HCl co-transport in the presence of bicarbonate. The dimeric species **UD** shows a significant  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  antiport process. This anion selectivity between the two umbrella compounds is an important finding and can be exploited for biological applications.

### 4.2.2 Introduction

The cell membrane, composed mainly of phospholipids, is an effective, but yet complex barrier that controls the passage of molecules into or out of a cell. Some neutral compounds such as water or carbon dioxide can easily pass through the phospholipid bilayer, whereas ions and polar solutes are repelled.<sup>1</sup> In order to ensure the correct regulation of ions concentration inside and outside the cell, transmembrane proteins present in the cellular membranes transport ions like chloride or potassium, in very specific and regulated processes. Missing or defective ion channels generate serious diseases called channelopathies and the cystic fibrosis is the most eloquent example of too few open chloride channels in the cellular membrane.<sup>2</sup> In systematic efforts to develop strategies to fight these channelopathies, many research groups had focused their efforts on developing synthetic molecules and systems able to compensate the dysfunction of transmembrane proteins.<sup>3-9</sup> For example, Gale et al. developed (thio)ureas based anion transporters exhibiting strong binding affinity for chloride.<sup>10-13</sup> They reported that the lipophilicity of the substituents on the (thio)urea scaffold was essential for the transporter to penetrate into the phospholipid bilayer and induce chloride transport via a carrier mechanism.<sup>13</sup> On the other hand, Regen's group has extensively studied the cholic acid-based « molecular umbrellas » for the transport of hydrophilic

ions and molecules.<sup>14-16</sup> Depending on the polarity of the media, molecular umbrellas can adopt two different conformations where different parts of the system are exposed to the solvent. Furthermore, Savage et al. has investigated the antimicrobials activity of different ceragenins, which are cationic steroids composed of a sterol backbone functionalized with different substituents, like amino acids or guanidine groups.<sup>17-19</sup> More recently, Chen et al. reported a new family of anion transporters which activity was based on the amphomorphism of the cholic acid. Their systems composed of two steroid moieties functionalized with amino, guanidino or squaramide groups, were able to promote chloride transmembrane transport via a cation/anion symport process.<sup>20-22</sup>

Our group has extensively studied imidazolium<sup>23, 24</sup> and benzimidazolium<sup>25, 26</sup> cations in the transport of chloride across phospholipid membranes and demonstrated the antibacterial applications of these anion transporters. However, other anions possess a key role in mammalian physiology. Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) is one of the most important inorganic anions present in living systems<sup>4</sup> that is essential for many biological processes, such as the regulation of the intracellular pH,<sup>27</sup> the maintenance of the cell volume and respiration.<sup>28, 29</sup> The dysfunction of bicarbonate transporters is involved in many diseases, such as renal tubular acidosis, kidney diseases or cardiac ischemia.<sup>30</sup> Because the bicarbonate is less polarizable, larger and more hydrophilic than the chloride, its transport across phospholipid membranes is more difficult than the chloride and usually occurs *via* a  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  antiport process in biological systems. The development of a synthetic system that can mimic a natural transmembrane protein allowing  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  antiport is still a challenge. In the last years, Davis *et al.* demonstrated that ceramides were good candidates to mediate  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  antiport transport across phospholipid membranes.<sup>31</sup>

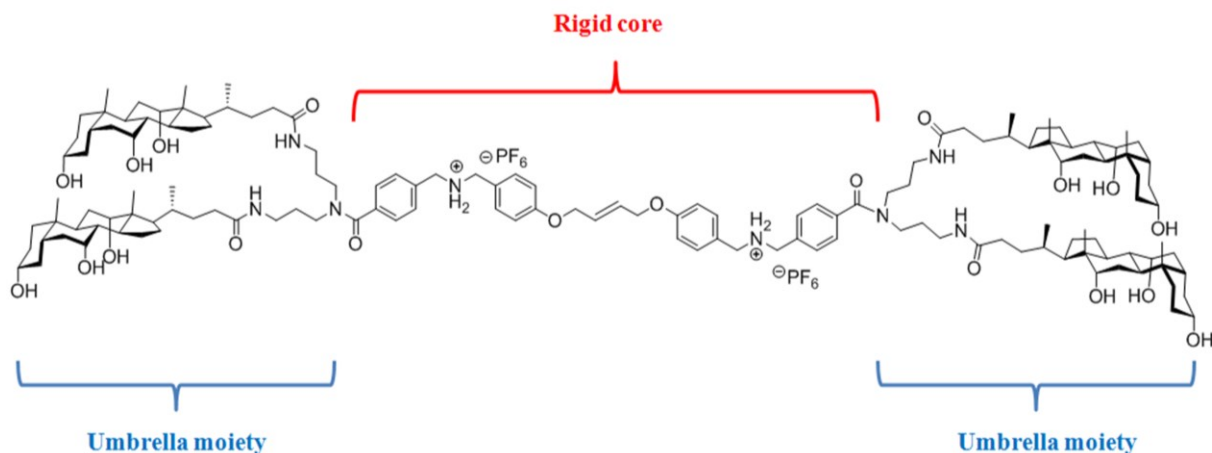
We previously reported an umbrella thread with transmembrane chloride transport properties, its incorporation into a [2]-rotaxane and its capacity to transport small cyclic hydrophilic molecules across phospholipid bilayers.<sup>32</sup> We had demonstrated the amphomorphism of this umbrella thread and its self-assembly in bilayers and validated their ability to penetrate and span phospholipid bilayers. We pursued the study of this system by designing a longer umbrella thread that can span the entire phospholipid bilayer, possessing

two umbrellas at each extremity. Moreover, this thread can be used to assemble [3]-rotaxanes by complexation of cyclic molecules around the two secondary ammonium sites. We present here the synthesis of a new umbrella thread and its covalent dimer. The transport properties of the umbrella monomer and dimer under physiological conditions were investigated. The anions selectivity and the transport mechanism of the two compounds are discussed here. Finally, the antimicrobial properties towards Gram-positive and Gram-negative bacteria are reported.

## **4.2.3 Results and discussion**

### **4.2.3.1 Design**

We previously reported the self-association of an umbrella thread inside phospholipid membranes and the formation of a dimeric channel spanning the membrane from one side to the other one. We proposed that inside this channel, anions can pass through by a succession of anion/cation or anion/ $\pi$  interactions with the umbrella thread.<sup>33</sup> In order to obtain an umbrella thread that spans the entire phospholipid bilayer, we designed an umbrella monomer that can be used in the synthesis of a homodimer thread by metathesis. The benzyl group used previously to protect the phenol group was replaced by a terminal olefin. As shown in the Figure 4.1, the umbrella thread is composed of a rigid core possessing two secondary ammonium sites and two umbrella extremities formed by four cholic acids, to favour its insertion into a phospholipid bilayer.



**Figure 4.1** : Structure of the umbrella dimer **UD**.

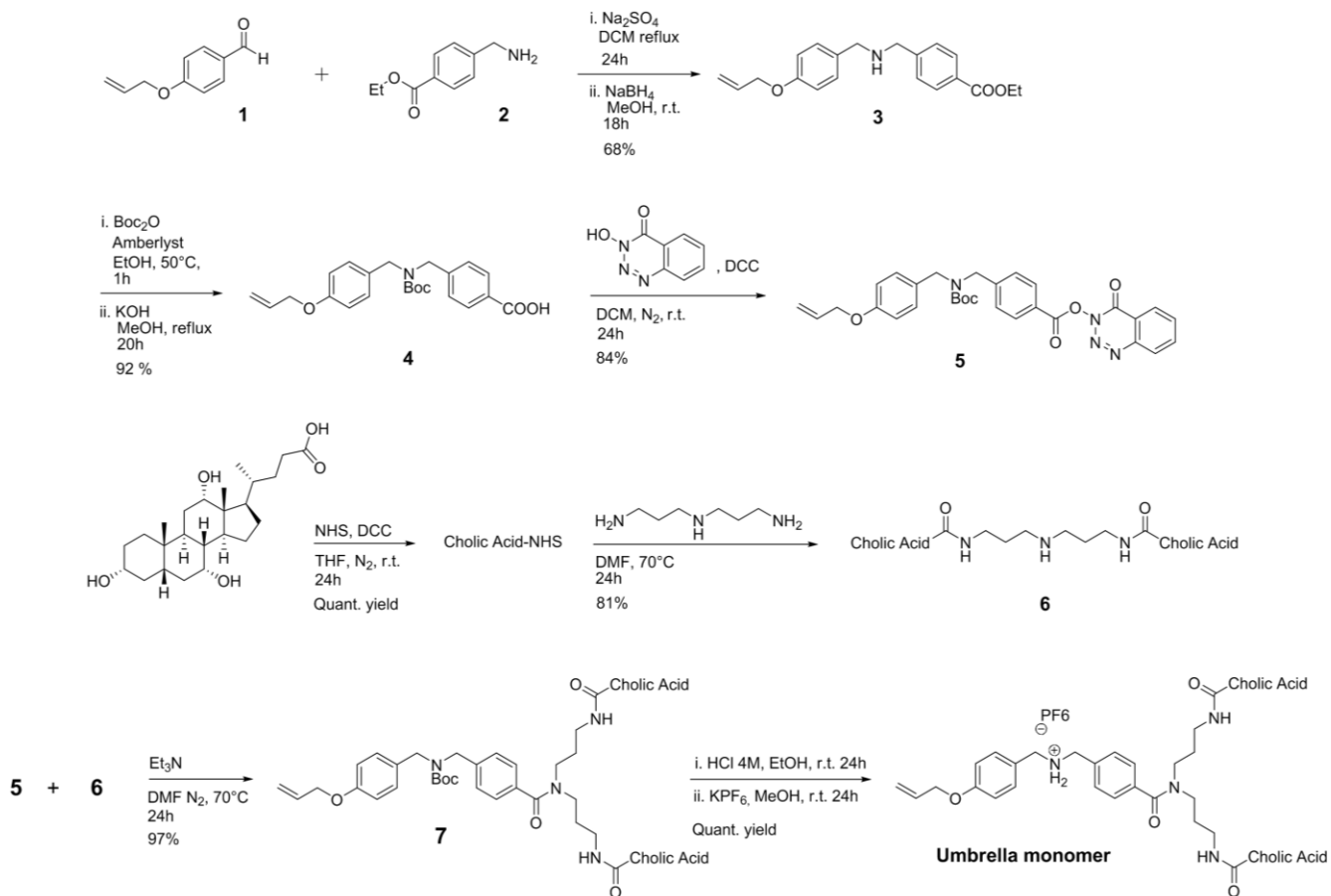
#### 4.2.3.2 Synthesis

The synthesis of the umbrella thread was based on our previously reported procedure.<sup>32</sup> The 4-(allyloxy)benzaldehyde **1** and the 4-aminobenzoate **2** were condensed to give the first moiety of the thread **3**. The secondary amine group was then protected with a N-Boc group and the ester moiety was hydrolyzed to obtain compound **4**. Only the use of HOObt as coupling agent allowed the coupling between **4** and **6** to give compound **7** (DCC and EDC were also tested), which was deprotected in acidic conditions before the anion metathesis step, yielding to the umbrella monomer (**UM**). The overall yield for the synthesis of **UM** after 11 steps was 25%, which represents a significant increase over the one we previously reported<sup>32</sup> (Scheme 4.1).

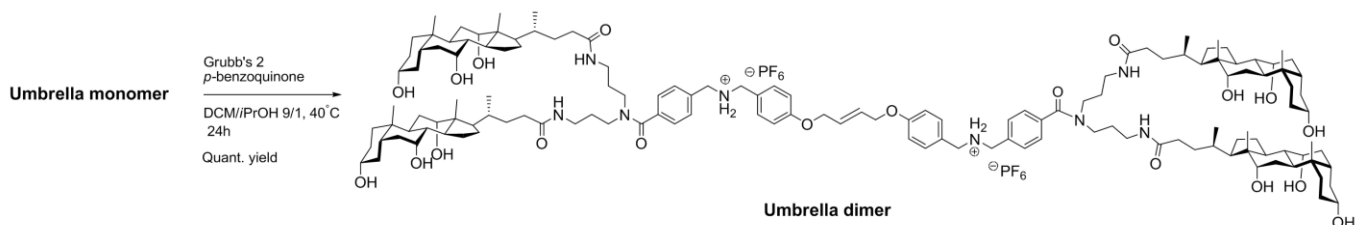
The synthesis of the umbrella dimer (**UD**) was accomplished between two equivalents of **UM** in the presence of the Grubbs' 2<sup>nd</sup> generation catalyst<sup>34</sup> (Scheme 4.2). The use of an alcohol as solvent was necessary for the solubilization of **UM**, but a polar solvent, associated with a high reaction temperature, led often to the decomposition of the catalyst.<sup>35</sup> The ruthenium hydride complex formed in these conditions can also be responsible for the isomerization of the double bond. To prevent this olefin isomerization, as suggested by Grubbs *et al*, we used an electron deficient *p*-benzoquinone as additive in catalytic amount.<sup>36</sup>



The terminal allyl ether group on **UM** is a type I olefin that undergoes rapid homo-dimerization<sup>37</sup>, producing ethylene that can be easily removed under vacuum.



**Scheme 4.1 :** Multistep synthesis of the Umbrella Monomer **UM**.

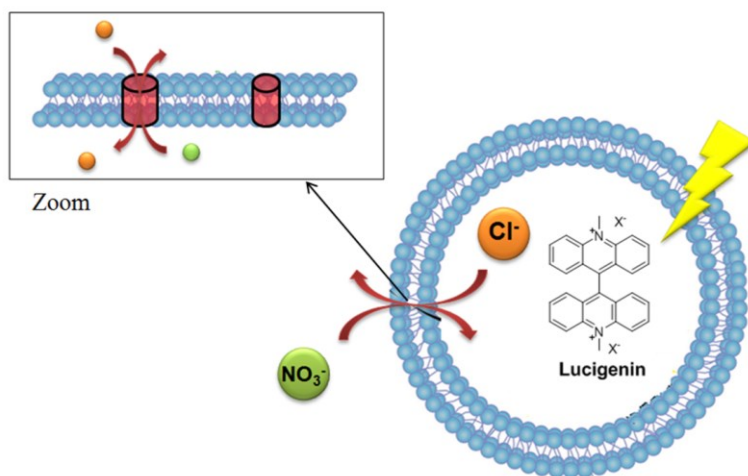


**Scheme 4.2 :** Umbrella dimer **UD** synthesis *via* metathesis.

Only the *trans*-isomer possesses the proper geometry to allow the dimer to span the entire phospholipid bilayer and even if the Grubbs 2<sup>nd</sup> catalyst doesn't usually favor the formation of one isomer relative to the other one, we were very pleased to observe that the bulky umbrella moiety disfavored the formation of the *cis*-isomer. <sup>13</sup>C NMR spectra of the **UD**, revealed only a chemical shift at 67.6 ppm for the carbon  $\alpha$ , confirming the *trans* relative configuration<sup>38</sup> (see ESI, Figure A3.4).

#### **4.2.3.3 Interaction with the phospholipid bilayer and chloride transport properties**

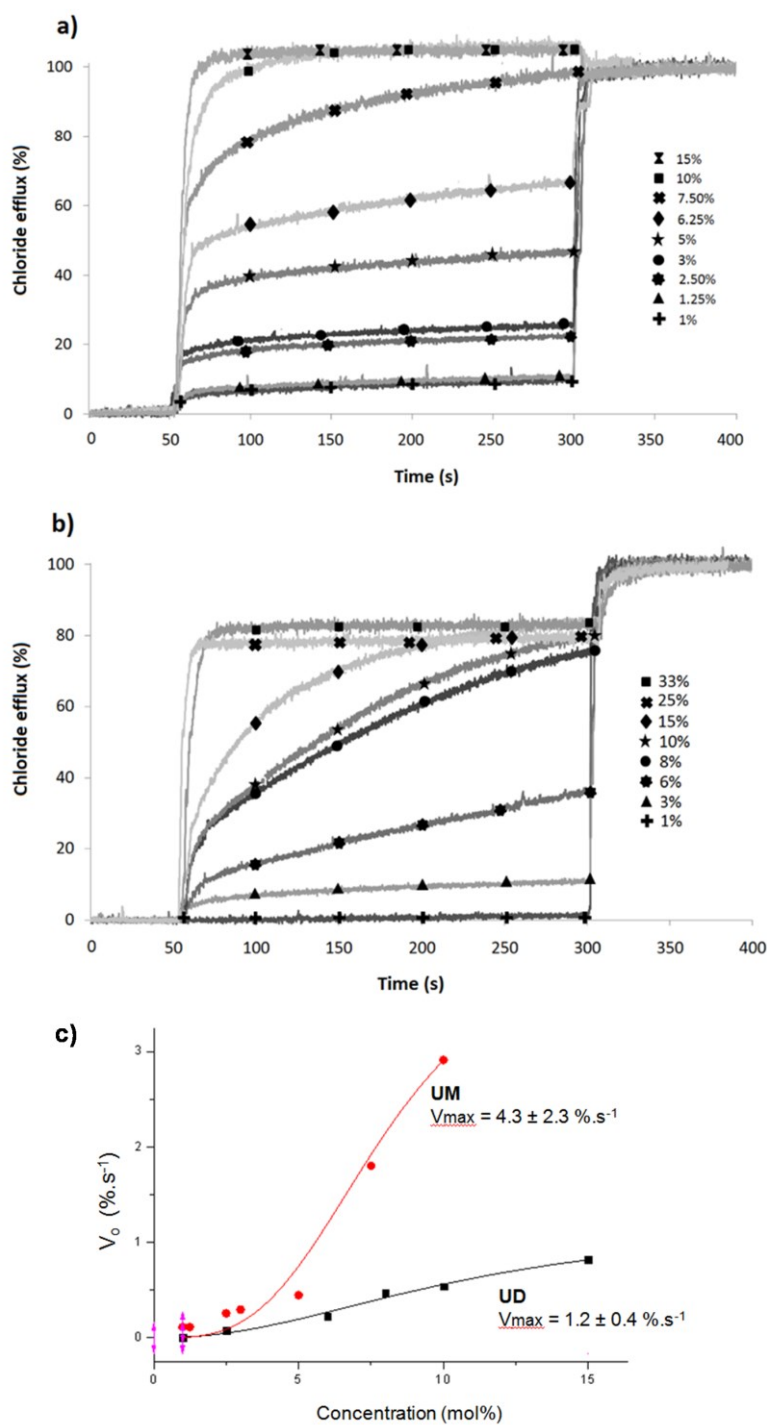
The transport efficiencies of **UM** and **UD** were first compared in large unilamellar vesicles (LUVs) composed of egg-yolk phosphatidylcholine (EYPC) containing lucigenin. Lucigenin is a fluorescent probe which fluorescence is quenched by the presence of chloride anions<sup>39</sup> (Figure 4.2). Transport experiments were conducted with liposomes containing 100 mM NaCl, 2 mM lucigenin and 10 mM phosphate buffer solution (pH 6.2), suspended in an isotonic 100 mM NaNO<sub>3</sub> and 10 mM phosphate buffer solution (pH 6.2). The concentration of **UM** and **UD** were varied from 1 mol% to 30 mol% relative to EYPC concentration (5 mM) and the increase of lucigenin's fluorescence was followed, this being characteristic of a chloride efflux outside the LUVs. At the end of each experiment, Triton X was added to lyse the liposomes and obtain the maximum of lucigenin's fluorescence (Figure 4.3 a) and b)).



**Figure 4.2** : Schematic representation of the liposomes and the lucigenin assay. A transport of chloride outside the liposomes leads to an increase of the lucigenin's fluorescence. The membrane part zoomed shows the formation of a pore by **UM** or **UD**, allowing the transport of chloride anions.

Based on the kinetic experiments conducted at different concentrations of **UM** or **UD**, a comparison of the initial rates ( $V_0$ ) at less than 10% of the maximum transport process for **UM** and **UD** was realized. The Hill analysis clearly shows that **UM** penetrates more rapidly in the phospholipid membrane, compared to **UD** (Figure 4.3 c)). The presence of the two umbrella extremities may be unfavourable for the fast insertion of **UD** in the hydrophobic layer of the membrane.

An additional Hill analysis was performed to determine the half maximum effective concentration ( $EC_{50,250s}$ ) for chloride transport after 250 s. The  $EC_{50}$  values obtained were respectively 0.25 mM ( $5.7 \pm 0.5$  mol% relative to EYPC concentration) for **UM** and 0.28 mM ( $6.4 \pm 0.25$  mol%) for **UD**.



**Figure 4.3 :** Relative chloride efflux in EYPC (5 mM) liposomes promoted by different concentrations 1 mol% to 30 mol% (relative to EYPC concentration) of (a) **UM** and (b) **UD**. Intravesicular: 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, lucigenin 2 mM. Extravesicular: 100

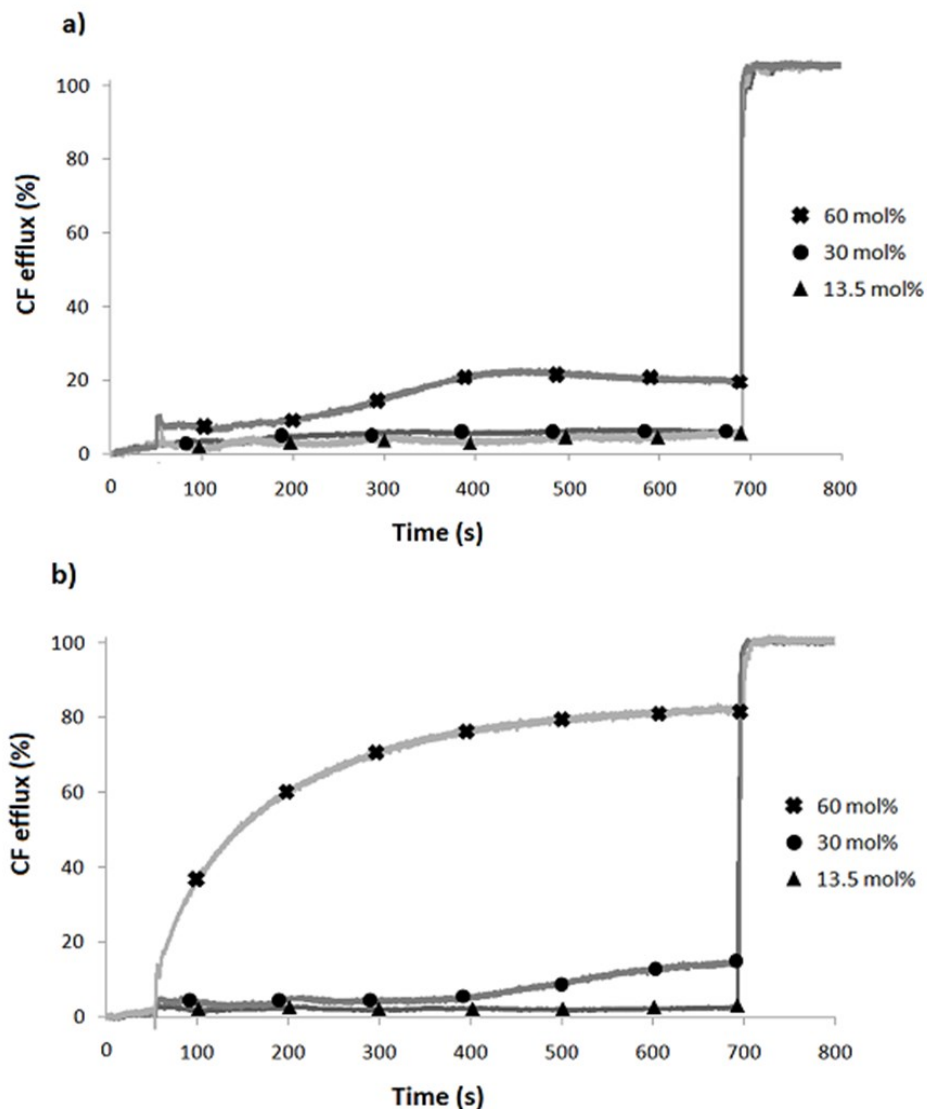
mM NaNO<sub>3</sub>, 10 mM phosphate buffer (pH 6.2). **UM** or **UD** were added at 50 s and Triton X was added at 300 s. Each curve is the average of three independent measurements. (c) Hill plot analysis obtained from the kinetic experiments of **UM** and **UD** in EYPC liposomes. Initial rates were considered at less of 10% of the maximum chloride efflux.

As the chloride transport inside the membrane requires the formation of the active species in this process, the EC<sub>50</sub> value of **UM** is relative to its dimeric assembly inside the membrane. Thus, the similar EC<sub>50</sub> values<sup>1</sup> for **UM** and **UD** confirm our previous hypothesis on the dimeric assembly of **UM** inside the phospholipid bilayer.<sup>33</sup>

The identification of the transport mechanism, the formation of transmembrane pores versus a mobile carrier mechanism, was performed in EYPC/cholesterol (7:3) liposomes. Cholesterol rigidifies and orders the membrane by increasing the energy barrier of the movement of phospholipids inside the bilayer (rotation, lateral diffusion or phospholipid flip-flop).<sup>40</sup> The transport efficiency of a transmembrane channel is not influenced by the rigidity of the membrane, whereas a mobile transporter encounters more difficulties to diffuse across a more rigid phospholipid/cholesterol membrane. The same chloride efflux was induced by **UM** and **UD** in the presence or absence of cholesterol, suggesting the formation of a transmembrane channel in both cases (see ESI, Figure A3.7).

---

<sup>1</sup> However, when the efficiency of the two transporters was reported in mass concentration, **UD** was less efficient than **UM** with an EC<sub>50</sub> of 740 µg/ml and 334 µg/ml respectively.



**Figure 4.4** : Carboxyfluorescein leakage assays in EYPC liposomes. (a) **UM** and (b) **UD** were added at 50 s and Triton X was added at 700 s. Each curve is the average of three independent measurements.

Since **UM** and **UD** are large enough to disrupt the integrity of the membrane and induce the lysis of liposomes, carboxyfluorescein (CF) leakage assays were performed to confirm the stability of the liposomes during the transport experiments. CF is a fluorescent probe that self-quenches its fluorescence when encapsulated at high concentrations into liposomes. In the case where the membrane of the liposomes is disrupted, a very fast increase of fluorescence is

observed, due to the fast release of the CF and its dilution into the extravesicular media. On the other hand, as CF is a large and membrane impermeable dye, a slow increase of fluorescence is often characteristic of the formation of large pores in the bilayer. CF leakage experiments were performed on liposomes containing 20 mM CF and 100 mM NaCl dispersed in a 100 mM NaCl extravesicular solution, to prevent chloride self-diffusion. No CF leakage was observed even with 13.5 mol% of **UM** and **UD** (concentration inducing 100% of chloride efflux in the previous assays), demonstrating the stability and the integrity of the membrane during the transport experiments. Regen's and Chen's groups have already reported that umbrella systems form large pores across the membranes.<sup>41</sup> In our case, only a very high concentration of **UD** (60 mol%) allowed a slow CF release, while for **UM** almost no CF leakage was observed even at this concentration. These results suggest that **UD** forms larger pores than **UM** (Figure 4.4).

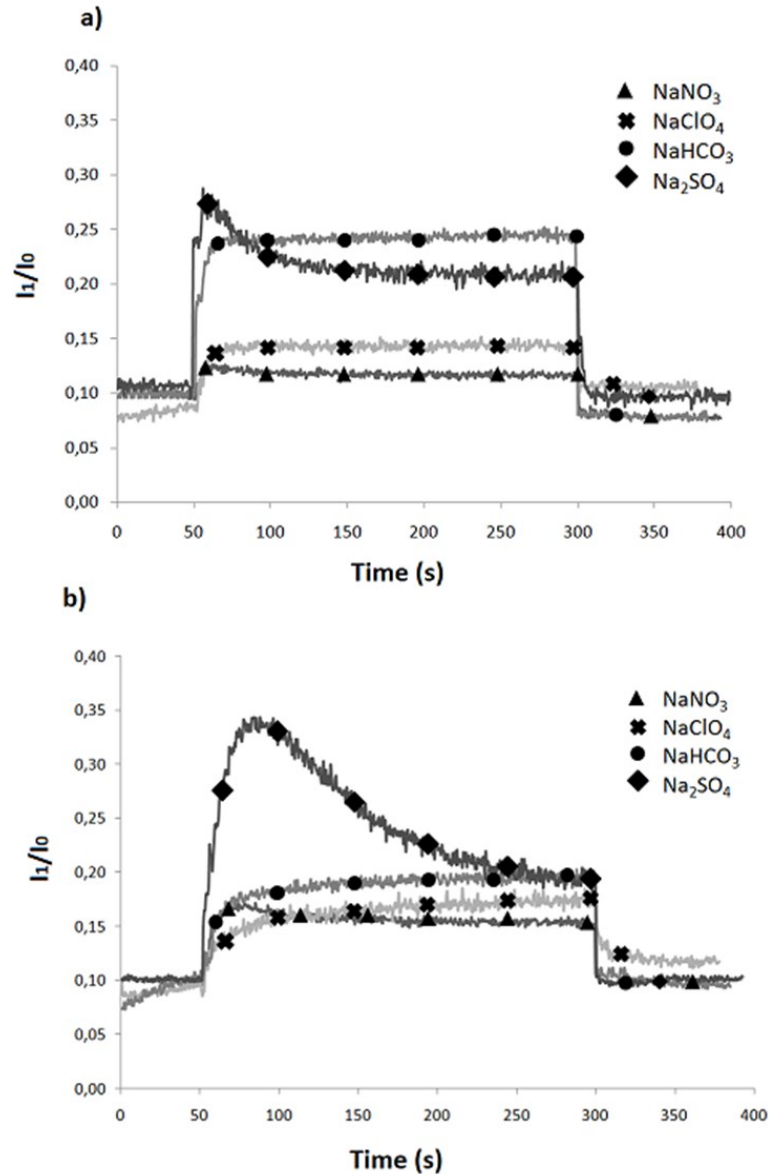
The transport of ions by synthetic transmembrane channels usually occurs *via* passive transport mechanisms in which the charge balance across the phospholipid membrane is usually maintained.<sup>1</sup> This is achieved by either a symport mechanism, where both an anion and a cation are transported, or by an antiport mechanism, where two anions are transported or exchanged across the membrane in opposite directions.<sup>42</sup> To identify this mechanism and ion selectivity of **UM** and **UD**, chloride efflux experiments were first performed using different chloride salts (MCl with M<sup>+</sup>: Na<sup>+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) as intravesicular solutions using the lucigenin-based assay. The chloride efflux was not influenced by the nature of the different cations used, suggesting only a slow contribution of the Cl<sup>-</sup>/M<sup>+</sup> symport transport process (see ESI, Figure A3.6).

Further Cl<sup>-</sup>/X<sup>-</sup> antiport mechanism studies were performed by changing the nature of the extravesicular anions. The permeability of the phospholipid membrane to different external anions influences the chloride efflux if the antiport mechanism is dominant. Nitrate, perchlorate and bicarbonate anions are more hydrophobic than sulfate.<sup>43</sup> In the case of **UD**, no variation was observed when these different anions were present in the extravesicular solution. However, the chloride transport efflux induced by **UM** was decreased when sulfate was used as external anion, which is characteristic to an antiport process (see ESI, Figure A3.5).

Hydrated anions such as bicarbonate or sulfate favour the co-transport of proton/chloride due to their difficulty to diffuse across the membranes.

Further transport experiments were performed with liposomes containing 8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate (HPTS), a pH-fluorescent probe possessing a protonated ( $I_0$ ) and a deprotonated ( $I_1$ ) form, with excitation wavelengths at 403 nm and 460 nm respectively. The variation of the ratio  $I_1/I_0$  is a direct evidence of a proton/chloride co-transport across the membrane. Hence, an increase of the ratio  $I_1/I_0$  is indicative of proton transport outside the liposome. Experiments were performed with liposomes containing an HPTS solution (HPTS 0.1 mM, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer solution, (pH = 6.4)). As observed in the previous experiments, the variation of the extravesicular solution influences the efficiency of the anion transport, but also the transport of protons (Figure 4.5). A more important increase of the ratio  $I_1/I_0$  was observed when sulfate was used as external anion for both **UM** and **UD**. This fast increase of the ratio  $I_1/I_0$  in presence of **UD** was followed by a slow decrease, corresponding to the return at an equilibrated anion concentration between the intra- and the extravesicular solutions.<sup>44</sup> On the other hand, the co-transport of protons was more pronounced when **UM** was used in the bicarbonate solution. This suggests a lower efficiency of **UM** to translocate bicarbonate across phospholipid bilayers, compared to **UD**. The slight increase of the  $I_1/I_0$  ratio induced by **UD** corresponds to a very slow alkalisation of the intravesicular solution, indicating a minor amount of HCl transported across the bilayer.<sup>44</sup> The important result that deserves to be pointed out is the selectivity of **UD** to transport bicarbonate in a  $Cl^-/HCO_3^-$  antiport process, similar to the natural systems.





**Figure 4.5 :** HPTS-based transport assay. Intravesicular: 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 6.4), HPTS 0.1 mM. Extravesicular: 100 mM NaX ( $X^- = \text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) or 50 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 mM phosphate buffer (pH 6.4) for **UM** (a) and **UD** (b) at 13.5 mol% relative to EYPC concentration. The Y-axis “ $I_1/I_0$ ” refers to the ratio of HPTS fluorescence emission at 510 nm, where  $I_0$  is the excitation at 403 nm (acidic form of HPTS) and  $I_1$  the excitation at 460 nm (basic form of HPTS). Each curve represents the average of three independent measurements.

All these transport results indicate the formation of pores inside the phospholipid membranes. Both umbrella compounds principally favor the anion exchange across the membrane. However, **UM** and its self-assembled dimer formed in the bilayer are more sensitive to the hydrophilicity of the transported anion and favor the HCl co-transport in the presence of bicarbonate. **UD** favours the  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  antiport process. This anion selectivity between the two umbrella compounds is an important finding and can be exploited for biological applications, if able to penetrate more sophisticated cellular membranes.

#### 4.2.3.4 Antibacterial studies

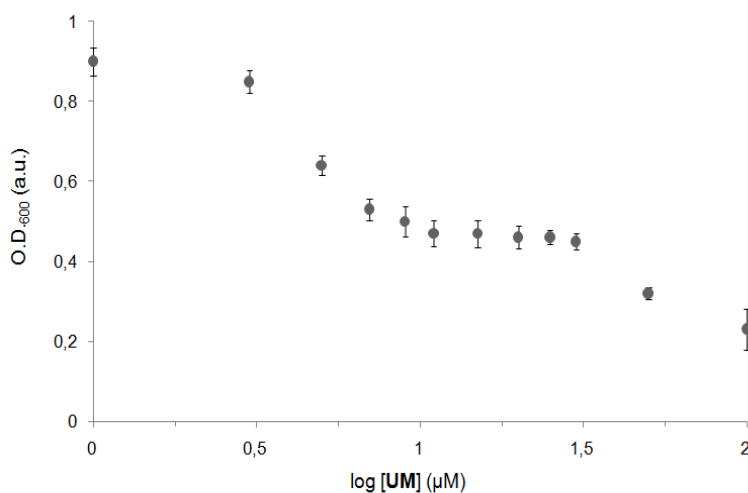
The capacity of **UM** and **UD** to penetrate more complex phospholipid bilayers was evaluated in Gram-negative (*E. coli* SK037) and Gram-positive bacteria (*B. thuringiensis* HD73). As we previously reported the capacity of benzimidazolium salts to alter the permeability of the bacterial membranes and induce cellular death,<sup>25</sup> the minimal inhibitory concentrations (MIC) for these two strains were determined and are reported in the Table 4.1.

Even if in liposomes **UM** and **UD** showed the same  $\text{EC}_{50,250\text{s}}$ , they do not have the same antimicrobial activity in Gram-negative and Gram-positive bacteria. Bacterial membranes are more complex environments, containing other components than phospholipids, such as proteins or peptidoglycans. In the case of **UD**, due to its poor solubility in the biological conditions, the higher concentration studied was 10  $\mu\text{M}$ . The MIC values for *B. thuringiensis* and *E. coli* are higher than this concentration.

**Table 4.1** : Antibacterial activity (MIC) and transport efficiency (EC<sub>50,250s</sub>) of **UM** and **UD**.

	Gram-positive <i>B. thuringiensis</i>	Gram-negative <i>E. coli</i>		Liposomes
	MIC (μM)	Bacteriostatic concentration (μM)	MIC (μM)	EC <sub>50,250s</sub> (mol%)
<b>UM</b>	8-10	5 – 30	>100	5.7 ± 0.5
<b>UD</b>	>10	n.d.	>10	6.4 ± 0.25

For **UM**, a lower MIC value was obtained for *B. thuringiensis*, compared to *E. coli*. This value is similar to those previously reported for other cholic acid derivatives<sup>17, 18, 45</sup> Savage *et al.* have already discussed the mechanism of interaction of cholic acid derivatives with bacterial membranes.<sup>46</sup> They proposed an initial association step between the sterol and the lipopolysaccharides at the microbial surface, before the insertion of the hydrophobic part of the compound into the phospholipid bilayer.



**Figure 4.6** : Antibacterial activity of **UM** in *E. coli* after 24 h *E. coli* strains were grown during 24 h at 37°C in presence of different concentrations of **UM**. The optical density at 600 nm (O.D.<sub>600</sub>) was monitored at the beginning of the experiment and after 24 h of incubation.

The presence of a second umbrella moiety in the structure of **UD** may lead to a stronger interaction with the negatively charged bacterial surface, preventing its insertion. In this regard, the number of cholic acid units seems to dictate the capacity of the compound to penetrate and destabilize the bacterial membrane. Even if in liposomes both **UM** and **UD** showed the ability to penetrate the phospholipid bilayer, the mass and volume of the transporter seem to affect this ability in a more complex environment such as a bacterial membrane. Another observation that can be outlined from this study is the considerable bacteriostatic effect of **UM** for Gram-negative *E. coli* at concentrations between 5 and 30  $\mu\text{M}$  (see Figure 4.6). This bacteriostatic activity in *E. coli*<sup>47, 48</sup> may be due to an interference of **UM** in the bacterial respiration which usually reduces bacterial division, without stopping it.<sup>49</sup> The more pronounced antibacterial activity of **UM** that can be observed above 50  $\mu\text{M}$  may correspond to the concentration at which **UM** starts to self-assemble as pore-forming dimers in the bacterial membrane and trigger bacterial death.

#### 4.2.4 Conclusion

In conclusion, new umbrella monomer **UM** and dimer **UD** threads have been synthesized and their capacities to promote chloride transmembrane transport were investigated. Transport experiments in synthetic liposomes showed the penetration and formation of pores into phospholipid membranes. The larger **UD** transporter forms larger pores in phospholipid bilayers, but shows no significant improvement in the chloride transport process. However, **UD** is more efficient than **UM** for the transport of large anions such as bicarbonate, *via* an antiport mechanism. Nevertheless, the smaller **UM** shows a more pronounced antibacterial activity for Gram-negative and Gram-positive bacteria, demonstrating its ability to penetrate complex phospholipid environments. This is an important result and work is under progress in our group to assemble a [3]-rotaxane by complexation of biologically active macrocycles on the secondary ammonium sites of **UM** and **UD**. The exploitation of these mechanically interlocked systems as a vehicle to favour the translocation of a macrocyclic drug through phospholipid bilayers remains an interesting challenge that we are currently addressing.

## 4.2.5 Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQ-NT) and the Université de Montréal for the financial support. We also thank Le Centre Régional de RMN and Le Centre Régional de Spectrométrie de masse of the Université de Montréal.

## 4.2.6 Notes and references

1. J. T. Davis, O. Okunola and R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 3843.
2. M. J. Welsh, *FASEB.J*, **1990**, *4*, 2718.
3. H. Valkenier, C. M. Dias, K. L. Porter Goff, O. Jurcek, R. Puttreddy, K. Rissanen and A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 14235.
4. M. Lisbjerg, H. Valkenier, B. M. Jessen, H. Al-Kerdi, A. P. Davis and M. Pittelkow, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 4948.
5. L. González-Mendoza, B. Altava, M. I. Burguete, J. Escorihuela, E. Hernando, S. V. Luis, R. Quesada and C. Vicent, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 34415.
6. J. H. Lee, J. H. Lee, Y. R. Choi, P. Kang, M. G. Choi and K. S. Jeong, *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 6403.
7. X. D. Wang, S. Li, Y. F. Ao, Q. Q. Wang, Z. T. Huang and D. X. Wang, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 330.
8. N. L. Mora, A. Bahreman, H. Valkenier, H. Li, T. H. Sharp, D. N. Sheppard, A. P. Davis and A. Kros, *Chem. Sci.*, **2016**, *7*, 1768.
9. N. Rodriguez-Vazquez, M. Amorin, I. Alfonso and J. R. Granja, *Angew. Chem.*, **2016**, *55*, 4506
10. C. J. E. Haynes, N. Busschaert, I. L. Kirby, J. Herniman, M. E. Light, N. J. Wells, I. Marques, V. Félix and P. A. Gale, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 62.
11. R. B. Elmes, N. Busschaert, D. D. Czech, P. A. Gale and K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 10107.

12. M. Olivari, R. Montis, L. E. Karagiannidis, P. N. Horton, L. K. Mapp, S. J. Coles, M. E. Light, P. A. Gale and C. Caltagirone, *Dalton. Trans.*, **2015**, *44*, 2138.
13. M. J. Spooner and P. A. Gale, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 4883.
14. L. L. Cline, V. Janout, M. Fisher, R. L. Juliano and S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 2210.
15. V. Janout, L. L. Cline, B. P. Feuston, L. Klein, A. O'Brien, T. Tucker, Y. Yuan, L. A. O'Neill-Davis, R. L. Peiffer, S. S. Nerurkar, V. Jadhav, D. M. Tellers and S. L. Regen, *Bioconjugate. Chem.*, **2014**, *25*, 197.
16. V. Janout, W. A. Schell, D. Thevenin, Y. Yu, J. R. Perfect and S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 2021.
17. C. Li, M. R. Lewis, A. M. Gilbert, M. D. Noel, D. H. Scoville, G. W. Allman and P. B. Savage *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, 1347.
18. E. J. Schmidt, J. S. Boswell, J. P. Walsh, M. M. Schellenberg, T. W. Winter, C. Li, G. W. Allman and P. B. Savage, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, *47*, 671.
19. X. Z. Lai, Y. Feng, J. Pollard, J. N. Chin, M. J. Rybak, R. Bucki, R. F. Epand, R. M. Epand and P. B. Savage, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 1233.
20. Y.-M. Lu, L.-Q. Deng and W.-H. Chen, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 43444.
21. L. Q. Deng, Z. Li, Y. M. Lu, J. X. Chen, C. Q. Zhou, B. Wang and W. H. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 745.
22. Z. Li, L. Q. Deng, J. X. Chen, C. Q. Zhou and W. H. Chen, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 11761.
23. J. Gravel, J. Kempf and A. Schmitzer, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 18642.
24. M. Vidal, C.-R. Elie, S. Campbell, A. Claing and A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Comm*, **2014**, *5*, 463.
25. C. R. Elie, G. David and A. R. Schmitzer, *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 2358.
26. J. Kempf, N. Noujeim and A. R. Schmitzer, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 42293.
27. D. Sterling and J. R. Casey, *Biochem J.*, **1999**, *344*, 221.
28. P. T. Bonar and J. R. Casey, *Channels*, **2014**, *2*, 337.
29. P. A. Gale, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 216.
30. E. Cordat and J. R. Casey, *Biochem. J.*, **2009**, *417*, 423.

31. W. A. Harrell, Jr., M. L. Bergmeyer, P. Y. Zavalij and J. T. Davis, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3950.
32. C. Chhun, J. Richard-Daniel, J. Kempf and A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 6023.
33. C. Chhun and A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Comm.*, **2011**, *2*, 987.
34. M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee and R. H. Grubbs, *Org. Lett.*, **1999**, *1*, 953.
35. M. Hassam, A. Taher, G. E. Arnott, I. R. Green and W. A. van Otterlo, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 5462.
36. S. H. Hong, D. P. Sanders, C. W. Lee and R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17160.
37. A. K. Chatterjee, T. L. Choi, D. P. Sanders and R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11360.
38. F. Grellepois, B. Crousse, D. Bonnet-Delpon and J. P. Begue, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 5219.
39. B. A. McNally, A. V. Koulov, B. D. Smith, J. B. Joos and A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2005**, 1087.
40. M. R. Krause and S. L. Regen, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 3512.
41. W. H. Chen, X. B. Shao and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12727.
42. N. Busschaert, C. Caltagirone, W. Van Rossom and P. A. Gale, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 8038.
43. N. Busschaert, P. A. Gale, C. J. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis and W. A. Harrell, Jr., *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 6252.
44. S. K. Berezin and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2458.
45. A. J. Rasras, T. H. Al-Tel, A. F. Al-Aboudi and R. A. Al-Qawasmeh, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 2307.
46. C. Li, L. P. Budge, C. D. Driscoll, B. M. Willardson, G. W. Allman and P. B. Savage, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 931.
47. M. N. Melo, R. Ferre and M. A. Castanho, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, *7*, 245.
48. D. Roversi, V. Luca, S. Aureli, Y. Park, M. L. Mangoni and L. Stella, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, 2003.

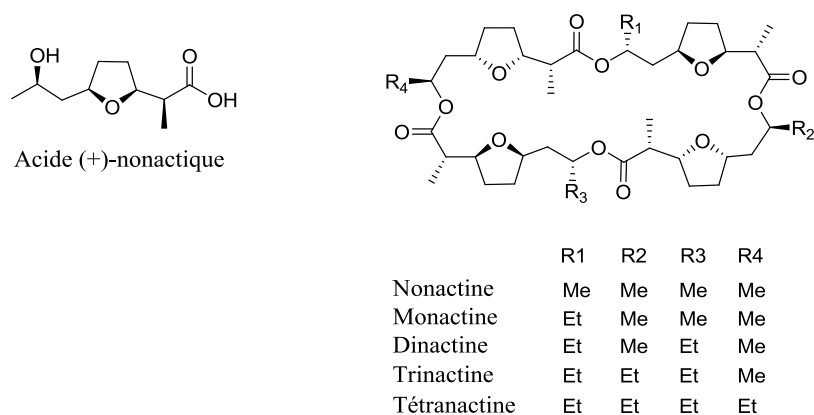
49. M. A. Lobritz, P. Belenky, C. B. Porter, A. Gutierrez, J. H. Yang, E. G. Schwarz, D. J. Dwyer, A. S. Khalil and J. J. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2015**, *112*, 8173.



## **Chapitre 5 : Synthèse de rotaxanes parapluies comportant une roue biologiquement active**

## 5.1 Introduction

Parmi les molécules biologiquement actives possédant des propriétés antibiotiques ou antibactériennes, beaucoup d'entre elles sont des macrocycles.<sup>1</sup> Ces dernières années, l'utilisation de peptides cycliques dépourvus d'extrémités *N*- et *C*-terminales a été privilégiée, dû à leur plus grande résistance aux protéases. Parmi ces familles de molécules cycliques, on peut citer les macrotétrolidés.<sup>2</sup> Le plus simple représentant de cette famille est la nonactine composée de quatre unités d'acide nonactique (tetrahydrofuranyle) et quatre liens lactones. Cette molécule possède une activité anticancéreuse envers les cellules de mammifères<sup>3</sup> (Figure 5.1).



**Figure 5.1** : Structures de l'acide nonactique et de la famille des macrotétrolidés.

En solution, cette molécule se trouve principalement en conformation ouverte exposant ses groupements polaires vers l'extérieur de la structure.<sup>4</sup> Sous cette conformation, la nonactine est incapable de traverser la membrane phospholipidique, surtout la partie hydrophobe de la bicouche. En présence de cations, une rotation des atomes d'oxygène vers l'intérieur du macrocycle a lieu, permettant sa complexation. Dans ce cas-ci, la périphérie du complexe est alors lipophile assurant son passage à travers la partie hydrophobe de la membrane.

Ce macrocycle naturel serait alors un bon exemple afin de valider l'utilisation de nos rotaxanes parapluies pour le transport de macrocycles biologiquement actifs. En effet, une fois complexé de façon supramoléculaire au site ammonium de notre axe parapluie, le repliement du parapluie cachera le caractère hydrophile et hydrophobe du macrocycle permettant son passage à travers la membrane lipidique.

Ainsi, comme présenté dans l'introduction à la partie synthèse de rotaxane (Chapitre 1.4.2 Assemblage de rotaxanes), plusieurs voies de synthèse de ces molécules enchevêtrées existent. Deux d'entre elles seront utilisées ici pour former le rotaxane : le « *capping* » et le « *clipping* ». Dans le cas optimal, deux roues seront complexées autour de l'axe formant ainsi un [3]-rotaxane, ce qui représenterait un avantage pour le transport du macrocycle dû au transport simultané de deux équivalents de macrocycles.

## 5.2 Synthèse du rotaxane parapluie

La présence d'atomes d'oxygène dans la structure de la nonactine, capables de former des ponts hydrogènes vers l'intérieur du macrocycle, rappelle la structure des éthers couronnes. Ainsi, une complexation supramoléculaire entre ce macrocycle et le site ammonium de l'axe parapluie devrait être possible et sera déterminée par la constante d'association  $K_{ass}$ . Suite à l'obtention du pseudorotaxane par la complexation de la nonactine sur l'axe parapluie, ce pseudorotaxane sera dimerisé par une réaction de métathèse (Figure 5.2).

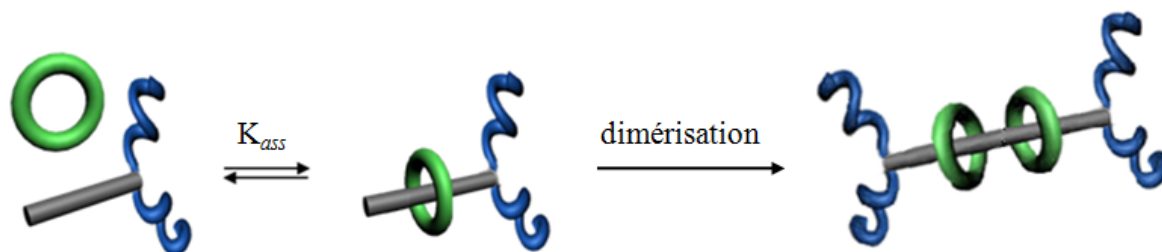
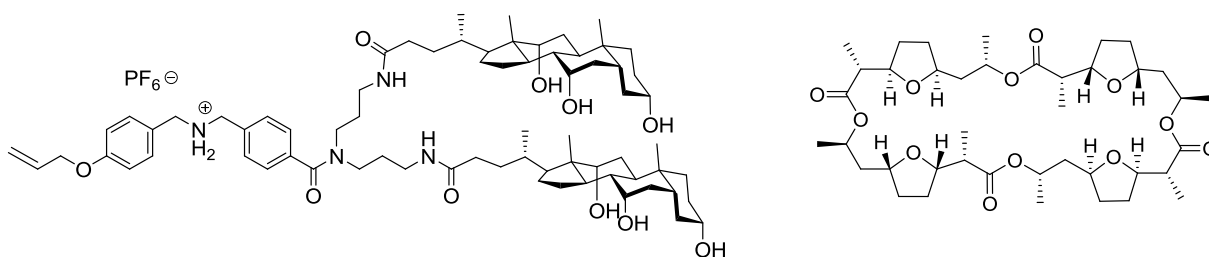


Figure 5. 2 : Synthèse du rotaxane parapluie par dimérisation.

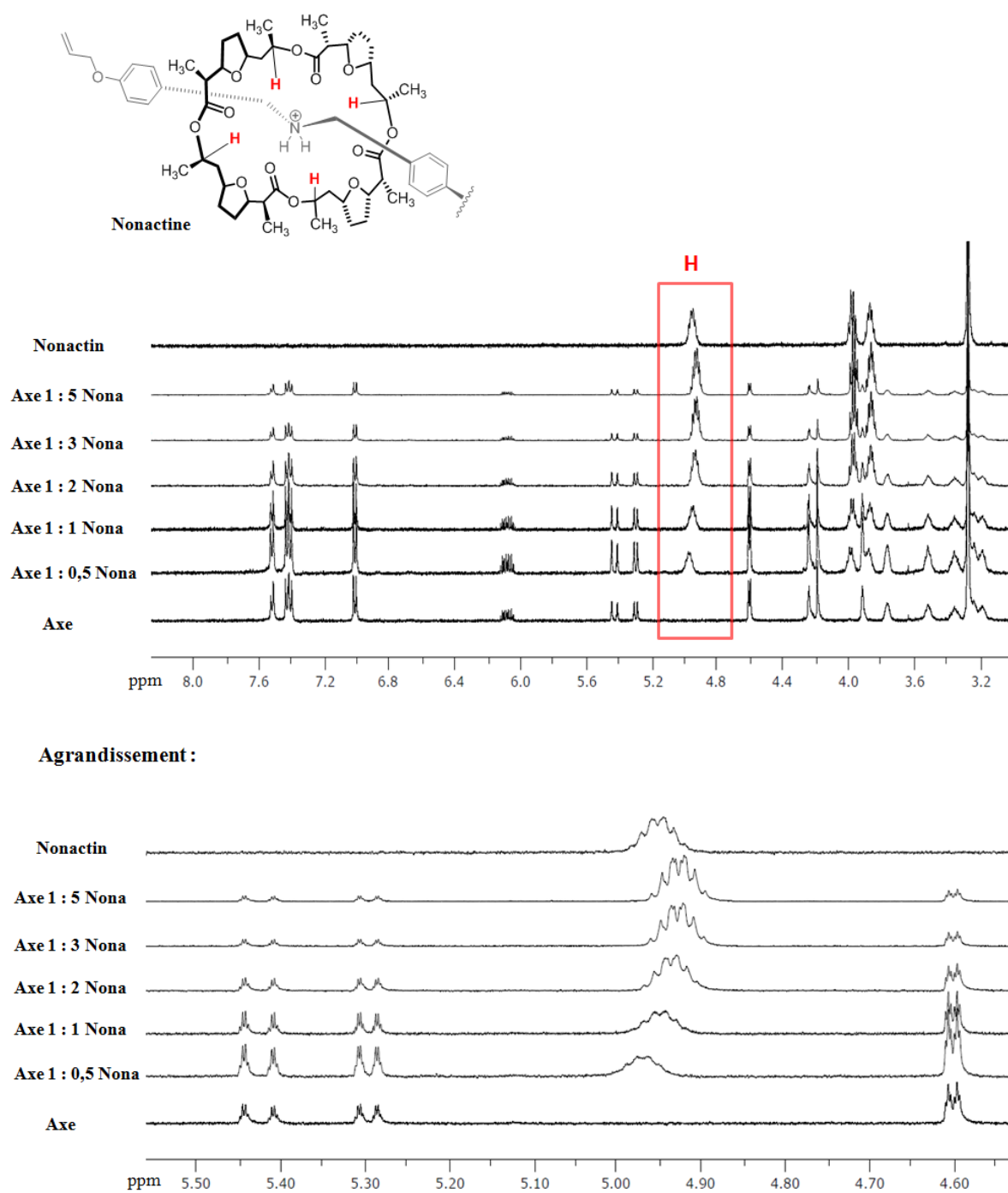
### 5.2.1 Mise en évidence de la complexation avec la nonactine : titrage par RMN



**Figure 5.3** : Structures de l'axe parapluie **UM** et de la nonactine.

L'association supramoléculaire entre la nonactine et notre axe parapluie **UM** (Figure 5.3) a été observée par titrage RMN. L'utilisation d'un solvant aprotique est nécessaire afin de limiter la formation de ponts hydrogènes avec le solvant. Ainsi, afin de favoriser la complexation, mais également de permettre la solubilité des deux composés, un mélange 9 / 1 CD<sub>3</sub>CN/MeOD a été choisi pour réaliser notre expérience.

Différentes concentrations de roue ont alors été ajoutées à une concentration fixe d'axe parapluie. Une modification du déplacement chimique  $\Delta\delta$  des protons présents à l'intérieur du macrocycle (protons rouges, Figure 5.4) est observée. Cette variation est liée à une modification de l'environnement chimique de ces protons, due à la présence de notre axe parapluie. Ces résultats confirment également que le mode de complexation de la nonactine autour de l'axe est celui désiré (axe présent à l'intérieur du macrocycle) puisque l'environnement chimique de chacun de ces protons est modifié de la même façon. Comme mentionné précédemment, lorsque la nonactine est libre dans le milieu, sa conformation ouverte expose ces quatre protons (en rouge dans le Figure 5.4) vers l'extérieur du macrocycle. Ainsi, une simple proximité de l'axe **UM** avec la nonactine ne pourrait pas influencer simultanément l'environnement chimique de ces hydrogènes.



**Figure 5. 4 :** a) Spectres RMN  $^1\text{H}$  400 MHz dans  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOD}$  9/1 de l'axe parapluie **UM** (1 mM) en présence de différentes concentrations de nonactine. b) Agrandissement des spectres du titrage montrant le déplacement chimique  $\Delta\delta$  des protons de la nonactine.

$$K_{\text{ass}} = 5400 \pm 1000 \text{ M}^{-1}$$

Une constante d'association entre la nonactine et notre axe parapluie de l'ordre de  $5400 \pm 1000 \text{ M}^{-1}$  a été déterminée *via* l'utilisation du logiciel WinEQNMR2 et des  $\Delta\delta$  observés.<sup>5</sup> Elle a été calculée suivant un modèle 1:1, où une unique roue vient se complexer autour d'UM, suivant les équations (1) et (2) suivantes :

$$K_{ass} = \frac{[\text{Pseudorotaxane}]}{([\text{R}][\text{UM}])} \quad (1)$$

$$[\text{Pseudorotaxane}] = \frac{1}{2} \left( [\text{R}]_0 + [\text{UM}]_0 + \frac{1}{K_{ass}} \right) - \sqrt{\left( [\text{R}]_0 + [\text{UM}]_0 + \frac{1}{K_{ass}} \right)^2 - 4[\text{R}]_0[\text{UM}]_0} \quad (2)$$

où  $K_{ass}$  est la constante d'association entre la roue et UM,  $[\text{R}]_0$  et  $[\text{UM}]_0$  respectivement les concentrations initiales de nonactine et d'axe.<sup>6</sup>

La complexation entre le macrocycle et l'axe parapluie ayant été observée, les premiers tests de dimérisation furent menés.

## 5.2.2 Synthèse du [3]-rotaxane par « capping » suivi de la dimérisation

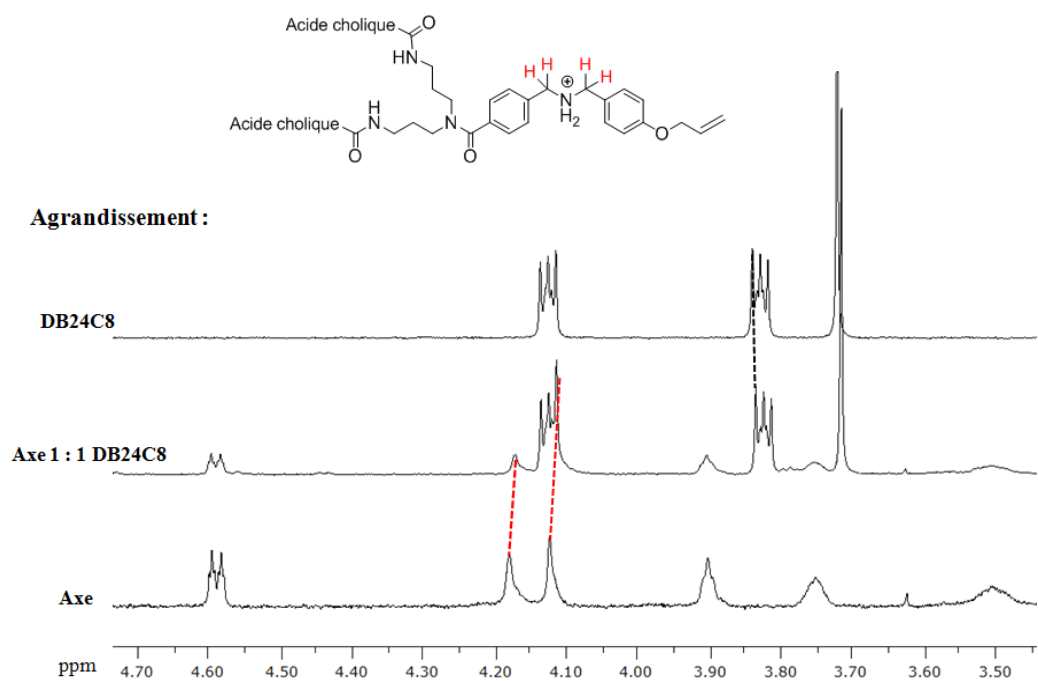
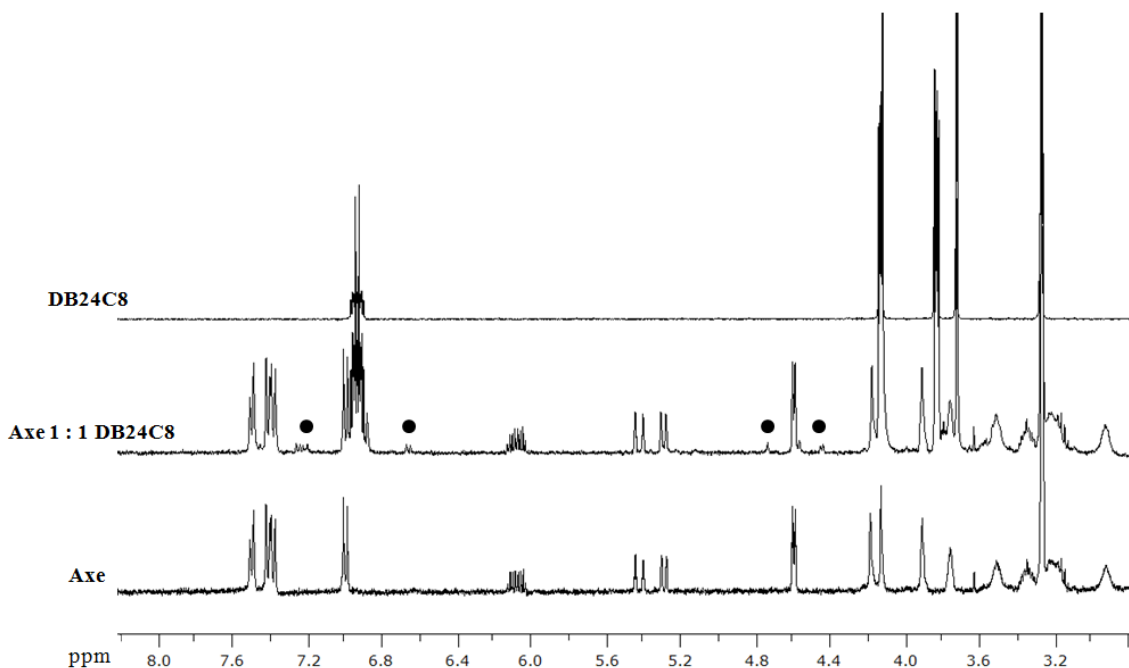
Après avoir confirmé la complexation entre l'axe et la nonactine, la principale difficulté reste de former le [3]-rotaxane par dimérisation *via* une réaction de métathèse. Il est nécessaire de réunir des conditions à la fois favorables à la complexation du macrocycle et de l'axe, et qui permettent également le couplage par métathèse.

### 5.2.2.1 Titrage RMN avec DB24C8

Les premiers tests de dimérisation du pseudorotaxane ont tout d'abord été réalisés à l'aide d'une roue éther couronne dibenzo24C8 (DB24C8). Cette roue est un très bon modèle pour remplacer la nonactine (qui est bien plus dispendieuse que le DB24C8) et mettre au point

les conditions réactionnelles de couplage. En effet, la forte constante d'association entre le DB24C8 et des ammoniums secondaires a déjà été rapportée dans la littérature.<sup>7-9</sup>

La formation du pseudo rotaxane a donc été confirmée par RMN dans un mélange 9/1 CD<sub>3</sub>CN/MeOD en présence d'un ratio équimolaire d'axe **UM** et de DB24C8 après 2 h de complexation (Figure 5.5). Comme observé dans le spectre RMN <sup>1</sup>H, l'apparition de nouveaux pics (marqués par un point noir) met en évidence la formation du complexe. Cependant, la complexation est lente sur l'échelle de la RMN, raison pour laquelle les signaux correspondant à la roue non complexée sont encore visibles dans le spectre. De plus, dans la Figure 5.5 b), une modification du déplacement chimique des protons de l'axe à 4,12 et 4,18 ppm, correspondant aux protons des méthylènes (en rouge sur la Figure 5.5), peut être également observée. Cela provient du positionnement de l'éther couronne DB24C8 autour du site de reconnaissance de l'axe modifiant ainsi l'environnement chimique de ces protons.

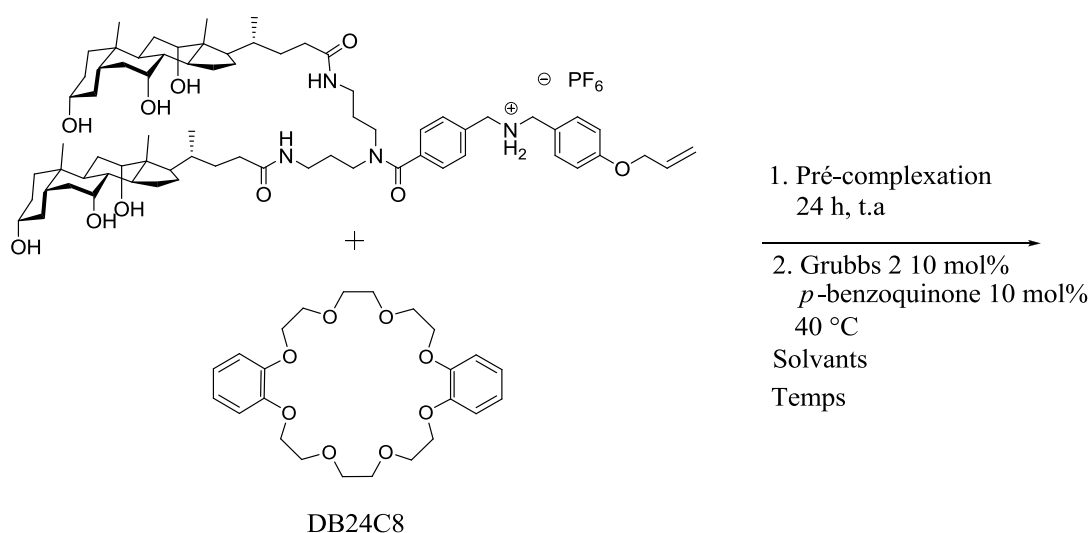


**Figure 5.5** : a) Spectres RMN  $^1\text{H}$  400 MHz dans  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOD}$  9/1 de l'axe parapluie **UM**, de la roue DB24C8 et du mélange 1:1 **UM**:DB24C8 après 2 h de complexation b) Agrandissement des spectres montrant le déplacement chimique  $\Delta\delta$  des protons des méthylènes.



### 5.2.2.2 Assemblage du rotaxane par « capping »

La synthèse du rotaxane parapluie se déroule en deux étapes. La première est l'étape de complexation entre le monomère parapluie et la roue. Pour les tests suivants, cette étape a été réalisée à température ambiante pendant 24 h afin de favoriser la formation des ponts hydrogènes entre les deux composés. Par la suite, l'ajout du catalyseur de Grubbs 2 devra dimériser nos pseudorotaxanes formés. Plusieurs conditions expérimentales, regroupées dans le Tableau 5.1 ont été essayées.



<i>Essais</i>	<i>UM</i>	<i>DB24C8</i>	<i>Solvants</i>	<i>Conditions</i>	<i>Résultats</i>
1	1 éq	1 éq	CH <sub>3</sub> CN/ MeOH 8 / 2	24 h à 40°C	0% <sup>a</sup> Dégradation du catalyseur
2	1 éq	1 éq	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> / MeOH 8 / 2	48 h à 40°C	0% <sup>a</sup> Récupération des produits de départ
3	1 éq	1 éq	CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> / MeOH 1 / 1	48 h à 40°C	0% <sup>a</sup> Récupération des produits de départ

4	1 éq	1 éq	DCM / MeOH 9 / 1	48 h à 40°C	0% <sup>a</sup> Récupération du dimère
5	1 éq	1 éq	DCM + 1 goutte MeOH	48 h à t.a. 48 h à 40°C	0% <sup>a</sup> Récupération du dimère

<sup>a</sup> [3]-rotaxane non détecté par RMN après chromatographie préparative.

**Tableau 5.1** : Optimisation de l'assemblage du rotaxane *via* un couplage par métathèse

Tout d'abord, le paramètre le plus important à optimiser est le solvant. En effet, un solvant polaire est nécessaire pour permettre la solubilisation des dérivés d'acides choliques. Cependant, les solvants protiques doivent être évités pour ne pas influencer la complexation de la roue et ne sont pas favorables pour le couplage par métathèse. Différents rapports solvant aprotique/protique ont donc été testés afin de satisfaire aux deux conditions.

Dans un premier temps, une quantité équimolaire d'axe et de DB24C8 a été dissoute dans un mélange acétonitrile/méthanol 8/2 afin de permettre une bonne solubilisation d'UM. Malgré une bonne solubilité des deux composés dans ce mélange, une dégradation du catalyseur Grubbs 2 a été observée due à la présence de l'acétonitrile. Le solvant apolaire a donc été changé pour le nitrométhane. Malheureusement, notre axe possède une solubilité moindre dans le mélange MeNO<sub>2</sub>/MeOH 8/2 (essai 2) nous obligeant à augmenter la quantité de méthanol (essai 3, ratio 1/1). Après 48 h de réaction, seuls les produits de départ ont été récupérés.

Ce genre de mélange de solvants n'est pas optimal pour le couplage par métathèse, un essai a donc été réalisé avec du dichlorométhane (mélange DCM/MeOH 9/1), plus favorable pour ce type de réaction.<sup>10</sup> Lors de ce test, le mélange réactionnel a préalablement été chauffé afin de permettre la dissolution de l'axe insoluble dans le dichlorométhane. Des traces de rotaxanes ont été observées par RMN après 48 h de réaction. Malheureusement, après purification par chromatographie préparative, le dimère parapluie et le DB24C8 ont été

recupérés séparément. Cela suggère que la roue pourrait venir se positionner autour du site de reconnaissance mais sans s'enfiler autour de l'axe.

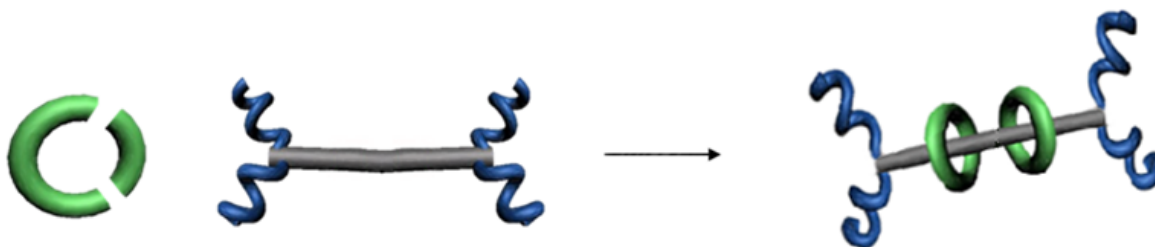
Afin de favoriser la formation du rotaxane et de limiter les interactions compétitives, un autre essai à été réalisé en deux temps. Tout d'abord, l'axe et le DB24C8 ont été dissouts dans le DCM avec le minimum de méthanol possible (essai 5). Après plusieurs heures à température ambiante, la solution est devenue presque totalement limpide suggérant la complexation de la roue autour de l'axe. Le mélange fût alors évaporé, repris dans du DCM pur et le catalyseur de métathèse a été ajouté. Malheureusement, cet essai ne fût pas plus concluant et les deux produits de départ ont été récupérés séparément.

Aucune de ces études n'a été concluante pour l'obtention du [3]-rotaxane par « *capping* ». Dans le but de vérifier si le problème venait des conditions réactionnelles utilisées ou tout simplement de l'incapacité à former cette molécule enchevêtrée, la synthèse par « *clipping* » a été envisagée.

### 5.2.3 Synthèse du [3]-rotaxane par « *clipping* »

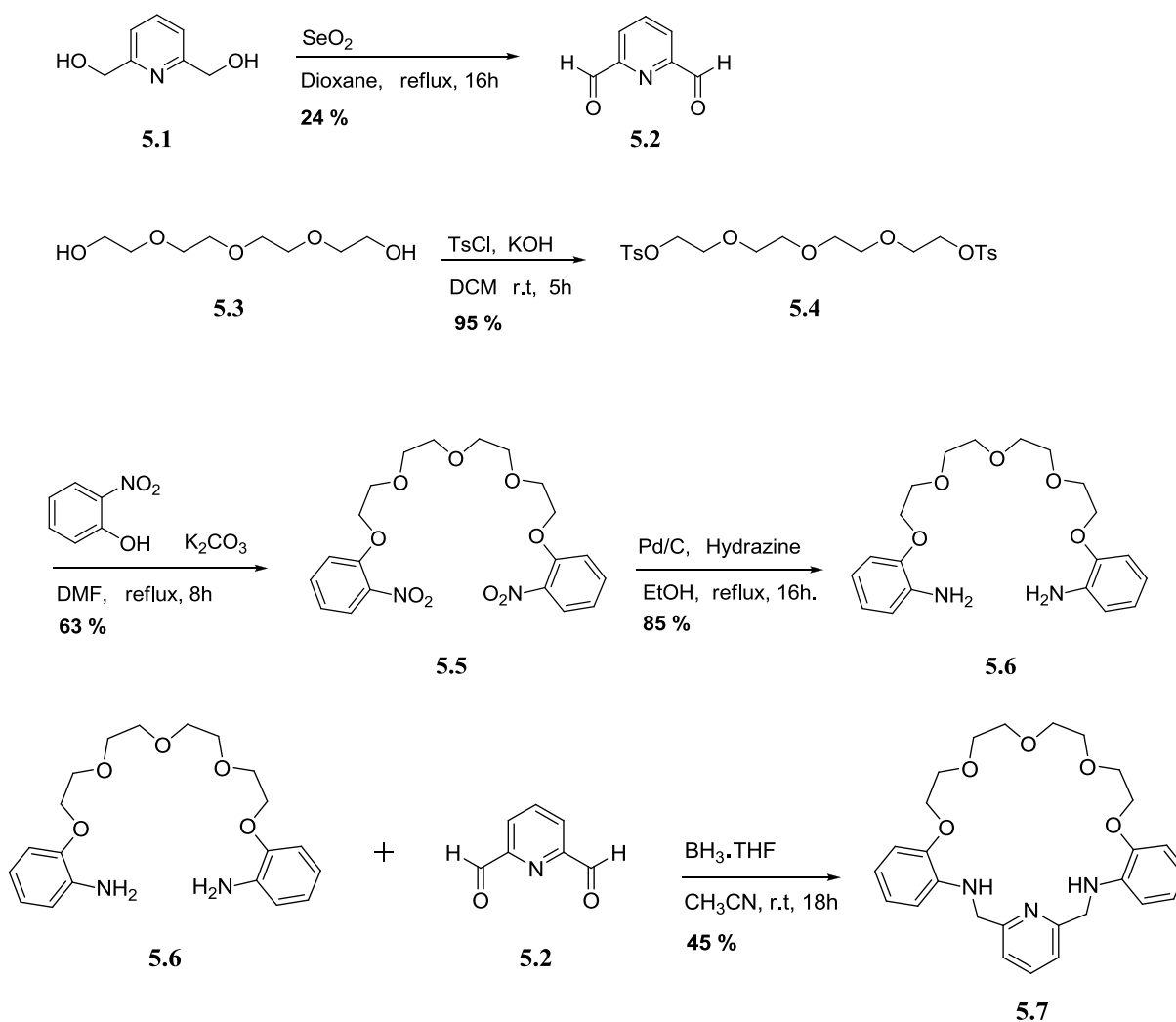
#### 5.2.3.1 Synthèse de la roue à cliper

La synthèse d'une roue analogue du DB24C8 permettant d'être clipée autour de l'axe a été réalisée (Figure 5.6). Elle est basée sur les travaux publiés par Stoddart *et al.*<sup>11, 12</sup> et sur ceux de Christine Chhun effectués pendant sa thèse<sup>13, 14</sup> et est rapportée dans le Schéma 5.1.



**Figure 5.6** : Assemblage du [3]-rotaxane par « *clipping* ».

Un premier fragment **5.2** permettra la fermeture du macrocycle par réaction avec le deuxième fragment déjà complexé sur le site ammonium de l'axe. Ce premier fragment est obtenu par oxydation de la 2,6-diméthanolpyridine (**5.1**) par l'oxyde de sélénium. Pour le deuxième fragment de la roue, le tétraéthylène glycol (**5.3**) est utilisé comme produit de départ. Il permet la formation de ponts hydrogènes entre les atomes d'oxygène et le site ammonium de l'axe. Les deux fonctions alcools primaires sont activées en tosylates (**5.4**) afin de permettre la réaction de substitution du 2-nitrophénol. La dernière étape de synthèse consiste à réduire les groupements nitros en groupements amines à l'aide d'hydrazine et de palladium sur charbon activé pour donner **5.6**. Un rendement de 50 % est obtenu après ces trois étapes de synthèse.



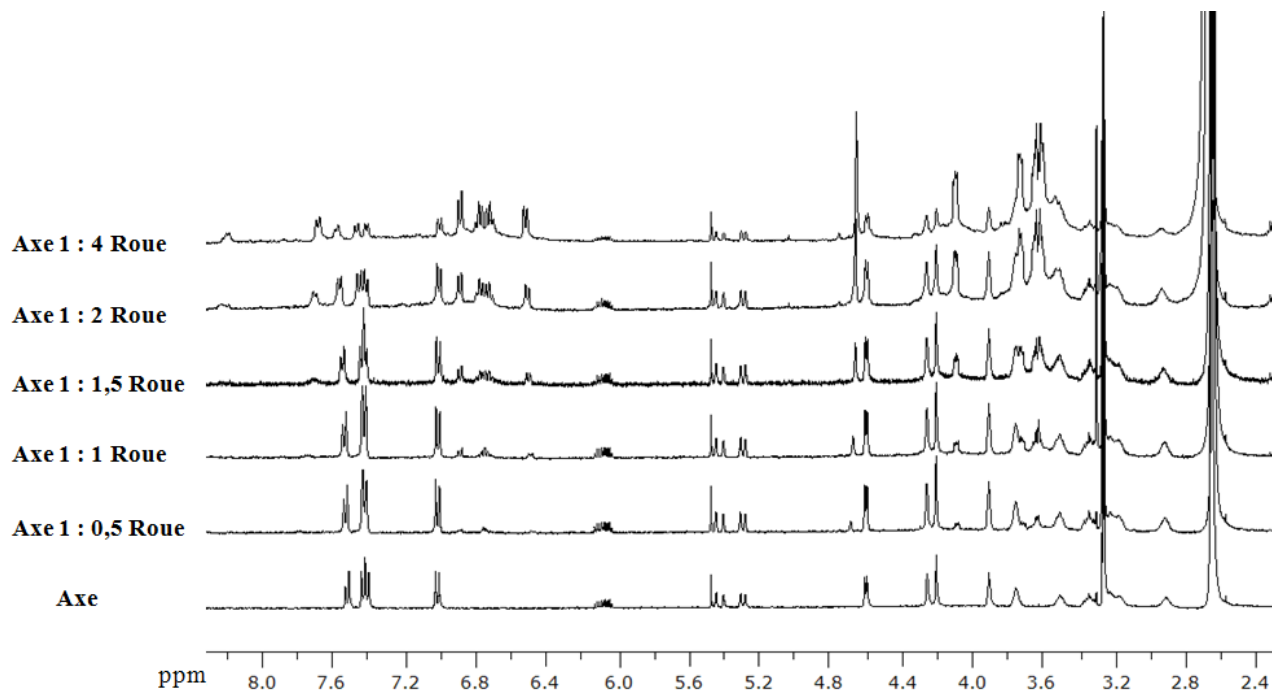
**Schéma 5.1** : Synthèse de la roue à cliper.

Les deux éléments qui constituent la roue sont capables de venir former des ponts hydrogènes avec le site de reconnaissance ammonium. Ainsi, l'axe sert de gabarit rapprochant les deux entités qui vont alors se cycliser. Les liens imines résultant de la condensation des aldéhydes de **5.2** et des amines de **5.6** sont ensuite réduits par ajout de  $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ , fixant ainsi la roue autour de l'axe.

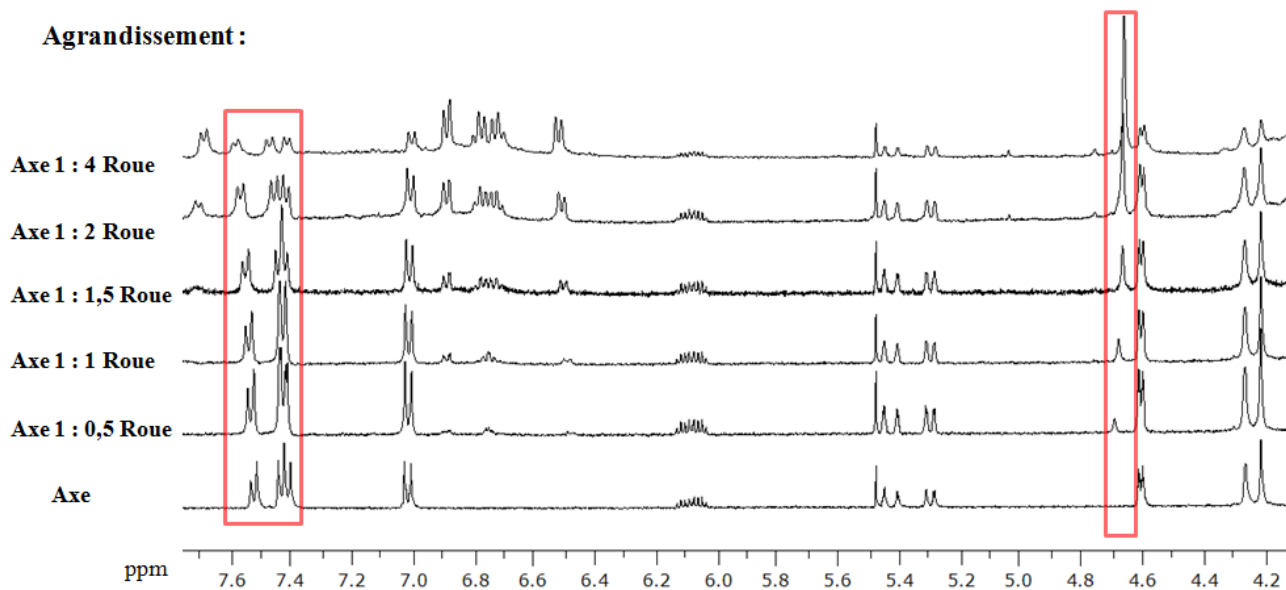
Il a également été observé que la roue **5.7** peut se former en l'absence de gabarit avec un rendement de 45 %.

### 5.2.3.2 Titrage RMN avec la roue **5.7** pour le « *clipping* »

Un nouveau titrage par RMN a été mené afin de confirmer la complexation entre la roue **5.7** et **UM** avant de procéder à la synthèse du [3]-rotaxane par « *clipping* ». Différents ratios des deux composés ont été solubilisés dans un mélange 9/1  $\text{CD}_3\text{CN}/\text{MeOD}$  et la variation des déplacements chimiques de certains protons a été suivie. Comme on peut observer dans la Figure 5.7, une concentration croissante de roue **5.7** induit un changement de multiplicité dans les protons aromatiques d'**UM** traduisant une modification de leur environnement chimique due à la présence de la roue. Ce changement d'environnement s'observe également sur les protons  $\text{CH}_2$  liés au noyau pyridine de la roue (à 4,65 ppm).



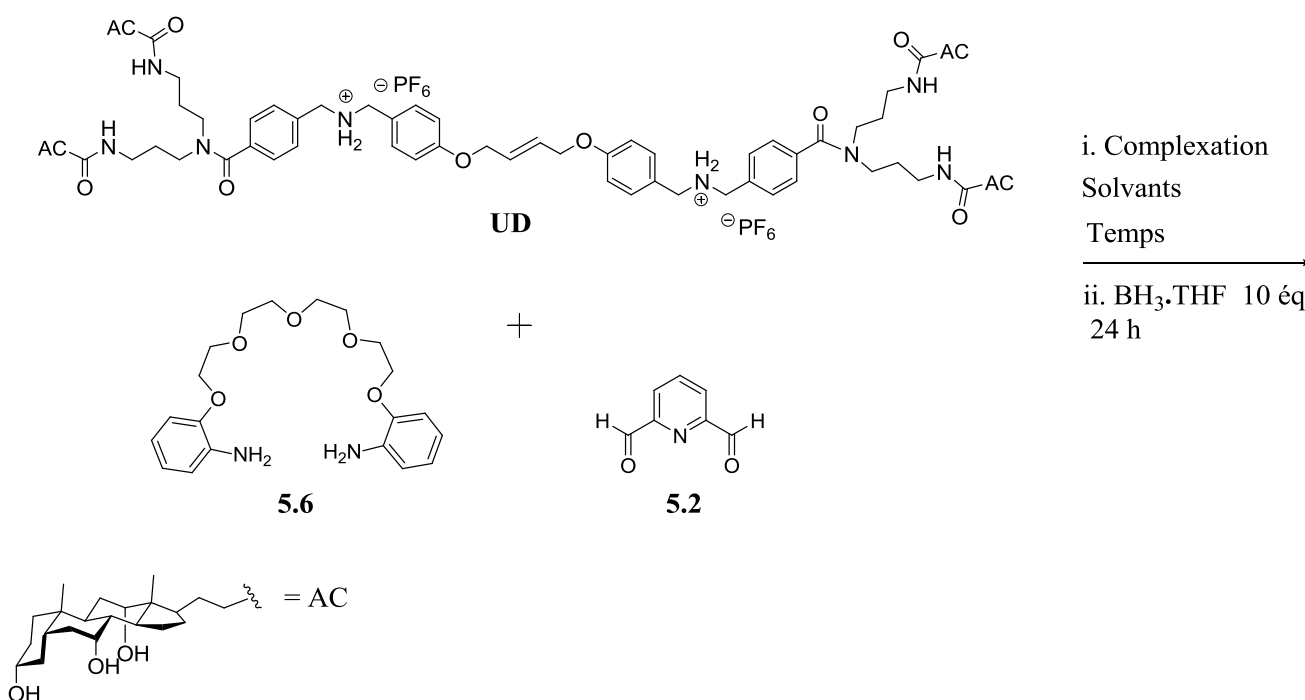
**Agrandissement :**



**Figure 5.7 :** a) Spectres RMN  $^1\text{H}$  400 MHz dans  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOD}$  9/1 de l'axe parapluie **UM** en présence de différentes concentrations de roue **5.7**. b) Agrandissement des spectres de titrage montrant le déplacement chimique  $\Delta\delta$  des protons de la roue et du changement de multiplicité des protons aromatiques de **UM**.

### 5.2.3.3 Assemblage du rotaxane par « clipping »

L'avantage d'utiliser la méthode de « clipping » de la roue est que l'axe du rotaxane, ici le dimère parapluie, est déjà synthétisé. Le solvant et les équivalents de chaque composé doivent de nouveau être optimisés. Pour la réduction du lien imine menant à la fixation de la roue autour du dimère, les conditions optimisées obtenues par C. Chhun ont été utilisées.<sup>15</sup> Dix équivalents de BH<sub>3</sub>.THF sont ajoutés et le mélange réactionnel est laissé 24 h supplémentaires à température ambiante.



<i>Essais</i>	<i>Roue</i>	<i>Clip</i>	<i>Solvants</i>	<i>Conditions</i>	<i>Résultats</i>
1	1 éq	1 éq	MeNO <sub>2</sub> /MeOH 1 : 1	i. 48 h à t.a.	0%
2	1 éq	1 éq	MeNO <sub>2</sub> /MeOH 8 : 2	Solubilisation du dimère à chaud i. 48 h à t.a.	0%

3	1 éq	1 éq	MeCN	Solubilisation du dimère à chaud i. 24 h à t.a.	0% <sup>a</sup> produits de départ + un peu de roue
4	1 éq	1 éq	MeCN/MeOH 1 : 1	i. 8 h à t.a.	0%
5	1 éq	1 éq	MeCN/MeOH 9 : 1	Solubilisation du dimère à chaud i. 24h à t.a.	0% produits de départ + un peu de roue
6	1 éq	1 éq	MeCN/EtOH 9 : 1	Solubilisation du dimère à chaud i. 24 h à t.a.	0% <sup>a</sup> produits de départ +un peu roue
7	2 éq	2 éq	MeCN/MeOH 9 : 1	Solubilisation du dimère à chaud i. 8 h à t.a.	0% <sup>a</sup> Dimère+ roue
8	3 éq	3 éq	MeCN/MeOH 9 : 1	Solubilisation du dimère à chaud i.8 h à t.a.	0% <sup>a</sup> Dimère+ roue
9	1,2 éq	1,2 éq	MeCN + pointe MeOH	i. 24 h à 40°C	0% <sup>a</sup> Trace de roue
10	2 éq	2 éq	DMF	Ajout lent du dimère à la roue i. 24 h à t.a.	0% <sup>a</sup>

<sup>a</sup>[3]-rotaxane non détecté par RMN<sup>1</sup>H après chromatographie préparative

**Tableau 5.2** : Optimisation de la formation du [3]-rotaxane par « *clipping* ».

Une des premières choses à noter est que la solubilité du dimère dans des solvants apolaires est nulle. Cela nous laisse peu de marge de manœuvre pour le choix du solvant à



utiliser pour les réactions de « *clipping* ». Ainsi, dans tous les tests où la proportion de solvant apolaire est majoritaire, une solubilisation du dimère à chaud avant l'ajout des autres réactifs est nécessaire (Tableau 5.2).

Dans un premier temps, deux mélanges MeNO<sub>2</sub>/MeOH et des quantités équimolaires de chaque réactif ont été utilisés pour former le rotaxane (essais 1 et 2). Dû à la mauvaise solubilité des réactifs dans ce mélange, même après 48h de complexation, aucun produit n'a été obtenu et les réactifs de départ sont retrouvés.

Étant donné ces résultats non concluants, le nitrométhane a été remplacé par l'acétonitrile. Le premier essai avec l'acétonitrile seul (essai 3) n'a pas permis l'obtention du [3]-rotaxane. Malgré la solubilisation du dimère à chaud, celui-ci précipite lorsque le solvant revient à température ambiante. Cependant, lors de cet essai, la formation d'un peu de roue dans le milieu a été observée. Ce résultat suggère que la roue peut se former même en absence de gabarit et que ce solvant est favorable aux interactions supramoléculaires au sein de la roue. Du méthanol a donc été ajouté afin de permettre une bonne solubilisation de l'axe dimère, (essai 4) cependant, aucun produit (rotaxane ou roue) n'a pu être récupéré. Ce résultat confirme que l'utilisation de solvant trop polaire interfère dans le rapprochement des fragments à former la roue entre eux. Lors des essais 5 et 6, un ratio 9/1 acétonitrile/solvant polaire (méthanol ou éthanol) a été testé pour la solubilisation de l'axe dimère à chaud avant l'ajout des fragments de la roue. De la roue libre a de nouveau été récupérée mais aucune trace du [3]-rotaxane n'a pu être observée.

Afin de favoriser la complexation de la partie éther couronne de la roue autour des sites de reconnaissance, une quantité plus importante des composés **5.2** et **5.6** a été ajoutée au mélange dans les essais 7 et 8. Malheureusement cela n'a permis l'obtention que de la roue et de l'axe dimère libre, ainsi que de nombreux sous produits dans le cas de l'essai 8, probablement due à la formation d'oligomères.

Un point essentiel a pu être tiré de tous ces résultats non satisfaisants. Le dimère parapluie peut être solubilisé à chaud dans des solvants au caractère plus apolaire, mais ne permet pas l'obtention du [3]-rotaxane. L'obtention de la roue dans le mélange suggère son

incapacité à s'approcher du site de reconnaissance sur l'axe. Cela suggère que le dimère parapluie doit être en conformation fermée où les motifs parapluies sont orientés vers l'axe, empêchant l'approche du composé **5.6**.

Ainsi, dans l'essai 9, la complexation a été réalisée pendant 24 h à 40 °C dans le but de favoriser la conformation ouverte du dimère permettant ainsi l'approche de la roue. Un léger excès des composés **5.2** et **5.6** a également été utilisé. Malheureusement, seulement des traces de roue ont été obtenues après 48 h de réaction.

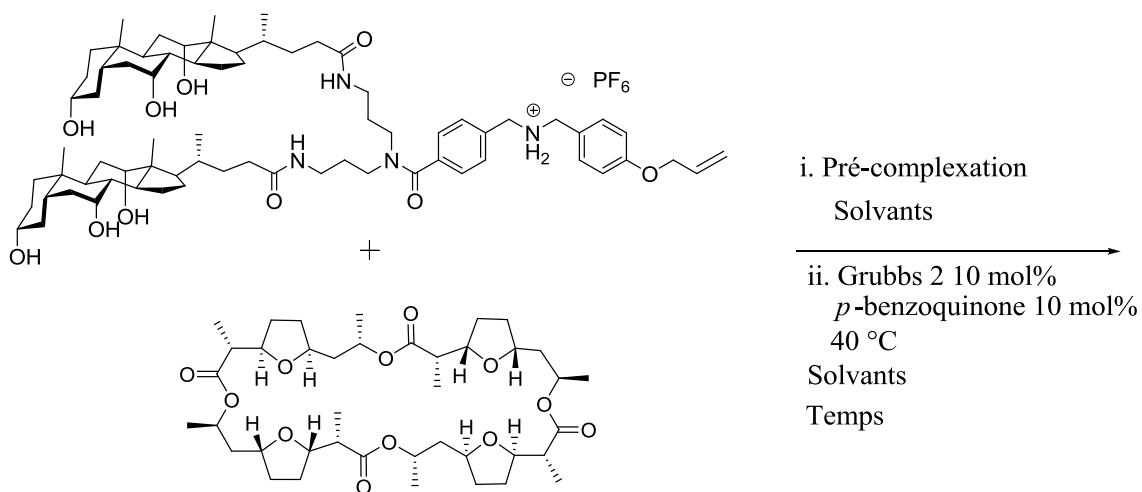
Un dernier essai totalement différent (essai 10) a été pensé. Le DMF a été utilisé ici car il permet une très bonne solubilisation du dimère en conformation ouverte. Une solution de ce dernier a été ajoutée goutte à goutte à **5.6** afin de forcer la complexation. Une fois l'ajout fini, **5.2** a été rajouté au mélange et la complexation a été laissée 24 h à température ambiante avant de rajouter le BH<sub>3</sub>.THF. Encore une fois, seuls les produits de départ ont été récupérés.

Ces différentes expériences ont permis de révéler les difficultés de cette méthode. L'acétonitrile est clairement le solvant le plus favorable pour la formation d'interactions supramoléculaires, mais il ne permet malheureusement pas une bonne solubilisation du dimère parapluie. L'ajout d'une petite quantité de solvant polaire peut la faciliter mais interfère également sur la formation de ponts hydrogènes entre les composés. Le repliement des parapluies sur l'axe doit bloquer le site ammonium limitant l'approche de la roue ou des différents fragments de roue.

#### **5.2.4 « *Capping* » de macrocycles biologiquement actifs : études préliminaires**

Si le parapluie se trouve principalement en conformation fermée, l'approche d'une roue ajustée à l'axe peut être difficile. Ainsi, il se pourrait que lors de nos précédents essais, le DB24C8 ou la roue **5.7** se serait uniquement rapprochés de l'axe sans pour autant se complexer autour de celui-ci dû aux gênes stériques apporté par le motif parapluie et l'oléfine terminale.

Afin de confirmer cela, l'utilisation d'un macrocycle ayant une cavité plus grande a été utilisée pour faciliter la formation du [3]-rotaxane. Une étude préliminaire a donc été menée avec la nonactine (macrocycle à 32 chaînons) à la place du DB24C8 (24 chaînons). L'utilisation d'une roue plus grande pourrait faciliter son insertion autour de l'axe puisqu'elle sera moins influencée par l'encombrement stérique apporté par l'oléfine terminale et des parapluies.



<i>Essais</i>	<i>Axe parapluie</i>	<i>Equiv. de nonactine</i>	<i>Solvants</i>	<i>Conditions</i>	<i>Résultats</i>
1	1 éq	1 éq	i.DCM/ MeOH 9:1 ii. DCM	i. 24 h à t.a ii. 48 h à t.a	0% <sup>a</sup> Dimère + nonactine
2	1,2 éq	1,2 éq	i.DCM/ MeOH 9:1 ii. DCM	i. 48 h à 40°C ii. 48 h à 40°C	0% <sup>a</sup> Dimère + nonactine

**Tableau 5.3 :** Tableau d'optimisation des conditions de synthèse du [3]-rotaxane avec la nonactine.

Comme dans la partie précédente (Chapitre 5.3.2.1) où le « *capping* » fut la méthode utilisée pour former le rotaxane, la réaction nécessite la présence du catalyseur de Grubbs 2. D'après les résultats précédents, le DCM est le solvant idéal pour cette réaction. Ainsi la complexation du pseudorotaxane a été menée dans un premier temps à température ambiante dans un mélange DCM/MeOH 9/1 (Tableau 5.3). Il est apparu qu'après quelques heures d'agitation, le mélange est devenu soluble probablement dû à la complexation des deux produits. Après évaporation du solvant, le mélange réactionnel a été repris dans du DCM et le catalyseur ainsi que la benzoquinone ont été ajoutés. Cependant, après purification, aucun rotaxane n'a été obtenu. La dimérisation a été réalisée une seconde fois (essai 2) avec un léger excès de nonactine à 40°C, mais aucune amélioration n'a été observée.

### 5.3 Conclusion

Ces nombreuses tentatives pour former le [3]-rotaxane par « *capping* » ou par « *clipping* » n'ont malheureusement donné aucun résultat positif. La solubilité du monomère et du dimère ainsi que l'encombrement stérique amené par le motif parapluie et par la roue sont des obstacles importants.

De la roue libre a pu être synthétisée durant ces expériences. Cela confirme la viabilité de la méthode de synthèse du rotaxane par « *clipping* » mais requiert d'autres ajustements afin de réussir à fixer le macrocycle autour de l'axe. La nécessité de trouver un solvant qui n'interfère pas dans les interactions supramoléculaires et qui permet l'ouverture totale des unités parapluies reste la clef de ce défi.

## 5.4 Références

1. S. A. Sieber and M. A. Marahiel, *J. Bacteriol.*, **2003**, *185*, 7036.
2. Z. Žižka, *Folia Microbiol.*, **1998**, *43*, 7.
3. J. E. Cox and N. D. Priestley, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 7976.
4. B. R. Kusche, A. E. Smith, M. A. McGuirl and N. D. Priestley, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 17155.
5. M. J. Hynes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1993**, 311
6. P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 1305.
7. Y. Tachibana, H. Kawasaki, N. Kihara and T. Takata, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 5093.
8. Z. Meng, J. F. Xiang and C. F. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 5652.
9. D. B. Smithrud, X. Wang, P. Tarapore and S. M. Ho, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 27.
10. A. K. Chatterjee, T. L. Choi, D. P. Sanders and R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11360.
11. J. Yin, S. Dasgupta and J. Wu, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 1712.
12. M. E. Belowich, C. Valente, R. A. Smaldone, D. C. Friedman, J. Thiel, L. Cronin and J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 5243.
13. C. Chhun and A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Comm*, **2011**, *2*, 987.
14. C. Chhun, J. Richard-Daniel, J. Kempf and A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem*, **2013**, *11*, 6023.
15. C. Chhun, Axe et Rotaxane Parapluie, vers de nouveaux transporteurs transmembranaires de chlorures et de médicaments cycliques, Ph. D Thesis, Université de Montréal, 2012.

## **Chapitre 6 : Conclusions et perspectives**

## 6.1 Bilan des travaux présentés

Le projet de recherche présenté ici s'est axé sur l'étude de deux familles de transporteurs transmembranaires. L'élaboration de deux nouveaux systèmes capables de transporter des anions et/ou des macrocycles biologiquement actifs ont été les lignes directrices de cette thèse.

Dans un premier temps, les propriétés anionophores d'un dérivé benzimidazole, le 2,4,7-triphénylbenzimidazole ont été étudiées. Une des premières observations fut la capacité du composé à transporter les anions sous sa forme déprotonnée, contrairement aux précédents travaux rapportés dans notre groupe sur les sels de benzimidazoles. Cette petite molécule planaire est capable de s'auto assembler en un canal plein à travers la membrane, permettant le transport d'anions sur la face extérieure de l'assemblage comme le long d'une vis. Suite à plusieurs études menées dans des liposomes, il a été démontré que le composé assure un transport d'ions chlorures à travers les membranes phospholipidiques avec une efficacité de l'ordre du  $\mu\text{M}$ .

Par la suite, des analogues de ce transporteur comportant des sites de complexation métalliques ont été synthétisés dans le but d'améliorer l'efficacité de cette famille de transporteurs. Ainsi un groupement pyridine et des acides carboxyliques ont été ajoutés à la structure du composé. Il s'est avéré que ces nouveaux composés seuls étaient moins efficaces que le 2,4,7-triphénylbenzimidazole pour le transport transmembranaire, mais que leur efficacité était grandement améliorée en présence d'un métal. Cette différence se traduit par la formation d'un complexe métallique directement dans la membrane formant de larges pores, favorisant le transport anionique. Ces complexes métalliques à base de Pd ont ensuite été testés dans des membranes plus complexes, telles que les membranes des bactéries à Gram-positifs (*Bacillus thuringiensis*). Il a été prouvé que le composé qui possède deux acides carboxyliques était capable d'inhiber la croissance bactérienne de cette souche. De plus, son complexe de palladium est également capable d'arrêter la croissance de ces bactéries et ce, à une concentration plus faible. Finalement, il s'est avéré que ce complexe était également très efficace pour diminuer la tolérance d'une bactérie résistante à son médicament (ici la tétracycline).

Alors que cette nouvelle famille de dérivés triphénylbenzimidazoles s'avère efficace pour le transport anionique, un autre système capable de transporter à la fois des anions et des macrocycles a été développé.

A la lumière des résultats obtenus par Christine Chhun lors de son doctorat dans le groupe sur l'élaboration d'axe et rotaxanes parapluie pour le transport transmembranaire, de nouveaux axes parapluie ont été synthétisés. Ces composés qui combinent les paramètres nécessaires pour le transport transmembranaire et des celles des molécules enchevêtrées, avaient pour objectif d'intégrer un macrocycle biologiquement actif dans leur structure sans dérivation préalable, faisant de ce système un concept novateur en terme de transporteur transmembranaire de grosses molécules.

Tout d'abord, le design et la synthèse d'un nouvel axe parapluie **UM** comportant une fonction terminale dimérisable ont été réalisés. Cette modification structurale devait permettre la dimérisation du pseudorotaxane préalablement formé par la complexation entre **UM** et un macrocycle biologiquement actif. Dans un premier temps, les conditions de dimérisation par couplage de métathèse ont été déterminées et le dimère parapluie **UD** obtenu a été caractérisé. Avant de complexer une roue autour de notre axe parapluie, la capacité d'**UD** à pénétrer les bicouches phospholipidiques a été étudiée. Les tests de transport transmembranaire réalisés dans des liposomes ont permis de démontrer que le dimère parapluie forme de larges pores à travers la membrane, assurant le transport d'ions chlorures. Sa capacité à transporter les ions bicarbonates a également été noté, contrairement à son homologue **UM**. Par la suite, une étude biologique a permis de révéler l'efficacité d'**UM** à inhiber la croissance bactérienne de souches à Gram-positifs telle que *B. thuringiensis* (MIC  $\approx$  10  $\mu$ M) et de limiter la croissance des bactéries à Gram-négatifs comme *E. coli*. Malheureusement, due à la faible solubilité d'**UD** dans le milieu de culture, aucune MIC n'a pu être déterminée pour ce composé envers les souches bactériennes testées.

Suite à ces résultats, les premiers tests de synthèse du [3]-rotaxane ont été effectués. En premier lieu, la réalisation d'un titrage par RMN entre **UM** et la nonactine a permis de confirmer la complexation supramoléculaire entre ces deux entités et une constante



d'association  $K_{\text{ass}} = 5400 \pm 1000 \text{ M}^{-1}$  a été calculée. L'association supramoléculaire ayant été démontrée, des tests de synthèse du [3]-rotaxane à partir d'une roue modèle, le DB24C8, ont été menés, afin de déterminer les conditions expérimentales idéales pour la synthèse du rotaxane par « *capping* ». Malheureusement, aucun résultat positif n'a été obtenu avec cette méthode de synthèse. En effet, nous avons démontré que des solvants polaires sont nécessaires à la solubilisation des dérivés parapluies, mais sont à éviter avec l'utilisation des catalyseurs de métathèse et aucun mélange de solvants favorable aux deux conditions n'a pu être trouvé.

Ainsi, la synthèse du rotaxane par « *clipping* » de la roue autour de l'axe a été privilégié pour confirmer la formation de la molécule enchevêtrée. Pour cela, une roue pouvant être clipée autour de l'axe a été synthétisée et les premières conditions expérimentales de synthèse par « *clipping* » de celle-ci autour d'UD furent testées. Cependant, aucun résultat concluant n'a pu être obtenu jusqu'à ce jour.

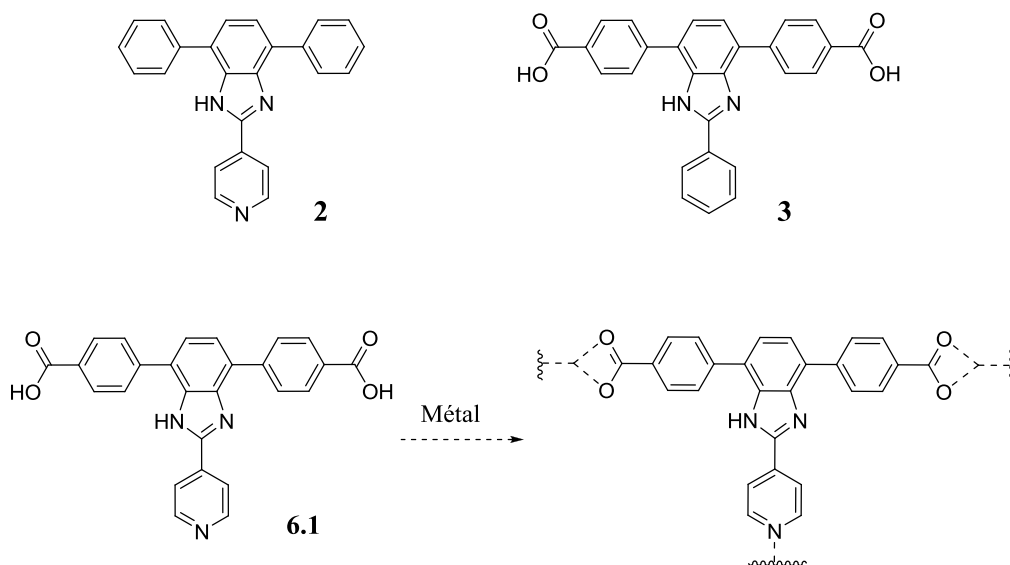
## 6.2 Perspectives

### 6.2.1 La famille des transporteurs 2,4,7-triphénylbenzimidazoles

Les premiers résultats obtenus à propos de l'utilisation des dérivés 2,4,7-triphénylbenzimidazoles et de leurs complexes métalliques comme transporteurs anioniques ou comme composé ayant des propriétés biologiques ouvrent la porte à de nouvelles études. Il serait intéressant de réaliser d'autres tests sur un plus grand nombre de souches bactériennes, afin de compléter l'étude du spectre d'activité des composés **2** et **3** et de leurs complexes de palladium. L'apparition de bactéries à Gram-négatifs résistantes aux médicaments ne fait qu'augmenter ces dernières années.<sup>1</sup> Ainsi, il serait intéressant de voir si nos composés possèdent une activité antimicrobiennes envers ces souches bactériennes parmi lesquelles on peut citer l'*Escherichia coli*, la *Klebsiella pneumoniae* ou le *Pseudomonas aeruginosa* qui sont les principales souches résistantes que l'on retrouve en milieu hospitalier.<sup>1</sup> Suite à ces travaux, des tests cytotoxiques devraient être menés afin de voir si nos composés possèdent une toxicité envers des cellules comme par exemple les cellules de rein, de foie ou de poumon.

Pour compléter cette analyse, une étude d'hémolyse sera également nécessaire pour déterminer leur toxicité envers les globules rouges.

D'un point de vue synthétique, le design d'un nouveau composé pourrait être envisagé. Après avoir observé que le complexe métallique  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  est le plus efficace pour le transport d'ions chlorures à travers les membranes et que  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  démontre la meilleure activité antibactérienne, la synthèse d'un nouveau composé regroupant les propriétés de ces deux complexes peut être réalisée (Figure 6.1).



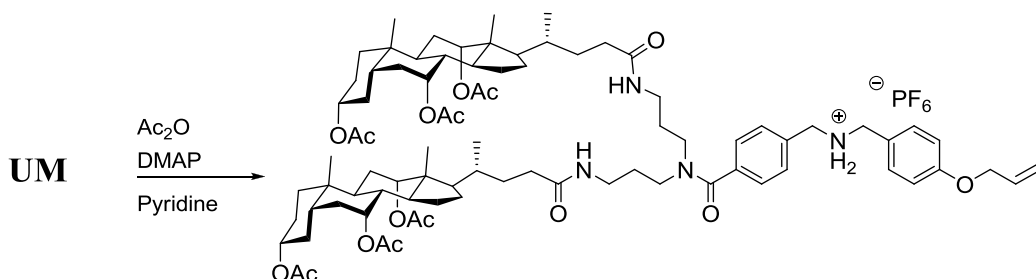
**Figure 6.1** : Structure d'un nouveau dérivé de la famille des 2,4,7-triphénylbenzimidazole.

La synthèse du composé **6.1** possédant 3 sites de complexation métallique (un groupement pyridine et deux acides carboxyliques) permettrait la formation d'un complexe métallique à deux dimensions. Celui-ci pourrait alors former des pores plus larges à travers la membrane phospholipidique, assurant ainsi un meilleur transport ionique. Son efficacité biologique envers des souches de bactéries à Gram-positifs et à Gram-négatifs pourra également être déterminée, afin de comparer son activité aux complexes déjà caractérisés ou bien à de nouveaux complexes obtenus avec de nouveaux métaux.

## 6.2.2 Le transport de macrocycles biologiquement actifs par les axes parapluies

Les résultats obtenus jusqu'ici pour le transport de macrocycles biologiquement actifs sont des résultats préliminaires et de nombreux aspects sont encore à étudier et à optimiser, afin d'obtenir un système opérationnel.

Dans un premier temps, en gardant l'idée de réaliser une dimérisation des pseudo-rotaxanes parapluies pour bloquer la nonactine autour de l'axe, une amélioration de la solubilité du système doit être envisagée. L'utilisation de solvants polaires est indispensable afin de permettre la solubilité des acides choliques, mais défavorise le couplage par métathèse. Ainsi, la protection des alcools des acides biliaires par des groupements acétyle aideraient la solubilisation de l'axe dans des solvants apolaires comme le dichlorométhane (Figure 6.2).

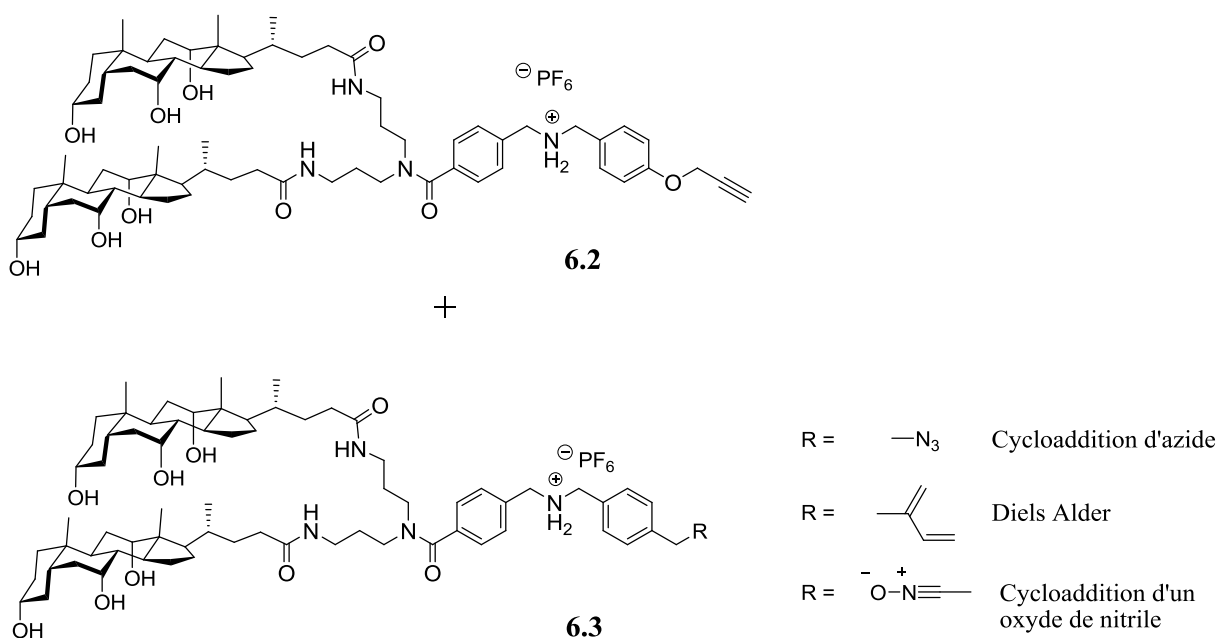


**Figure 6.2** : Acétylation de l'axe parapluie UM.

Cette modification devrait favoriser une conformation ouverte d'UM dans le DCM exposant le site de reconnaissance au milieu. L'approche de la roue sera facilitée et les conditions seront plus favorables pour la métathèse. Une fois le [3]-rotaxane obtenu, une déprotection des alcools sera nécessaire pour retrouver l'amphomorphisme des acides choliques.

D'un point de vue purement synthétique, la synthèse de l'axe parapluie pourrait être repensée et améliorée. L'assemblage par « capping » étant nécessaire pour intégrer divers macrocycles biologiquement actifs, une modification du groupement terminal d'UM pourrait être envisagé. Ces dernières années, l'utilisation de la chimie « click » a grandement été

utilisée dans le but d'assembler des rotaxanes.<sup>2</sup> Ainsi, en remplaçant l'alcène terminal d'UM par un alcyne terminal, celui-ci pourrait permettre un couplage de deux monomères parapluies par cycloaddition (Figure 6.3). Plusieurs voies de synthèses sont envisageables, comme par exemple la cycloaddition azyde/alcyne ou le couplage de Diels Alder (Figure 6.3). Bien entendu, il sera important de s'assurer que les conditions réactionnelles nécessaires à ces couplages n'influenceront pas sur la complexation entre l'axe et la roue. De plus, les deux monomères nécessaires à la cyclo-addition n'étant pas identiques, l'ajout d'étapes de synthèse sera inévitable à l'obtention de **6.2** et **6.3** Il faudra alors s'assurer que cela n'influencera pas trop le rendement final pour l'obtention du [3]-rotaxane.



**Figure 6.3 :** Design de deux nouveaux axes parapluie pour la synthèse d'un [3]-rotaxane par « capping » via une cycloaddition.

Outre l'amélioration de la synthèse du [3]-rotaxane, il sera également nécessaire d'apporter des modifications au système afin de le rendre biocompatible avant de procéder à des tests biologiques *in-vitro* et *in-vivo* et s'assurer de la capacité de diverses enzymes à le cliver afin de relarguer la roue.

### 6.3 Les projets dans leur contexte

La fibrose kystique est une maladie héréditaire incurable dont les seuls traitements qui existent à ce jour visent à améliorer la vie des patients.<sup>3</sup> Des médicaments sont donnés aux malades afin de soulager leurs douleurs, comme par exemple la prise d'anti-inflammatoires limitant la détérioration des poumons. Cependant, depuis une vingtaine d'années, de nombreux groupes de recherche travaillent sur l'élaboration de molécules capables d'agir à la source de la maladie en rétablissant le transport des ions chlorures à travers les membranes cellulaires. Actuellement, aucune de ces molécules n'a encore été approuvées pour le domaine pharmaceutique. Cependant, les résultats obtenus avec nos transporteurs de la famille des 2,4,7-triphénylbenzimidazoles pour le transport de chlorures sont prometteurs. La capacité de ces petites molécules à s'auto-assembler dans la membrane cellulaire et à y former des MOST en présence de sources métalliques est un important concept à explorer. Bien qu'ils ne dépassent pas l'efficacité de certains transporteurs déjà rapportés dans la littérature, leur mode d'action permettra d'aiguiller les futures recherches des scientifiques travaillant dans le domaine.

Le transport de médicaments *via* l'utilisation de rotaxanes parapluies est quant à lui encore à sa genèse. De nombreuses modifications doivent être apportées au système afin d'arriver à facilement incorporer un médicament cyclique à la structure du rotaxane et d'assurer son transport au travers des membranes cellulaires. Cependant, malgré la complexité du travail, le projet est ambitieux et d'actualité. La chimie supramoléculaire a récemment obtenu un prix Nobel en 2016 avec les travaux des professeurs Stoddart, Sauvage et Feringa sur les machines moléculaires. Bien que les avancées dans ce domaine relèvent encore de la chimie fondamentale, les premières applications des rotaxanes devraient voir le jour d'ici les prochaines années avec la mise au point de moteurs moléculaires, de muscles artificiels<sup>4</sup> ou encore de transporteurs de médicaments.

## 6.4 Références

1. K. S. Kaye and J. M. Pogue, *Pharmacother*, **2015**, 35, 949.
2. A. C. Fahrenbach and J. F. Stoddart, *Chem. Asian J.*, **2011**, 6, 2660.
3. R. Planells-Cases and T. J. Jentsch, *Biochim. Biophys Acta*, **2009**, 1792, 173.
4. C. J. Bruns and J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, 47, 2186.

## **Partie expérimentale**

## Liste des figures de la partie expérimentale

<b>Figure A1.1</b> : Comparison of chloride transport of 10 mol% of <b>2</b> in DPPC LUVs containing lucigenin.....	170
<b>Figure A1.2</b> : Comparison of chloride transport of 10 mol% of <b>2</b> in EYPC LUVs and in EYPC/cholesterol LUVs containing lucigenin. ....	171
<b>Figure A1.3</b> : Comparison of chloride transport of 10 mol% of <b>2</b> in EYPC LUVs containing lucigenin, in different external phosphate buffer.....	171
<b>Figure A2.1</b> : UV-visible spectra of <b>1</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of PdCl <sub>2</sub> solution in methanol .....	180
<b>Figure A2.2</b> : UV-visible spectra of <b>2</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of Pd(OAc) <sub>2</sub> solution in methanol .....	181
<b>Figure A2.3</b> : UV-visible spectra of <b>3</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of Pd(OAc) <sub>2</sub> solution in methanol. ....	181
<b>Figure A2.4</b> : UV-visible spectra of <b>2</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of RuCl <sub>3</sub> solution in methanol .....	182
<b>Figure A2.5</b> : UV-visible spectra of <b>3</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of RuCl <sub>3</sub> solution in methanol .....	182
<b>Figure A2.6</b> : UV-visible spectra of <b>2</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of HAuCl <sub>4</sub> solution in methanol .....	183
<b>Figure A2.7</b> : UV-visible spectra of <b>3</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of HAuCl <sub>4</sub> solution in methanol .....	183
<b>Figure A2 8</b> : UV-visible spectra of <b>2</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of AgBF <sub>4</sub> solution in methanol.....	184
<b>Figure A2.9</b> : UV-visible spectra of <b>3</b> in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> in presence of various concentrations of AgBF <sub>4</sub> solution in methanol.....	184
<b>Figure A2 :10</b> : UV-visible spectra in H <sub>2</sub> O (3 ml with 240 µl of liposomes, 120 µl of NaNO <sub>3</sub> ) of the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub> and the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub> with additional 0.5 eq of PdCl <sub>2</sub> .....	185



<b>Figure A2.11:</b> $^1\text{H}$ NMR of ligand <b>2</b> and its palladium complex $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$ in $\text{CDCl}_3$ .....	187
<b>Figure A2.12:</b> $^1\text{H}$ NMR of ligand <b>3</b> and formation of the palladium complex in DMSO. ....	188
<b>Figure A2.13 :</b> Mass spectrum of the $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$ obtained by mixing 1 equiv of <b>3</b> with 0.5 eq of $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ in DMSO. ....	189
<b>Figure A2.14 :</b> Kinetic experiment with different concentrations of <b>1</b> at room temperature.	193
<b>Figure A2.15 :</b> Hill plot analysis of <b>1</b> .....	193
<b>Figure A2.16 :</b> Kinetic experiment with different concentrations of <b>2</b> in liposomes.....	194
<b>Figure A2.17 :</b> Hill plot analysis of <b>2</b> .....	194
<b>Figure A2.18 :</b> Kinetic experiment with different concentrations of <b>3</b> in liposomes. ....	195
<b>Figure A2.19 :</b> Hill plot analysis of <b>3</b> .....	195
<b>Figure A2.20 :</b> Kinetic experiment with different concentrations of <b>1</b> in liposomes. 0.5 eq of $\text{PdCl}_2$ relative to the concentration of <b>1</b> was added at 250 s. ....	196
<b>Figure A2.21:</b> Hill plot analysis of <b>1</b> + 0.5 eq of $\text{PdCl}_2$ .....	196
<b>Figure A2.22:</b> Kinetic experiment with different concentrations of <b>2</b> in liposomes. 0.5 eq of $\text{PdCl}_2$ relative to the concentration of <b>2</b> was added at 250 s.....	197
<b>Figure A2.23 :</b> Hill plot analysis of <b>2</b> + 0.5 eq of $\text{PdCl}_2$ .....	197
<b>Figure A2.24 :</b> Kinetic experiment with different concentrations of <b>3</b> in liposomes. 0.5 eq of $\text{PdCl}_2$ relative to the concentration of <b>3</b> was added at 270 s.....	198
<b>Figure A2.25 :</b> Hill plot analysis of <b>3</b> + 0.5 eq of $\text{PdCl}_2$ .....	198
<b>Figure A2.26 :</b> Residual chloride efflux induced by 6.25 mol% of $\text{PdCl}_2$ in MeOH .....	199
<b>Figure A2.27 :</b> Addition of $\text{PdCl}_2$ in solution in MeOH at 270s in presence of 5 mol% of <b>1</b>	199
<b>Figure A2.28 :</b> Addition of $\text{PdCl}_2$ in solution in MeOH at 270s in presence of 5 mol% of <b>2</b> .....	200
<b>Figure A2.29 :</b> Addition of $\text{PdCl}_2$ in solution in MeOH at 270s in presence of 12.5 mol% of <b>2</b> . .....	200
<b>Figure A2.30 :</b> Addition of $\text{PdCl}_2$ in solution in MeOH at 270s in presence of 12.5 mol% of <b>3</b> . .....	201
<b>Figure A2.31 :</b> Residual chloride efflux induced by 6.25 mol% of $\text{RuCl}_3$ in MeOH.....	202
<b>Figure A2.32 :</b> Addition of $\text{RuCl}_3$ in solution in MeOH at 270s in presence of 12.5 mol% of <b>2</b> .....	202

<b>Figure A2.33</b> : Addition of RuCl <sub>3</sub> in solution in MeOH at 270s in presence of 12.5 mol% of <b>3</b>	203
<b>Figure A2.34</b> : Comparison of the chloride efflux induced by 12.5 mol% of <b>2</b> by 12.5 mol% of the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub> , and by 12.5 mol% the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub> followed by a new addition of a PdCl <sub>2</sub> aliquot (0.5 eq) at 270s	204
<b>Figure A2.35</b> : Comparison of the chloride efflux induced by 12.5 mol% of <b>3</b> , by 12.5 mol% of the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>3</b> ) and by 12.5 mol% the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>3</b> ) followed by a new addition of a PdCl <sub>2</sub> aliquot (0.5 eq) at 270s	204
<b>Figure A2.36</b> : Relative chloride transport activity of <b>1</b> at 5 mol%, and by <b>1</b> (5 mol%) followed by the addition of a PdCl <sub>2</sub> aliquot (2.5 mol%) at 270 s	205
<b>Figure A2.37</b> : Relative chloride transport activity of <b>2</b> at 12.5 mol%, and by <b>2</b> (12.5 mol%) followed by the addition of a PdCl <sub>2</sub> aliquot (6.25 mol%) at 270 s	206
<b>Figure A2.38</b> : Relative chloride transport activity of <b>3</b> at 12.5 mol% (relative to EYPC/cholesterol concentration 5mM) in blue, and by <b>3</b> (12.5 mol%) followed by the addition of a PdCl <sub>2</sub> aliquot (6.25 mol%) at 270 s	206
<b>Figure A2.39</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> induced by <b>1</b>	207
<b>Figure A2.40</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> induced by <b>2</b>	208
<b>Figure A2.41</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> induced by <b>3</b>	208
<b>Figure A2.42</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> induced by the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>2</b> ) <sub>2</sub>	209
<b>Figure A2.43</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> induced by the pre-formed complex Pd <sup>2+</sup> ( <b>3</b> )	209
<b>Figure A2.44</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> obtained after 24 h. 0.5 equivalents of PdCl <sub>2</sub> were added after 1 h of incubation of bacteria with ligand <b>2</b>	210
<b>Figure A2.45</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> obtained after 24 h. 0.5 equivalents of PdCl <sub>2</sub> were added after 1 h of incubation of bacteria with ligand <b>3</b>	210
<b>Figure A2.46</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> obtained after 24 h of incubation in presence of different concentrations of PdCl <sub>2</sub>	211
<b>Figure A2.47</b> : Dose-dependent growth inhibition of tetracycline-resistant <i>B. thuringiensis</i> obtained after 24 h of incubation with different concentration of tetracycline	212
<b>Figure A3.1</b> : <sup>1</sup> H NMR spectra of UM	224

<b>Figure A3.2</b> : $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>UM</b> .....	224
<b>Figure A3.3</b> : $^1\text{H}$ NMR spectra of <b>UD</b> .....	226
<b>Figure A3.4</b> : $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>UD</b> .....	226
<b>Figure A3.5</b> : Relative chloride transport activity of <b>UM</b> and <b>UD</b> at 13.5 mol% .....	230
<b>Figure A3.6</b> : Relative chloride transport activity of <b>UM</b> and <b>UD</b> at 13.5 mol% .....	230
<b>Figure A3.7</b> : Relative chloride transport activity of <b>UM</b> (left) and <b>UD</b> (right) at 13.5 mol% in EYPC liposome and EYPC/cholesterol.....	231
<b>Figure A3.8</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>Bacillus thuringiensis</i> by <b>UM</b> . .....	232
<b>Figure A3.9</b> : Dose-dependent growth inhibition of <i>Escherichia coli</i> by <b>UM</b> . .....	232

## Remarques générales

Tous les réactifs utilisés pour la réalisation de ces articles ont été achetés chez Sigma Aldrich ou Alfa Aesar et ont été utilisés sans aucunes purifications supplémentaires. Toutes les réactions anhydres ont été effectuées dans de la verrerie préalablement séchée à la flamme. Les solvants anhydres ont été obtenus par un système de purification de solvants GlassContour (Irvine CA).

Les solvants deutérés tels que CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>CN ou *d*<sub>6</sub>-DMSO ont été achetés chez CDN Isotopes. Les spectres RMN ont été effectués sur des spectromètres de type Bruker Avance 300, 400 et 700 MHz. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en ppm relativement au solvant deutéré utilisé et les constantes de couplage en Hertz (Hz). Les données ont été analysés grâce aux logiciels Spin Works 2.5 et TopSpin.

Les spectres de masse haute résolution (HRMS) ont été réalisés sur un spectromètre triple quadrupole TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific) du service de masse de l'université de Montréal. Les analyses MALDI-TOF ont été obtenues sur un MALDI TOF-TOF Ultraflexxtreme de Bruker avec une matrice «  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ».

Les phospholipides (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine EYPC et 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine DPPC) utilisés pour réaliser les tests de transport dans les liposomes proviennent d'Avanti Polar Lipids. Les expériences de transport menées par fluorimétrie ont été réalisées sur un spectromètre Varian Cary Eclipse possédant un contrôleur de température (Chapitre 2 et 4) ou *via* l'utilisation d'une micro-électrode de chlorure LIS-146CLCM. (Chapitre 3).

Les expériences de diffusion dynamique de la lumière (DLS) du chapitre 2 ont été effectuées sur un Malvern DLS ZetasizerNano ZS avec un laser He-Ne 633 nm et 4 mW.

Toutes les données de diffraction des rayons-X de monocristaux pour la résolution des structures cristallines ont été effectuées à 100 K. L'appareil utilisé pour la collectes des données est un Excillum Metaljet munit d'un diffractomètre Bruker. La source utilisée est une source au Gallium. Les structures ont été résolues par la méthode directe XT du logiciel Olex2 et affinées avec la méthode XL (minimisation des moindres carrés). Les fichiers CIF

comprenant toutes les données cristallographiques peuvent être obtenus sur les sites internet des éditeurs de chaque article présentés dans cette thèse.

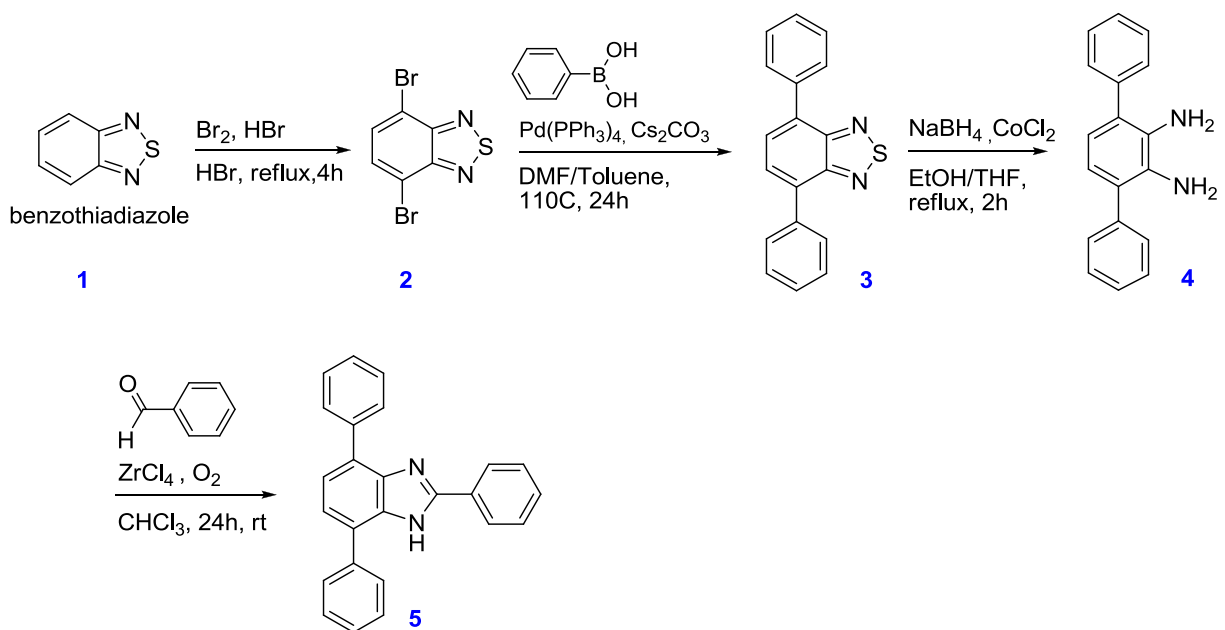
Les expériences d'activité antibactérienne ont été réalisées sur une lectrice de plaques Fluostar Optima. Les souches bactériennes utilisées (*Bacillus thuringiensis* HD73, HD73 possédant un plasmide PBESV et *Escherichia coli* (SK037)) proviennent du laboratoire du Pr. Joelle Pelletier de l'Université de Montréal.

**Annexe 1 : Partie expérimentale de l'article 1 :**

« 2,4,7-triphenylbenzimidazole : the monomeric unit of supramolecular helical rod-like transmembrane transporters »

## Synthesis

The general procedure to the synthesis of the 2,4,7-triphenylbenzimidazolium family was previously reported by the Loeb.



Compound 5 was prepared as previously reported and the characterization data was in accordance with the literature.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> N. Noujeim, K. Zhu, V. N. Vukotic and S. J. Loeb, *Org. Lett.*, **2012**, 2484

## **Ion transport**

### **Preparation of EYPC large unilamellar vesicles (LUVs) for lucigenin based assays**

A phospholipid film was formed by evaporating under vacuum at 25°C during 2 hours, a solution of 50 mg of EYPC in 1 ml of chloroform. The lipid film was then hydrated with 1 mL of a 2 mM lucigenin solution diluted in NaNO<sub>3</sub> (100 mM) and phosphate buffer (10 mM, pH = 6.4). The obtained suspension was subjected to 8 freeze/thaw/vortex cycles (1 cycle = 1 minute at -78°C followed by 1 minute at 35°C and 1 minute in vortex).. The solution was then extruded through a 100 nm polycarbonate membrane 21 times until the solution was transparent and passed down a Sephadex G-25 column to remove extravesicular lucigenin dye. The eluant was a solution containing 100 mM of NaNO<sub>3</sub> and 10 mM of phosphate buffer. 6.4 mL of liposome solution were isolated after separation. The stock solution was 10mM in lipid, assuming all EYPC was incorporated into the liposomes.

### **Chloride transport assays with EYPC LUVs**

A 50 µL aliquot of the solution of EYPC LUVs were added to a 2.5 mL gently stirred thermostated buffer solution containing 100 mM NaNO<sub>3</sub> and 10 mM phosphate salt (pH = 6.4). 100µL of NaCl solution 4M was added to the cuvette. The lucigenin fluorescence was monitored by excitation at  $\lambda_{\text{ex}} = 372$  nm and the emission was recorded at  $\lambda_{\text{em}} = 503$  nm. At t = 50 s, 50µL of solution of transporter at different concentrations in MeOH were added. At t = 300 s, 100 µL of a Triton-X 4% solution were added to lyse all liposomes and obtained the minimum of lucigenin fluorescence. The temperature was set to 37°C.

Experiments were repeated in triplicate and all the reported traces are the average of the three independent trials.

### **Preparation of DPPC LUVs for lucigenin based assays.**

The preparation of DPPC LUVs is based on the previous protocol of EYPC LUVs formation including the following modifications. The lipid film was formed by evaporating a chloroform solution containing 50 mg of DPPC under reduced pressure at 25°C. The 8 freeze/thaw/vortex cycles (1 cycle = 1 minute at 0°C followed by 1 minute at 45°C and 1 minute in vortex).



### **Chloride transport assays with DPPC LUVs.**

The chloride transport with DPPC LUVs is based on the procedure of chloride transport through EYPC LUVs described above, including the following modifications. The temperature of the experiments was set to 30, 35, 40 and 45°C

Experiments were repeated in triplicate and all the reported traces are the average of the three independent trials.

### **Preparation of EYPC/cholesterol 7/3 LUVs for lucigenin based assays.**

The preparation of EYPC/cholesterol (7/3, w/w, 60.8 mg LUVs) is based on the protocol of the preparation of EYPC LUVs described above.

### **Chloride transport assays with EYPC/cholesterol 7/3 LUVs.**

The chloride transport with EYPC/cholesterol 7/3 LUVs is identical to the chloride transport experiment through EYPC LUVs described above.

### **Preparation of EYPC LUVs for HPTS based assays.**

The preparation of EYPC LUVs for HPTS based assays is based on the protocol described above, including the following modifications. Internal buffer : 0.1 mM HPTS, 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH = 6.4. External buffer : 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH = 6.4.

### **HPTS assays with EYPC LUVs.**

The transport through EYPC LUVs is based on the procedure of chloride transport through EYPC LUVs described above, including the following modifications. The HPTS fluorescence was monitored by excitation at  $\lambda_{ex} = 403$  nm and  $\lambda_{ex} = 460$  nm and the emission was recorded at  $\lambda_{em} = 510$  nm

### Chloride transport assays with EYPC LUVs in different Phosphate buffer

The chloride transport assays with EYPC LUVs in different phosphate buffer was similar to the protocol describe previously. Different buffer solution containing 100 mM XNO<sub>3</sub> (X= Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NMe<sub>4</sub><sup>+</sup>) and 10 mM phosphate salt (pH = 6.4) were used.

### Conversion of fluorescence data into % of chloride Influx:

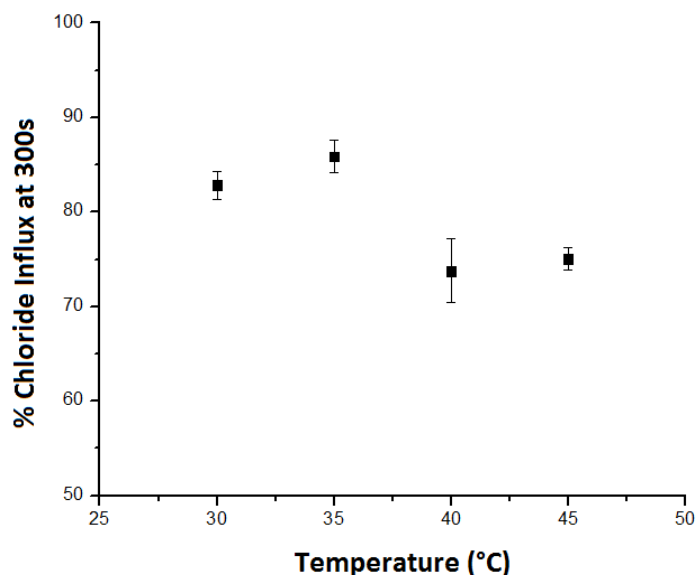
The residual fluorescence of the transporter is subtracted to each transport assays, then the curves are normalized using the following equation:

$$\% \text{ Cl}_{\text{influx}} = 100 * \frac{I - I_{\text{mini}}}{I_0 - I_{\text{mini}}}$$

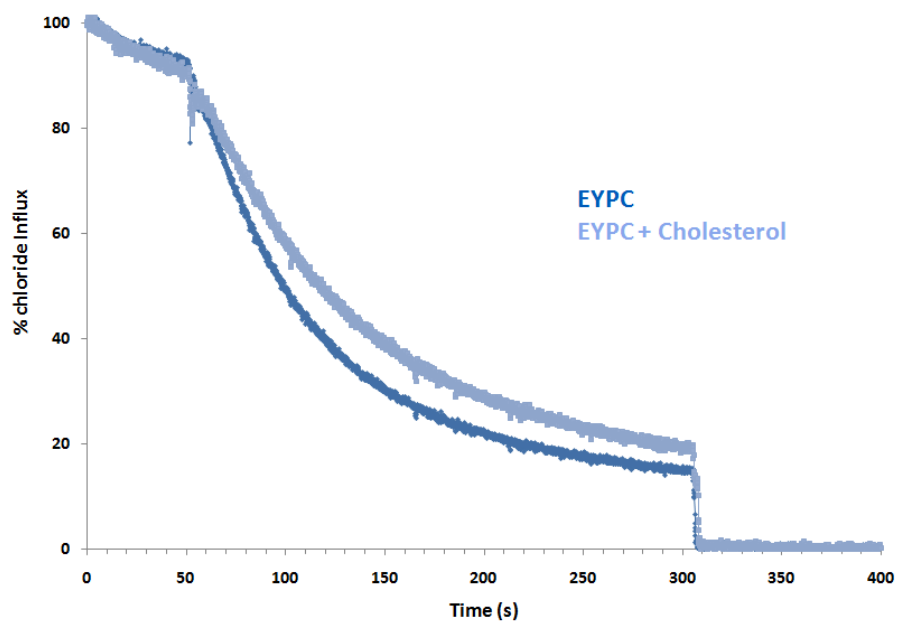
With I = fluorescence intensity

I<sub>0</sub> = fluorescence intensity before addition of the transporter

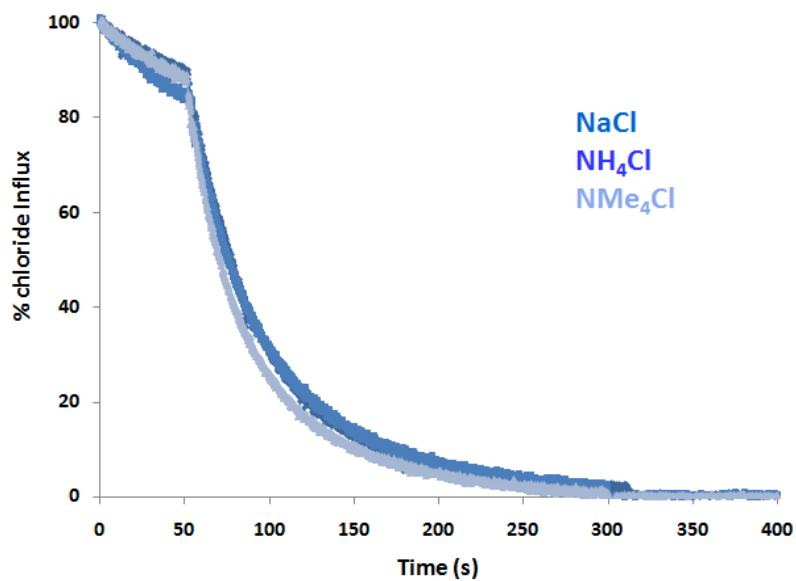
I<sub>mini</sub> = fluorescence intensity at the end of the experiment.



**Figure A1.1** : Comparison of chloride transport of 10 mol% of **2** in DPPC LUVs containing lucigenin.



**Figure A1.2** : Comparison of chloride transport of 10 mol% of **2** in EYPC LUVs and in EYPC/cholesterol LUVs containing lucigenin.



**Figure A1.3** : Comparison of chloride transport of 10 mol% of **2** in EYPC LUVs containing lucigenin, in different external phosphate buffer.

### **Dynamic Light Scattering (DLS):**

500  $\mu\text{L}$  of a phosphate buffer ( $\text{NaNO}_3$ , 100 mM and 10 mM phosphate buffer), 10  $\mu\text{L}$  of EYPC LUVs (without fluorescent dye) and 10  $\mu\text{L}$  of studied molecules were placed in a plastic cuvette. After shaken the sample by hand for 10 s, DLS measurements were taken.

The concentration of each molecule was given compare to lipid concentration.

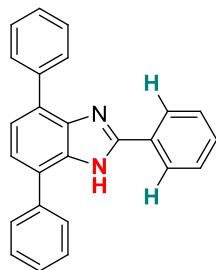
Intensity data from each sample were collected in three replicates.

Experiments	Liposomes	Liposomes + MeOH	Liposomes + triton X	<b>2</b> 30 mol%
Diameter (nm)	$116.0 \pm 0.1$	$120.3 \pm 0.1$	$8.9 \pm 0.6$	$134.6 \pm 0.2$

### **Kinetic studies in EYPC liposomes**

A 50  $\mu\text{L}$  aliquot of the solution of EYPC LUVs (10mM) were added to a 2.5 mL buffer solution containing 100 mM  $\text{NaNO}_3$  and 10 mM phosphate salt (pH = 6.4). 100  $\mu\text{L}$  of NaCl solution 4M was added to the cuvette. 50  $\mu\text{L}$  of solution of transporter 10 mol % in MeOH, relative to liposome concentration, were added. The fluorescence was monitored by excitation at  $\lambda_{\text{ex}} = 372$  nm and the emission was observed between  $\lambda_{\text{em}} = 400$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 800$  nm. Fluorescence spectra were taken at different time. The temperature was set to 37°C.

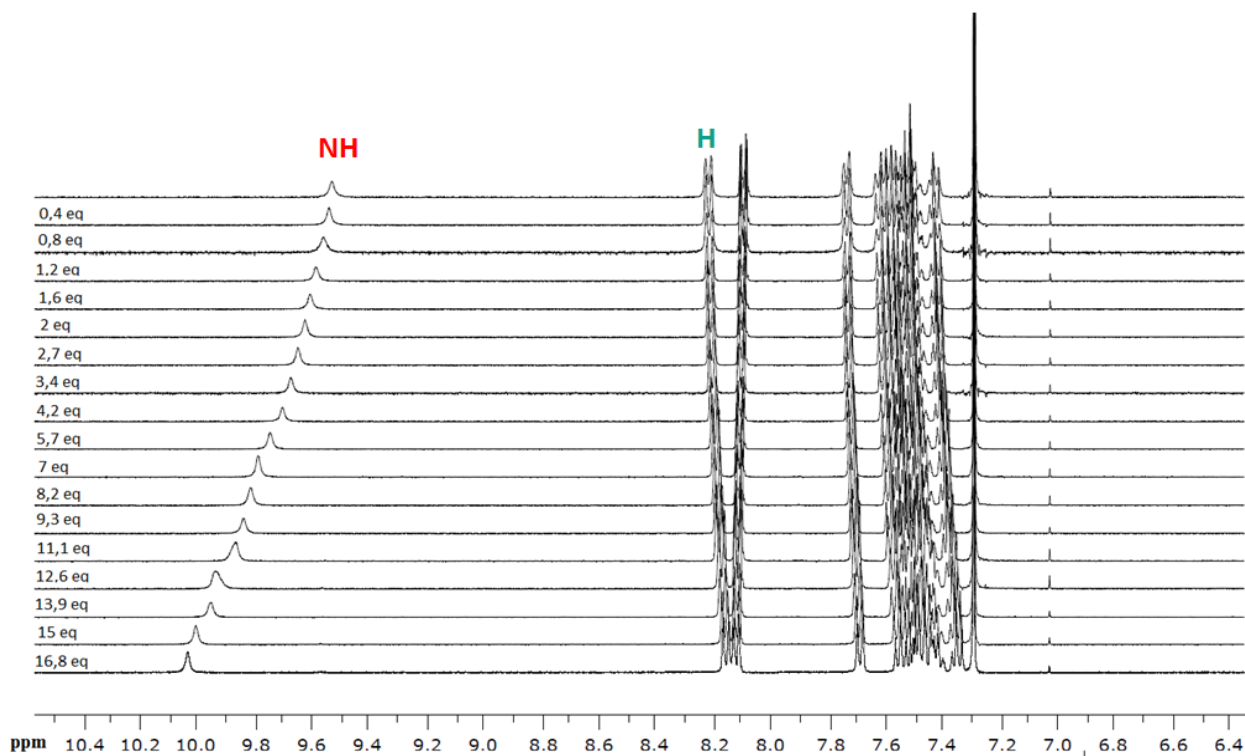
## $^1\text{H}$ NMR titrations of **2** with (a) TBACl and (b) TBAClO<sub>4</sub>.



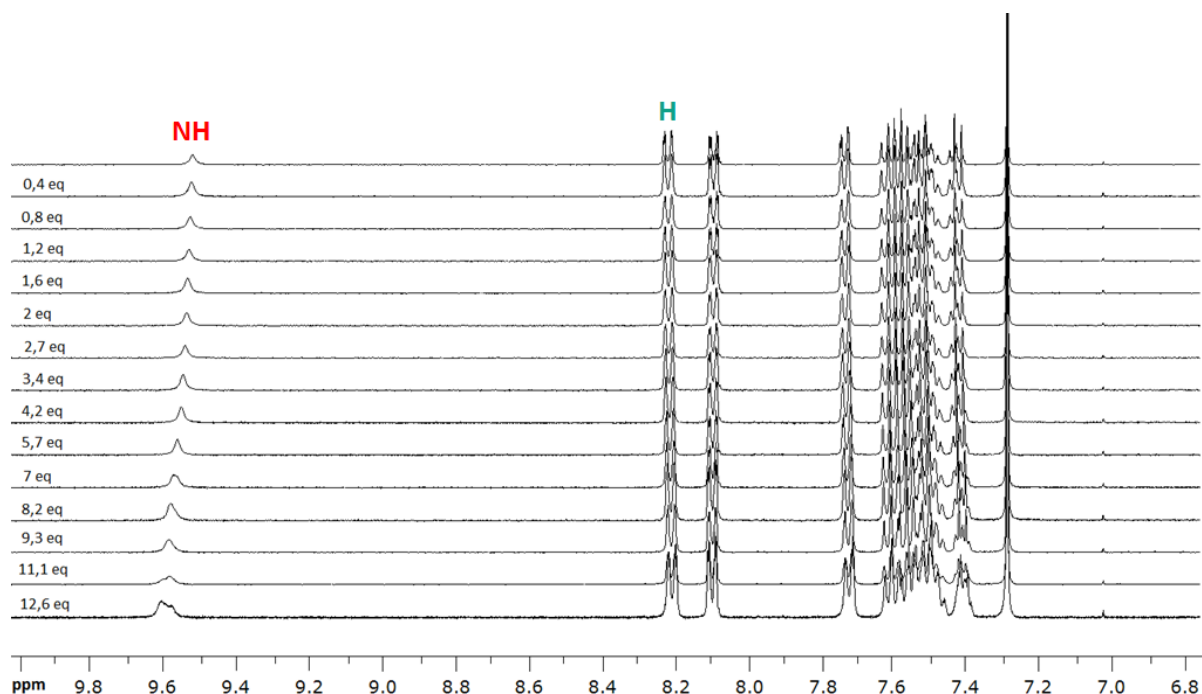
NMR titrations show a downfield shift of the secondary amine NH proton of the benzimidazole moiety in the presence of TBACl (a) and TBAClO<sub>4</sub> (b). The lower chemical shift (0.0862 ppm) obtained for the NH proton in the presence perchlorate can be explained by the size of the anion which prevents it to get closer from the benzimidazole moiety.

$K_{\text{ass}} \approx 10 \text{ M}^{-1}$  for  $\text{Cl}^-$  and  $\text{ClO}_4^-$

a)



b)



## Molecular modeling

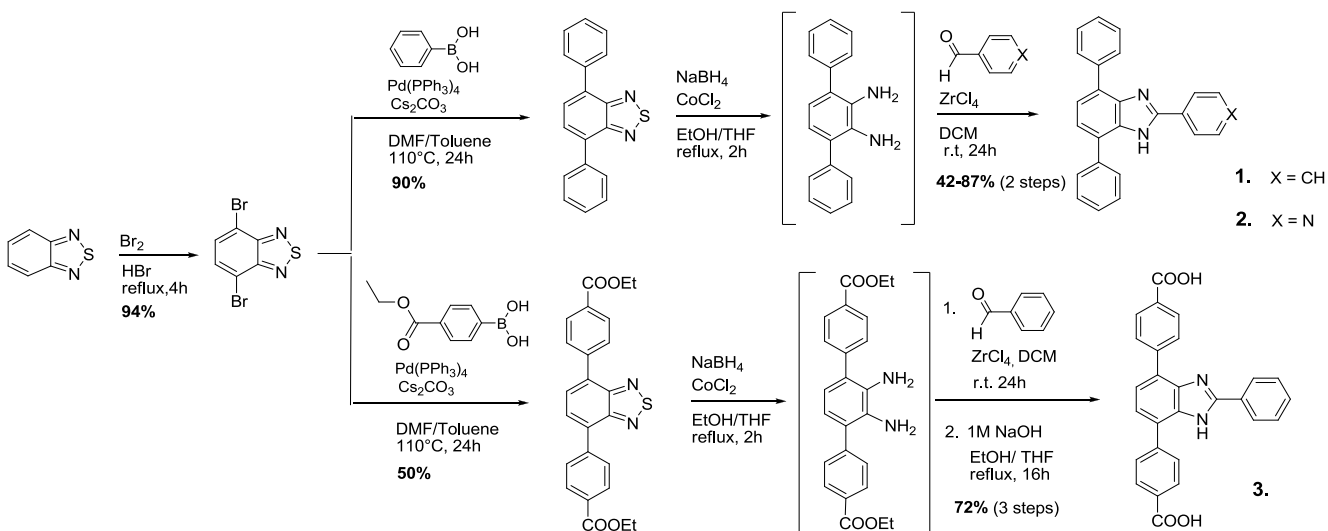
Calculations were performed on a Windows® XP workstation with HyperChem 7.5 software. The initial configuration of **2** was obtained from PM3 semi-empirical calculations. A model of the EYPC bilayer was constructed using 200 molecules of phosphatidylcholine, with different conformations and 15 Å layers of water molecules on each side, after a 500 ps molecular dynamics (MD) simulation at 1000 K. To investigate the self assembly of **2**, 4 monomers of **2** were positioned inside the EYPC bilayer and 200 ps MD simulation with periodic boundary conditions at 300 K was performed. The cutoff for non-bonded interactions was taken to be 12 Å throughout all simulations. At the beginning, we carried out high temperature annealed MD simulations starting at 1000 K (2 ps) annealing to 0 K (10 ps). Heating to 1000 K was necessary to enable the molecules to overcome energy barriers between different conformations and to prevent the system from getting stuck in a particular region of the conformational space. The simulations in aqueous solution were relaxed using the steepest descent method until a gradient difference of 0.01 kcal/mol was reached. After energy minimization of the system at 0 K, the MD simulation was initialized using a time step of 1 fs for 200 ps. The temperature was kept constant at 300 K yielding a canonical ensemble (NVT).

## **Annexe 2 : Partie expérimentale de l'article 2 :**

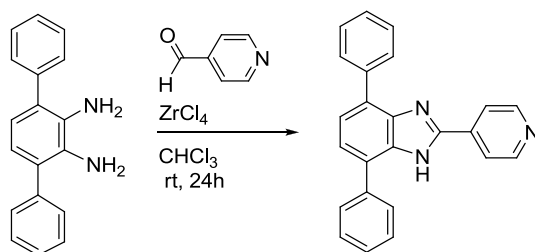
« Metal-organic synthetic transporters (MOST): from chloride transmembrane transport towards a new strategy to fight resistant bacteria »

## Synthesis

The general procedure for the synthesis of the 2,4,7-triphenylbenzimidazolium was previously reported by Loeb *et. al.*<sup>2</sup> The synthesis and characterization of **1** have been reported in this paper and is not show here.



## Synthesis of 2:



3,6-diphenylbenzene-1,2-diamine (1 eq, 1.4 mmol, 374 mg), 4-pyridinecarboxaldehyde (1 eq, 1.4 mmol, 154 mg) and zirconium tetrachloride (ZrCl<sub>4</sub>) (0.1 eq, 0.14 mmol, 3.3 mg) were dissolved in chloroform (10 ml) and stirred at room temperature for 48h. The solution was filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, DCM:MeOH 95:5) to give an orange solid. (204 mg, 42 %)

<sup>2</sup> N. Noujeim, K. Zhu, V.N. Vukotic, S.J. Loeb, *Org Lett.*, **2012**, 2484.

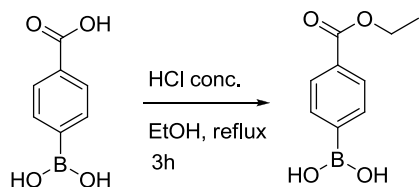


$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta = 9.74$  (br. s., 1 H), 8.79 (dd,  $J=4.8, 1.8$  Hz, 2 H), 8.19 (br. s., 2 H), 7.98 (dd,  $J=4.4, 1.5$  Hz, 2 H), 7.42 - 7.79 (m, 10 H) ppm

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz):  $\delta = 150.7, 150.5, 142.2, 138.3, 137.5, 129.4, 129.0, 128.8, 127.9, 124.5, 121.7$  ppm

HR-MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) $_{\text{calc}} = 348.1495$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) $_{\text{found}} = 348.1496$

#### 4-Ethoxycarbonylphenylboronic acid



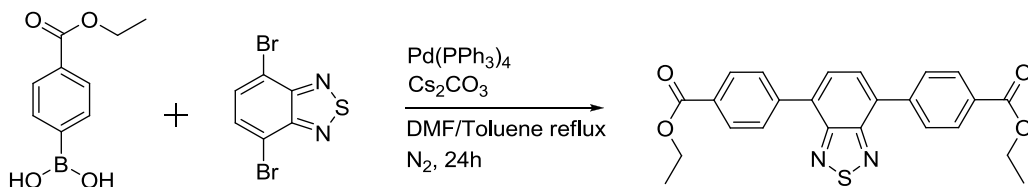
In a round flask were added 4-carboxyphenylboronic acid (1 eq, 1.2 mmol, 200 mg) and two drops of  $\text{HCl}_{\text{conc.}}$  in ethanol. The solution was heated to reflux during 3h, cooled to room temperature and evaporated under vacuum. The white product was purified by flash chromatography ( $\text{SiO}_2$ , 100% DCM) to give a white solid. (193 mg, **83%**)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):  $\delta = 8.22$  (d,  $J = 8$  Hz, 2 H), 8.13 (d,  $J = 8$  Hz, 2 H), 4.42 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 1.45 ppm (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H) ppm

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz):  $\delta = 165.6, 135.1, 133.8, 128.4, 128.1, 60.5, 13.5$  ppm

HR-MS: ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) $_{\text{calc}} = 194.0859$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) $_{\text{found}} = 194.0854$

#### 4,7-Bis(p-ethoxycarbonylphenyl)-2,1,3-benzothiadiazole



4,7-Dibromo-2,1,3-benzothiadiazole (1 eq, 1 mmol, 249 mg), 4-ethoxycarbonylphenylboronic acid (2.5eq, 2.5 mmol, 482 mg),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (2.5 eq, 2.5 mmol,

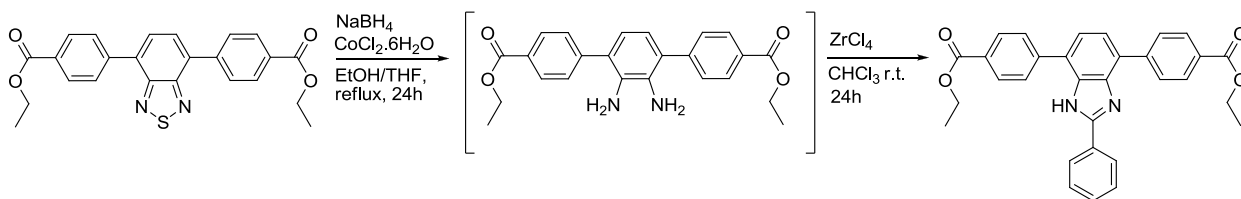
749 mg) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.05 eq, 0.05 mmol, 58 mg) were dissolved in 20 mL of anhydrous DMF and 20 mL toluene. The solution was heated at 110 °C for 24 h under nitrogen. The reaction mixture was cooled to room temperature, filtered through Celite® and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, 100% DCM) to give a yellow solid (200 mg, **46%**)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ = 8.6 (d, *J*<sub>1</sub> = 5 Hz, 4 H), 8.09 (d, *J*<sub>1</sub> = 5 Hz, 4 H), 7.90 (s, 2 H), 4.47 (q, *J*<sub>1</sub> = 15 Hz, 4 H), 1.47 (t, *J*<sub>1</sub> = 10 Hz, 6 H) ppm

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz): δ = 166.4, 153.9, 141.5, 133.0, 130.3, 129.9, 129.2, 128.5, 61.1, 14.4 ppm

HR-MS: (M+H)<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 433.1222 (M+H)<sup>+</sup><sub>found</sub> = 433.1221

#### 4,7-Bis(*p*-ethoxycarbonylphenyl)-2-phenylbenzimidazole



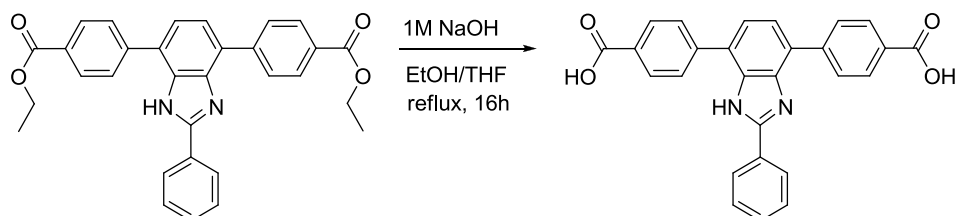
To a solution of 4,7-bis(*p*-ethoxycarbonylphenyl)-2,1,3-benzothiadiazole (1eq, 0.46 mmol, 200mg) in EtOH/THF 3/1 (40 ml) was added sodium borohydride (9 eq, 0.42 mmol, 157mg) and cobalt chloride hexahydrate (0.02 eq, 9.10<sup>-3</sup> mmol, 2 mg). The mixture was heated to reflux during 2h. The solution was cooled to room temperature, filtered and evaporated under vacuum. The pale solid was suspended in H<sub>2</sub>O and extract with dichloromethane (3x 20 ml) to give the di-amine. The diamine (1eq, 0.41 mmol, 165mg) was directly dissolved in dichloromethane (20 ml) and benzaldehyde (1 eq, 0.41 mmol, 41 μl) and zirconium tetrachloride (0.1eq, 4.1.10<sup>-2</sup> mmol, 9 mg) were added. The mixture was stirred at room temperature for 24 h before to be evaporated. The crude product was finally purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH 100/0 to 98/2) to give an orange oil (153 mg, **77%**)

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ = 8.22 (m, 2 H), 7.97 (m, 8 H), 7.47 (m, 3 H), 7.39 (m, 2 H), 4.36 (q, *J*<sub>I</sub>= 12 Hz, 4 H), 1.43 (t, *J*<sub>I</sub>= 8 Hz, 6 H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz): δ = 166.7, 153.0, 148.1, 147.8, 142.9, 132.81 130.2, 129.9, 129.1, 128.8, 128.6, 127.2, 122.8, 61.1, 14.4 ppm

**HR-MS:** (M+H)<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 491.1965 (M+H)<sup>+</sup><sub>found</sub> = 491.1981

### Synthesis of 3:



To 4,7-bis(p-ethoxycarbonylphenyl)-2-phenylbenzimidazole (1 eq, 0.31 mmol, 153 mg) in EtOH/THF 3/1 (40 ml) was added 1M NaOH solution (4 eq, 1.2 mmol, 70 mg) and the mixture was heated to 70°C during 16 h before to be evaporated under vacuum. The crude product was dissolved in water and acidified with HBF<sub>4</sub> until a pH value of 6-7. The precipitate was then filtered off and dried under vacuum to give a yellow product. (126 mg, 93%)

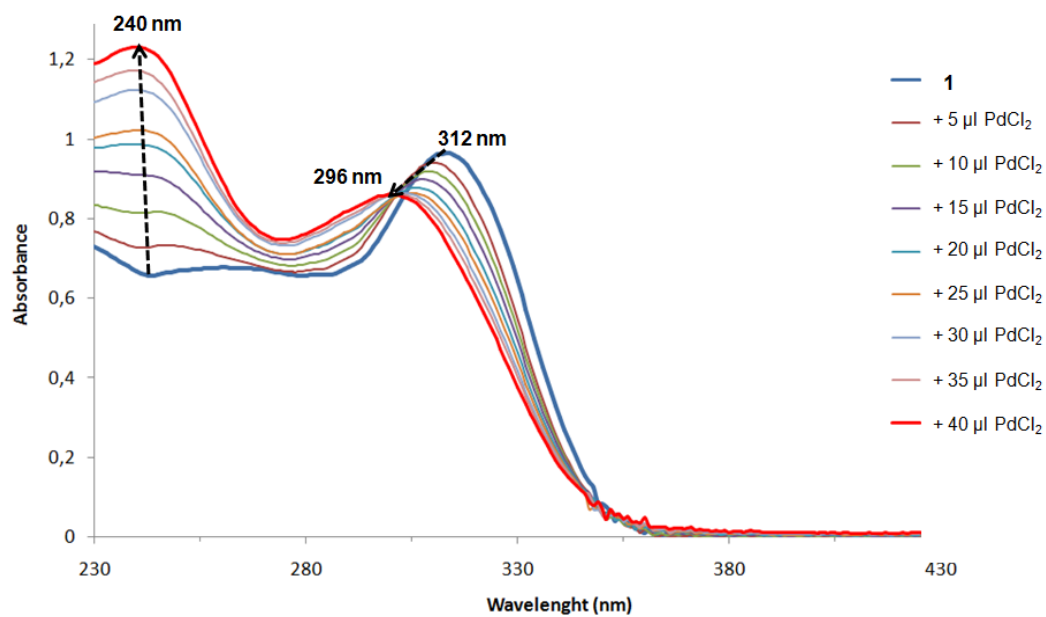
**<sup>1</sup>H NMR** (DMSO, 300MHz): δ = 13.01 (s, 2H), 8.32 (d, *J*<sub>I</sub>= 9 Hz, 2 H), 8.15 – 8.11(m, 7 H), 7.43 - 7.59 ppm (m, 6 H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO, 75MHz): δ = 167.7, 153.5, 147.6, 142.5, 130.6, 130.3, 130.1, 129.3, 129.1, 128.0 ppm

**HR-MS:** (M+H)<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 435.1339 (M+H)<sup>+</sup><sub>found</sub> = 435.1335

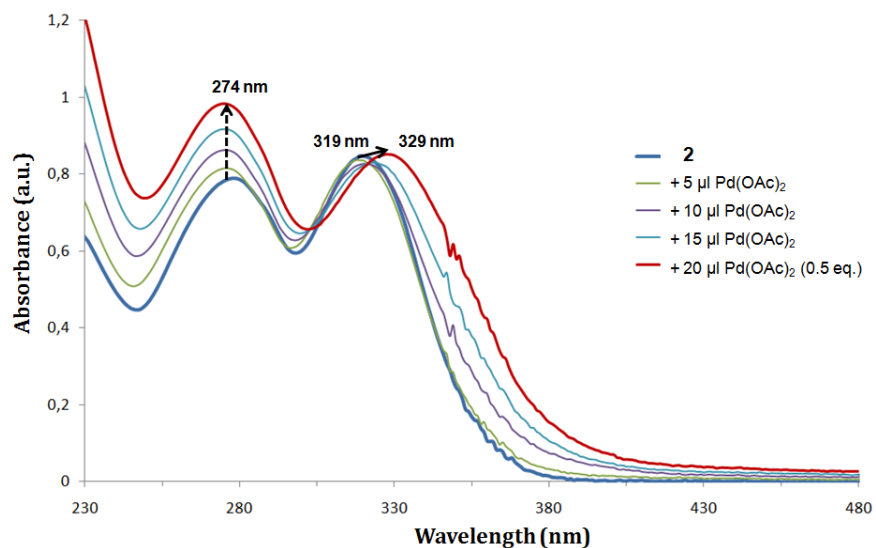
## UV-vis spectra:

### Addition of PdCl<sub>2</sub> to ligand **1**

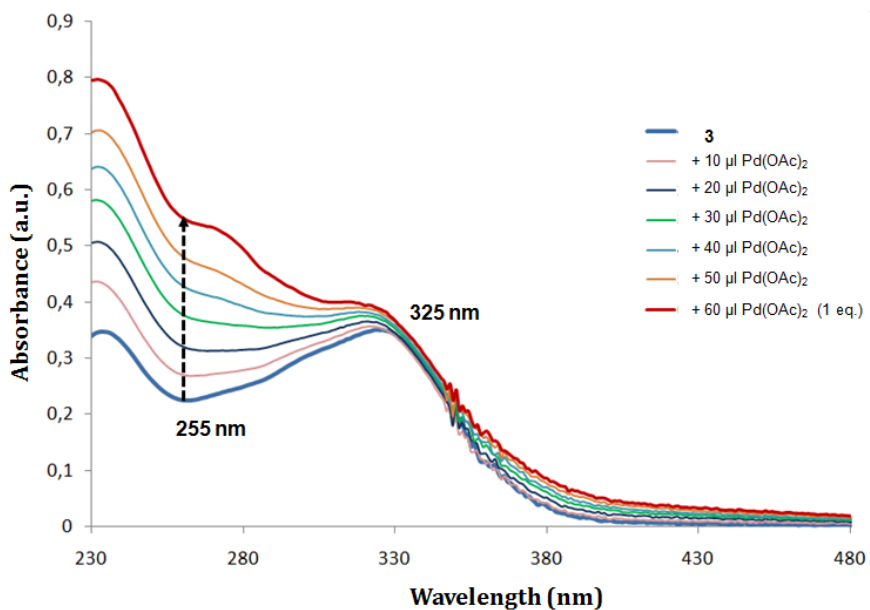


**Figure A2.1** : UV-visible spectra of **1** (final concentration 0.033 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of PdCl<sub>2</sub> solution in methanol (2.5 mM). Final concentrations of PdCl<sub>2</sub> between 0.004 mM and 0.04 mM.

### Addition of Pd(OAc)<sub>2</sub>

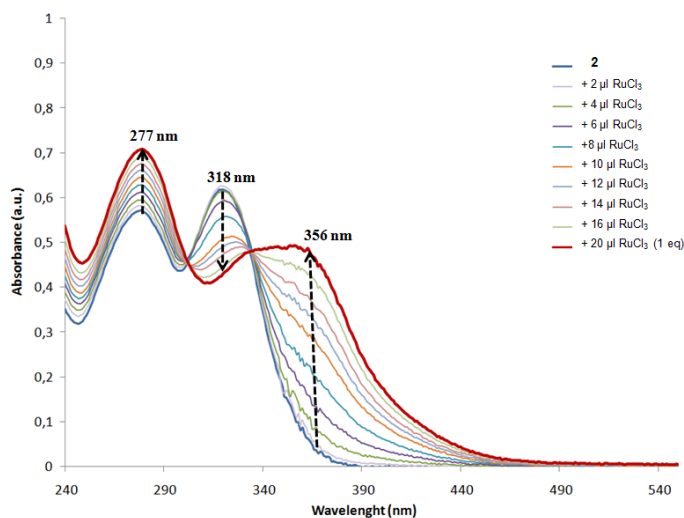


**Figure A2.2 :** UV-visible spectra of **2** (final concentration 0.033 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of Pd(OAc)<sub>2</sub> solution in methanol (2.5 mM).

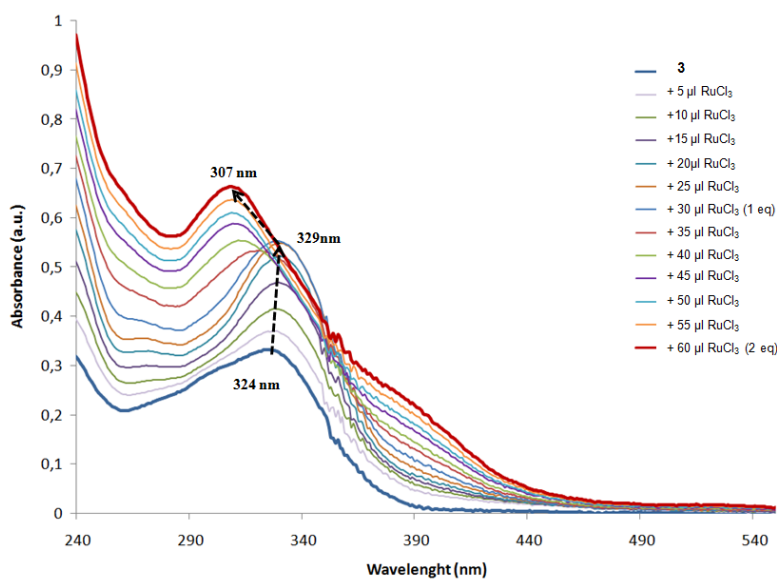


**Figure A2.3 :** UV-visible spectra of **3** (final concentration 0.05 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of Pd(OAc)<sub>2</sub> solution in methanol (2.5 mM).

## Addition of RuCl<sub>3</sub>

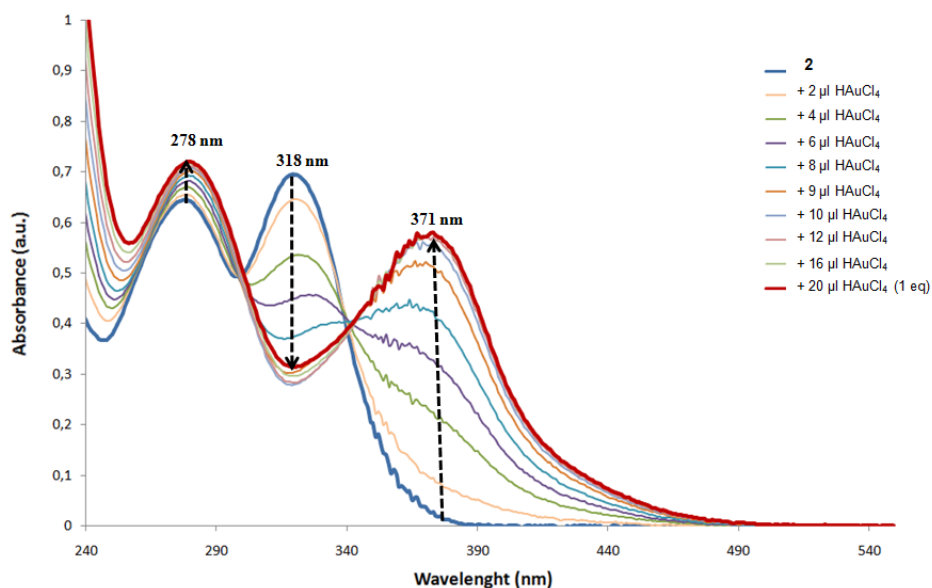


**Figure A2.4:** UV-visible spectra of **2** (final concentration 0.033 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of RuCl<sub>3</sub> solution in methanol (5 mM). Final concentrations of RuCl<sub>3</sub> between 0.0033 mM and 0.033 mM

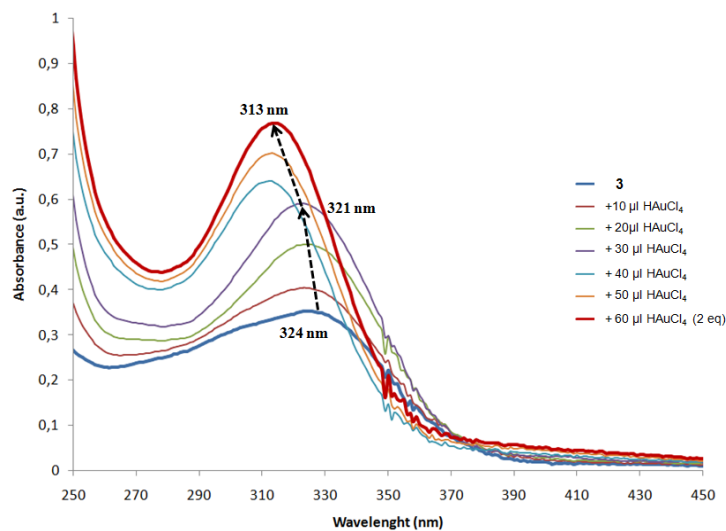


**Figure A2.5 :** UV-visible spectra of **3** (final concentration 0.05 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of RuCl<sub>3</sub> solution in methanol (5 mM). Final concentrations of RuCl<sub>3</sub> between 0.008 mM and 0.1 mM

## Addition of HAuCl<sub>4</sub>

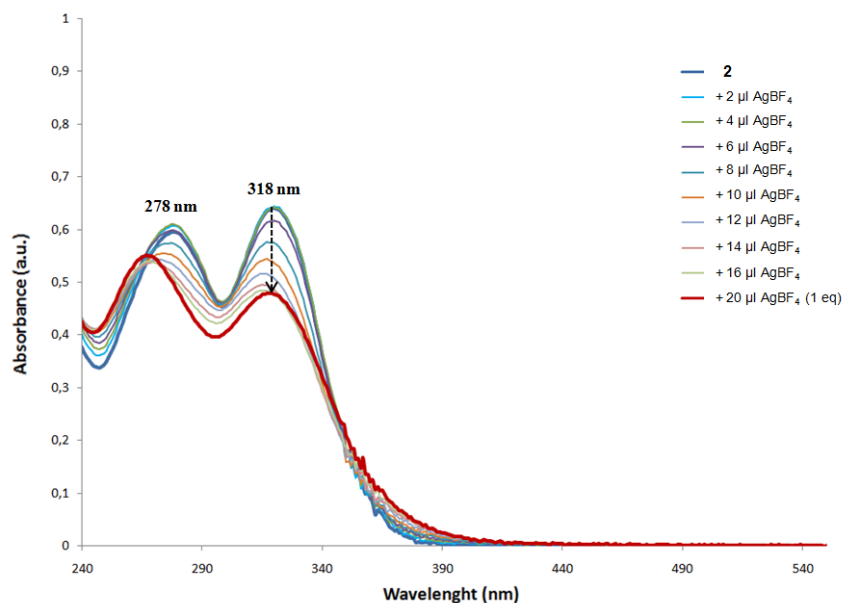


**Figure A2.6** : UV-visible spectra of **2** (final concentration 0.033 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of HAuCl<sub>4</sub> solution in methanol (5 mM). Final concentrations of HAuCl<sub>4</sub> between 0.0033 mM and 0.033 mM

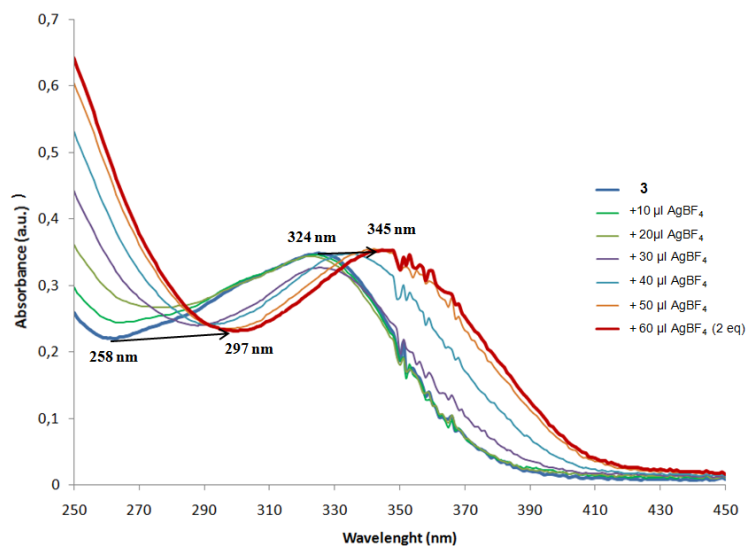


**Figure A2.7** : UV-visible spectra of **3** (final concentration 0.05 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of HAuCl<sub>4</sub> solution in methanol (5 mM). Final concentrations of HAuCl<sub>4</sub> between 0.008 mM and 0.1 mM

## Addition of AgBF<sub>4</sub>



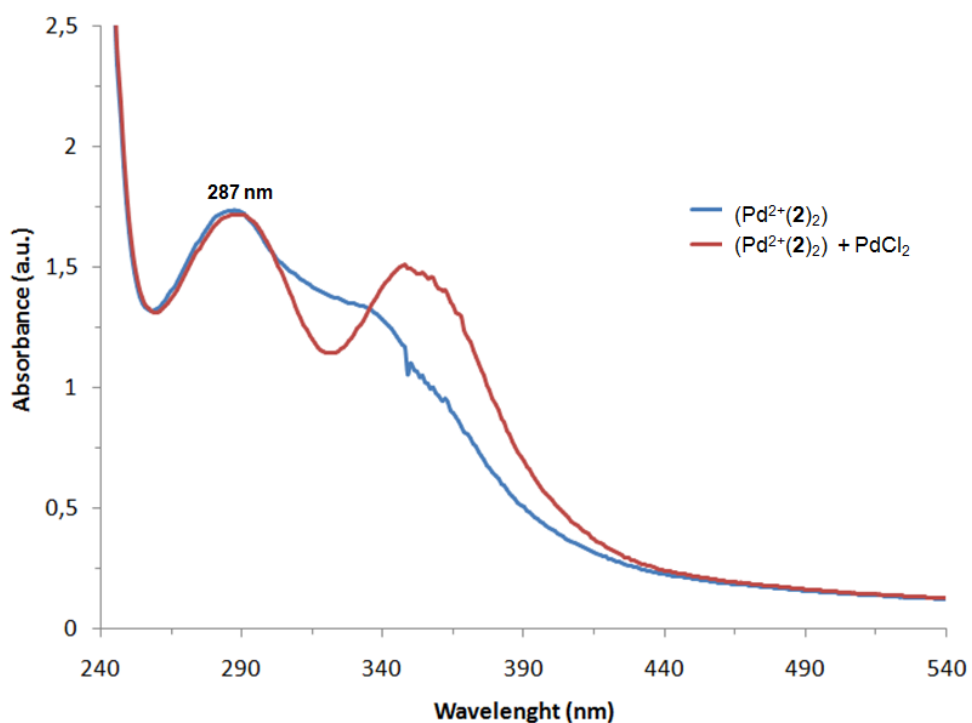
**Figure A2 8 :** UV-visible spectra of **2** (final concentration 0.033 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of AgBF<sub>4</sub> solution in methanol (5 mM). Final concentrations of AgBF<sub>4</sub> between 0.0033 mM and 0.033 mM



**Figure A2.9 :** UV-visible spectra of **3** (final concentration 0.05 mM) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in presence of various concentrations of AgBF<sub>4</sub> solution in methanol (5 mM). Final concentrations of AgBF<sub>4</sub> between 0.008 mM and 0.1 mM



### Addition of the pre-formed MOST Pd<sup>2+</sup>(2)<sub>2</sub> in liposomes



**Figure A2 :10 :** UV-visible spectra in H<sub>2</sub>O (3 ml with 240 μl of liposomes (5 mM), 120 μl of NaNO<sub>3</sub> (5 mM phosphate buffer with 500 mM NaNO<sub>3</sub>) of the pre-formed complex Pd<sup>2+</sup>(2)<sub>2</sub> (blue curve) and the pre-formed complex Pd<sup>2+</sup>(2)<sub>2</sub> with additional 0.5 eq of PdCl<sub>2</sub> (red curve)

## Summary of UV-vis assays

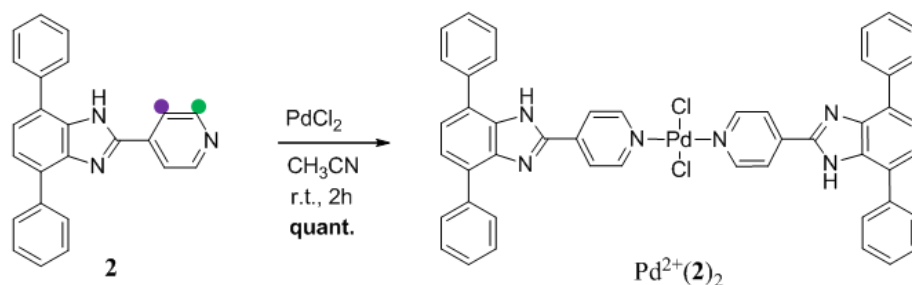
**Table A2.1:** Characteristics of the UV-vis absorption of **2** and **3** in DCM, water, liposomes in aqueous media, with ou without PdCl<sub>2</sub>.

	<b>2</b>		<b>3</b>	
	$\pi$ - $\pi^*$ transition (nm)	n- $\pi^*$ transition (nm)	$\pi$ - $\pi^*$ transition (nm)	n- $\pi^*$ transition (nm)
DCM	274	318	238	325
Water	287	332	227	310
In liposomes*	281	317	n.o	314
In liposomes * + PdCl <sub>2</sub>	281	348	n.o	323

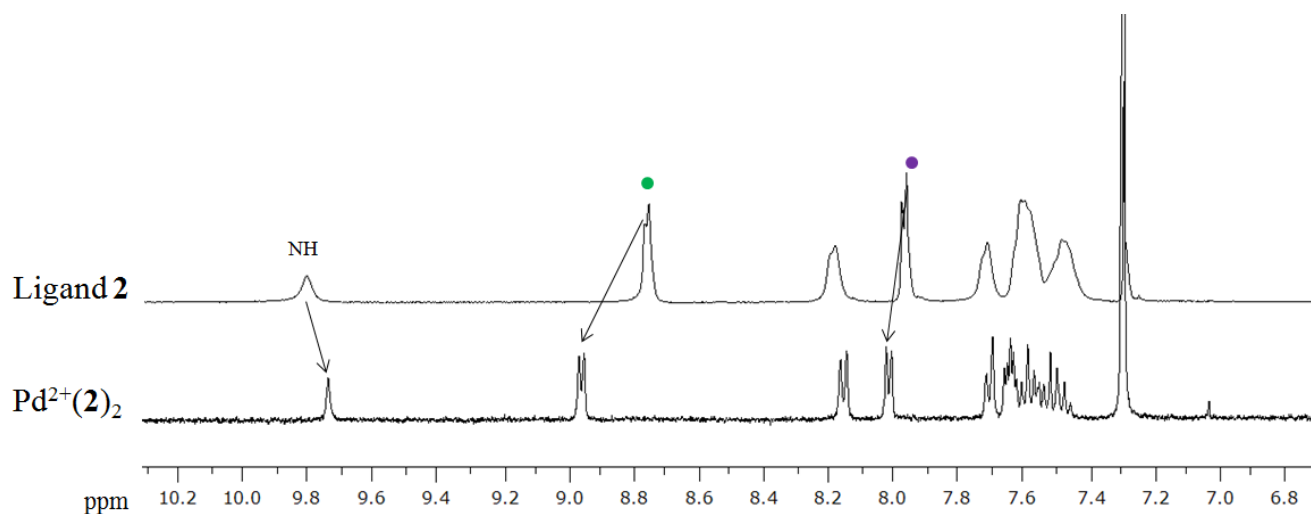
\*(240  $\mu$ l of EYPC liposomes at 5 mM in 3ml of H<sub>2</sub>O)

## NMR and mass characterization of the Pd complexes

### Formation of palladium complex with ligand 2

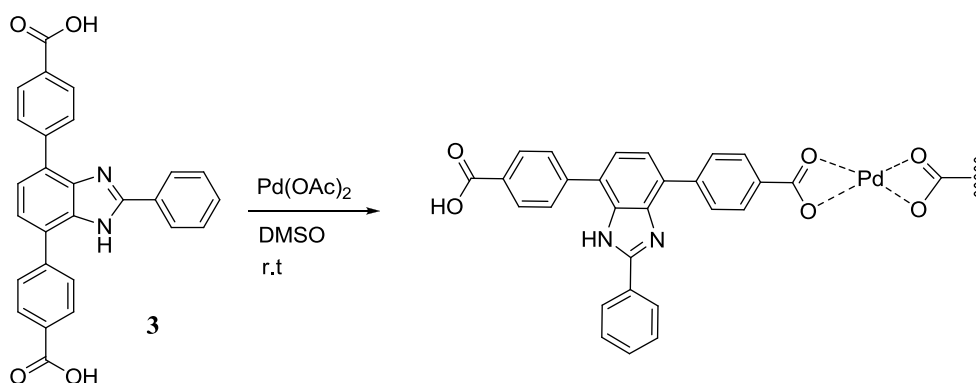


In a round flask were added ligand  $\mathbf{2}$  (1 eq, 0.06 mmol, 20 mg) and  $\text{PdCl}_2$  (0.5 eq, 0.03 mmol, 5.1 mg) in  $\text{CH}_3\text{CN}$ . The solution was stirred at room temperature for 2h. When an orange precipitate was formed, it was filtered and washed 2 times with  $\text{CH}_3\text{CN}$ , then dried overnight in the oven to give the desired palladium complex (25 mg, **quant**).

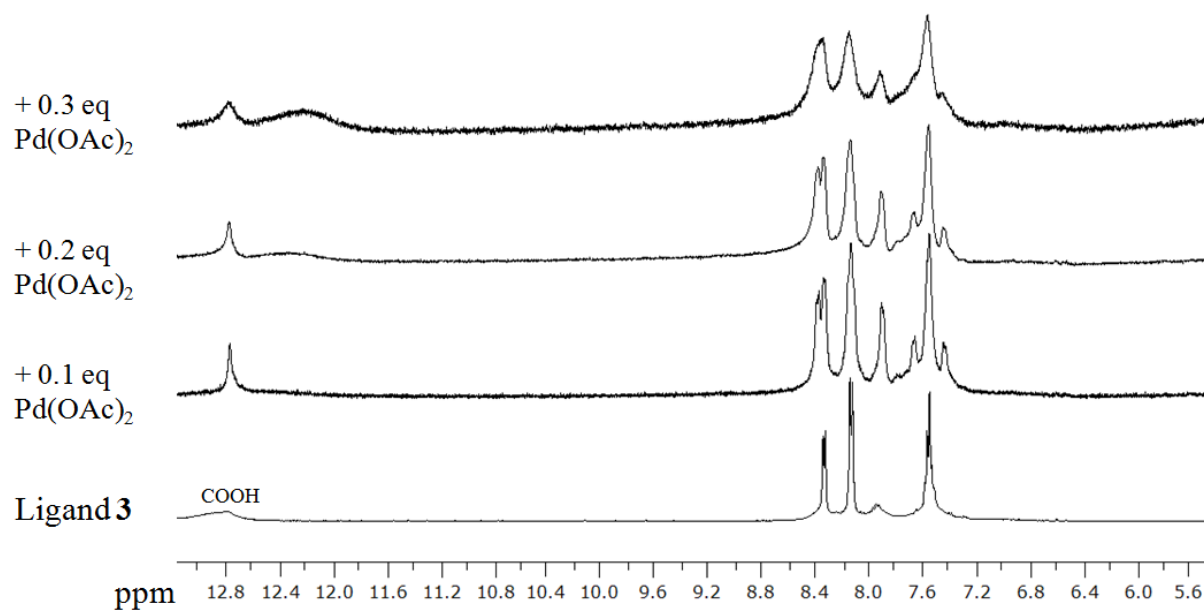


**Figure A2.11:**  $^1\text{H}$  NMR of ligand  $\mathbf{2}$  and its palladium complex  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  in  $\text{CDCl}_3$

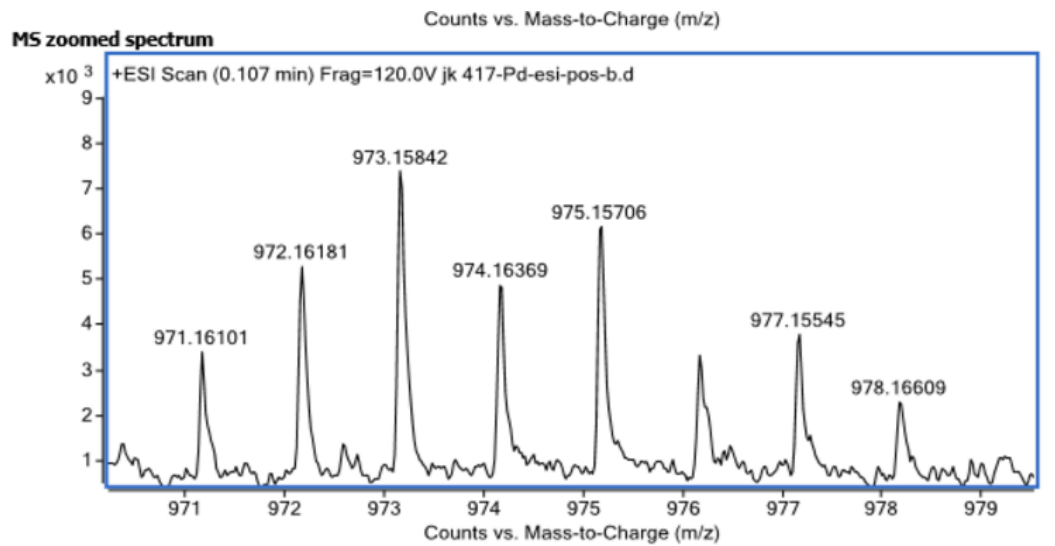
### Formation of the palladium complex with ligand 3



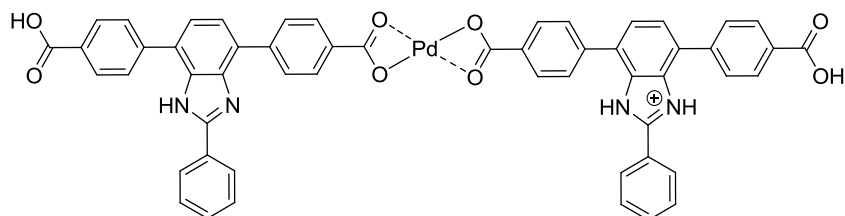
Due to the lack of solubility of  $\text{PdCl}_2$  in DMSO,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  was used to monitor the formation of the complex with ligand **3**. Small amounts of a  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  were added in a NMR tube to a solution of ligand **3** (1 eq, 0.023 mmol, 10 mg) in  $\text{DMSO-d}_6$ . Upon the addition of 0.2 equivalents of Pd, a precipitate was already formed in the NMR tube and when 0.5 eq of  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  were added a gel was formed in the NMR tube.



**Figure A2.12:**  $^1\text{H}$  NMR of ligand **3** and formation of the palladium complex in DMSO.



Ion	Ion Formula	Expe. m/z	Calc. m/z	Diff (ppm)	Diff (mDa)
(M+H) <sup>+</sup>	(C <sub>27</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> [106Pd]H	973.15842	973.15733	-1.12	-1.09



**Figure A2.13** : Mass spectrum of the Pd<sup>2+</sup>(**3**) obtained by mixing 1 equiv of **3** with 0.5 eq of Pd(OAc)<sub>2</sub> in DMSO.

## SEM characterization

The topography and morphology of the gels formed by ligands **2** and **3** with 0.5 equivalents of palladium in DMSO were examined by a conventional field-emission scanning electron microscopy (FESEM) (JEOL JSM-7400F: JEOL Ltd, Tokyo, Japan) working at 1.5 kV using low secondary electron image detector (LEI). The samples were prepared by depositing the metal complex Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> (7 mg/ml in DMSO) and Pd<sup>2+</sup>(**3**) (3 mg/ml in DMSO) on a carbon conductive tabs and drying at 60 °C over night. Samples were gold coated with a thickness between 4 and 7 nm under vacuum by means of a Leica sputter coater (Leak EM ACE600, Wetzlar, Germany).

## **Ion transport**

### **Preparation of EYPC large unilamellar vesicles (LUVs)**

A phospholipid film was formed by evaporating 1 ml chloroform solution containing 25 mg of EYPC, under vacuum at 25°C during 2 hours. The lipid film was then hydrated with 1 mL of a NaCl (500 mM) and phosphate buffer solution (5 mM, pH = 7.2). The obtained suspension was subjected to at least 8 freeze/thaw/vortex cycles (1 cycle = 1 minute at - 78°C followed by 1 minute at 35°C and 1 minute in vortex). The solution was then extruded through a 100 nm polycarbonate membrane 21 times until the solution was transparent and passed down a Sephadex G-25 column to remove extravesicular NaCl. The liposomes were eluted with a solution containing 5 mM of phosphate buffer with 500 mM of NaNO<sub>3</sub> (pH = 7.2). 4.3 mL of liposomes solution were isolated after separation. The stock solution was diluted to obtain a 5 mM lipid solution, assuming all EYPC was incorporated into the liposomes.

### **Chloride transport assays with EYPC LUVs.**

A 60 µL aliquot of the solution of EYPC LUVs (5 mM) was added to a 1.2 mL gently stirred buffer solution containing 5 mM phosphate salt with 500 mM NaNO<sub>3</sub> (pH = 7.2). The chloride efflux was monitored as function of time by a chloride selective-electrode. 7.5 µL of a solution of transporter at different concentrations in MeOH were added to start the transport. At t = 600 s, 100 µL of a Triton-X 5% solution were added to lyse all liposomes to obtain the maximum of chloride efflux.

Experiments were repeated in triplicate and all the reported traces are the average of the three independent trials.

### **Preparation of EYPC/cholesterol 7/3 LUVs for lucigenin based assays.**

The preparation of EYPC/cholesterol (7/3, w/w, 30.4 mg LUVs) is based on the protocol of the preparation of EYPC LUVs described above.

### **Chloride transport assays with EYPC/cholesterol 7/3 LUVs.**

The chloride transport with EYPC/cholesterol 7/3 LUVs is identical to the chloride transport experiment through EYPC LUVs described above.

### **Chloride transport assays with EYPC LUVs in different phosphate buffers**

The chloride transport assays with EYPC LUVs in different phosphate buffers was similar to the protocol describe previously. Different buffer solutions containing 5 mM phosphate salt with 500 mM NaX (X= NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup>) or 250 mM Na<sub>2</sub>X (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (pH = 7.2) were used.

### **Conversion of chloride concentration data into % of chloride efflux:**

The residual efflux caused by the addition of PdCl<sub>2</sub> solution is subtracted from each transport assays, then the curves are normalized using the following equation:

$$\%Cl_{\text{efflux}} = \frac{[Cl^-] - [Cl^-]_0}{[Cl^-]_{\text{max}} - [Cl^-]_0} * 100$$

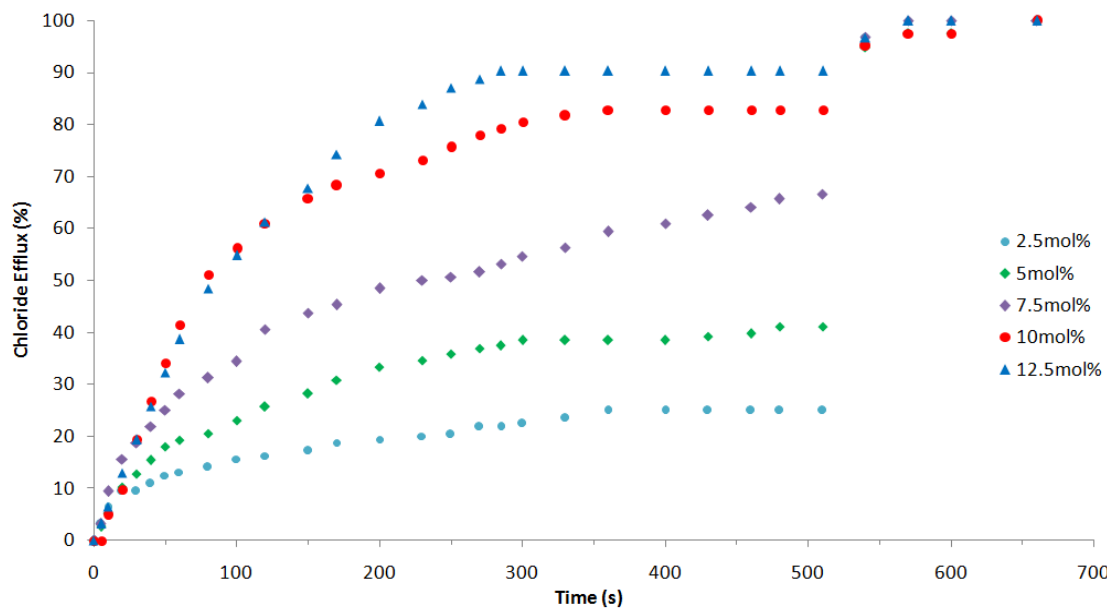
With [Cl<sup>-</sup>] = Chloride efflux

[Cl<sup>-</sup>]<sub>0</sub> = Chloride efflux at the initial time

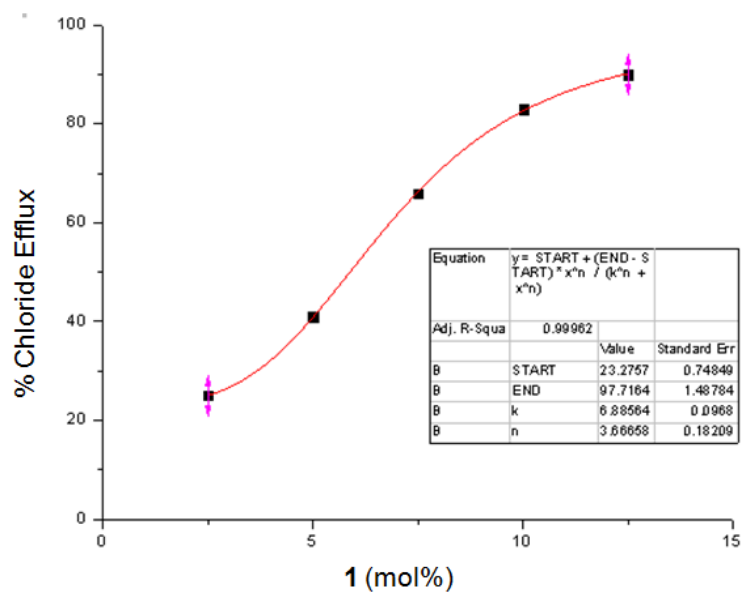
[Cl<sup>-</sup>]<sub>max</sub> = Chloride efflux at the end of the experiment.



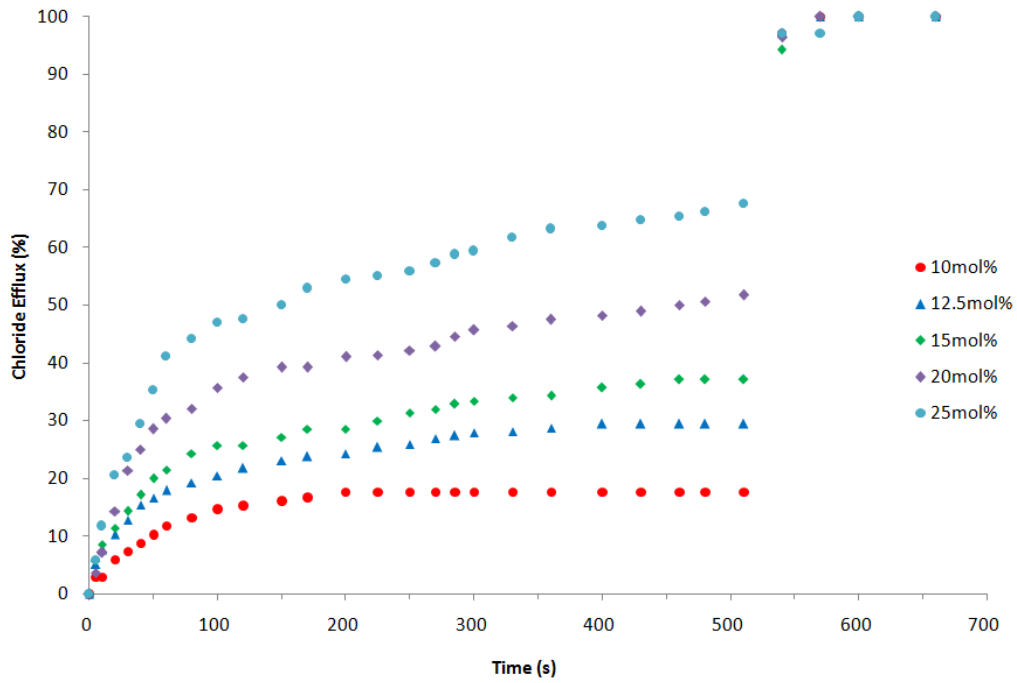
## Chloride transport with different concentrations of ligand



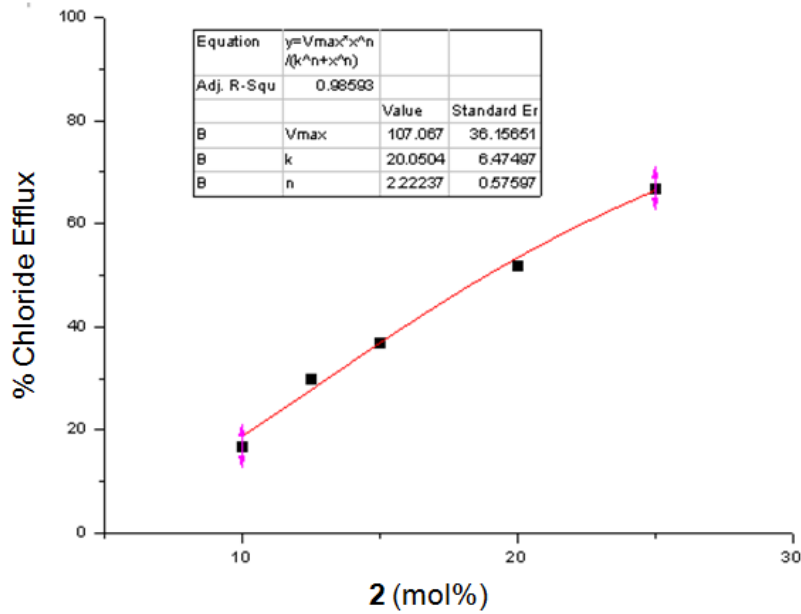
**Figure A2.14 :** Kinetic experiment with different concentrations of **1** (relative to EYPC concentration 5 mM) at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



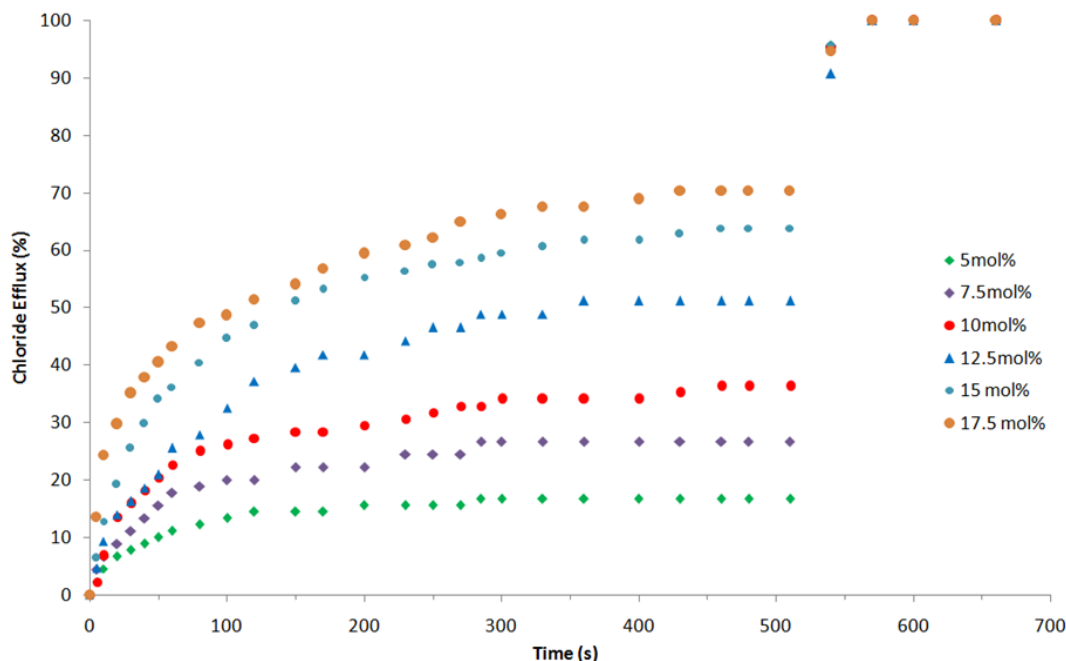
**Figure A2.15 :** Hill plot analysis of **1**  $EC_{50,500s} = 6.9 \text{ mol\%}$



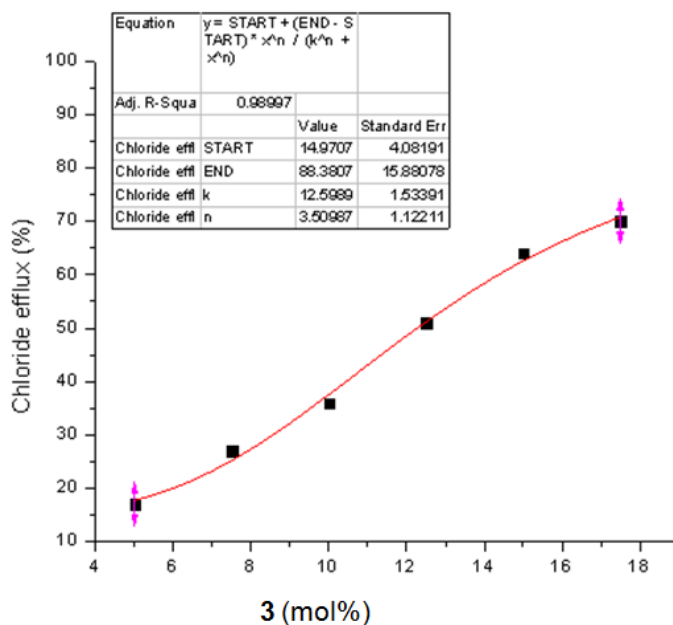
**Figure A2.16** : Kinetic experiment with different concentrations of **2** (relative to EYPC concentration 5 mM) in liposomes. Chloride efflux experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



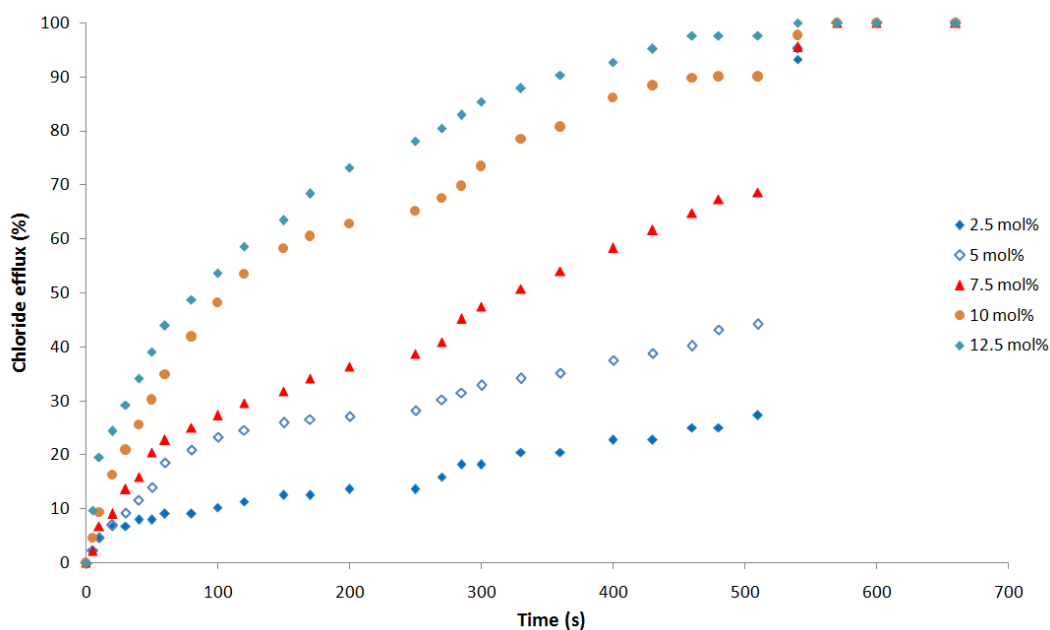
**Figure A2.17** : Hill plot analysis of **2**  $EC_{50,500s} = 20 \text{ mol}\%$



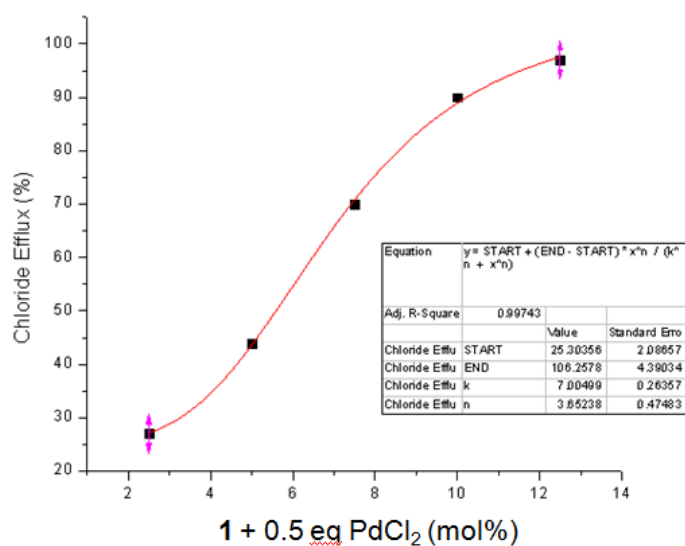
**Figure A2.18 :** Kinetic experiment with different concentrations of **3** relative to EYPC concentration (5 mM) in liposomes. Chloride efflux experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



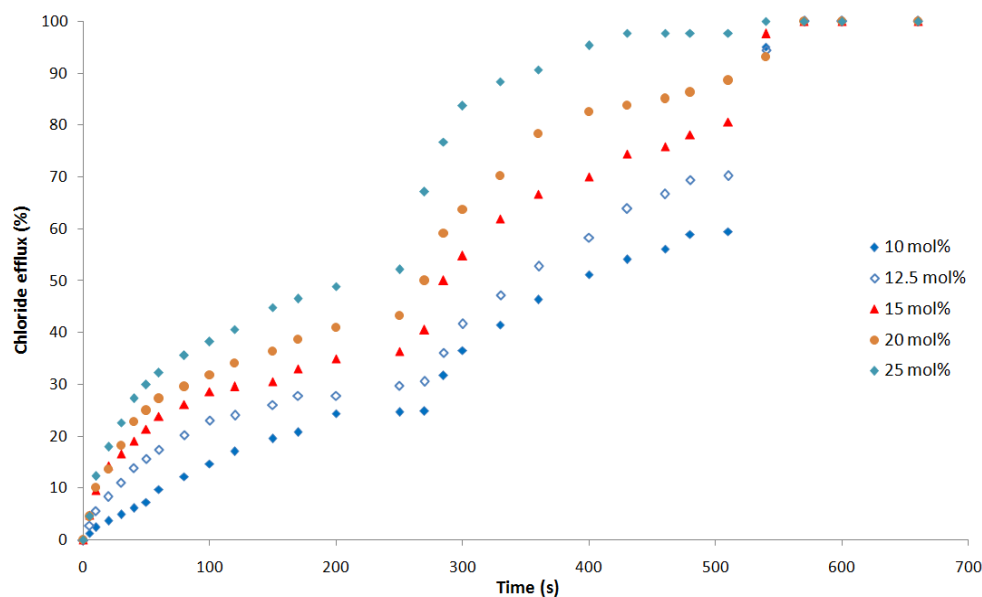
**Figure A2.19 :** Hill plot analysis of **3**  $EC_{50,500s} = 12.6 \text{ mol\%}$



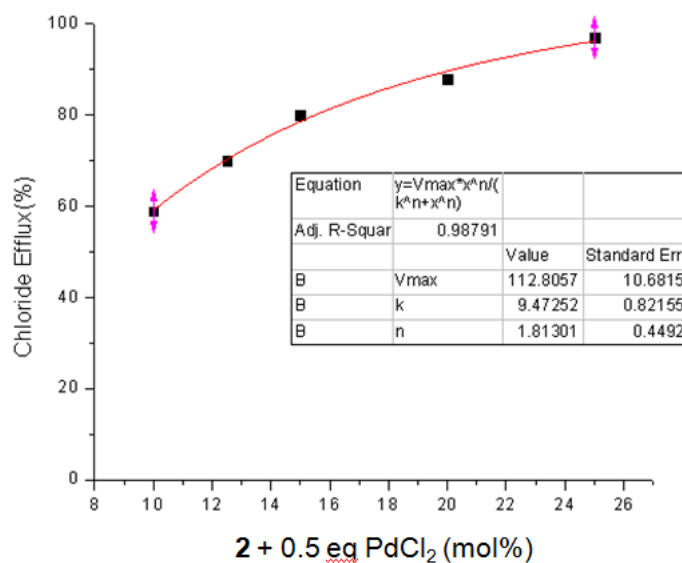
**Figure A2.20 :** Kinetic experiment with different concentrations of **1** (relative to EYPC concentration 5 mM) in liposomes. 0.5 eq of PdCl<sub>2</sub> (2.5 mM) relative to the concentration of **1** was added at 250 s. Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



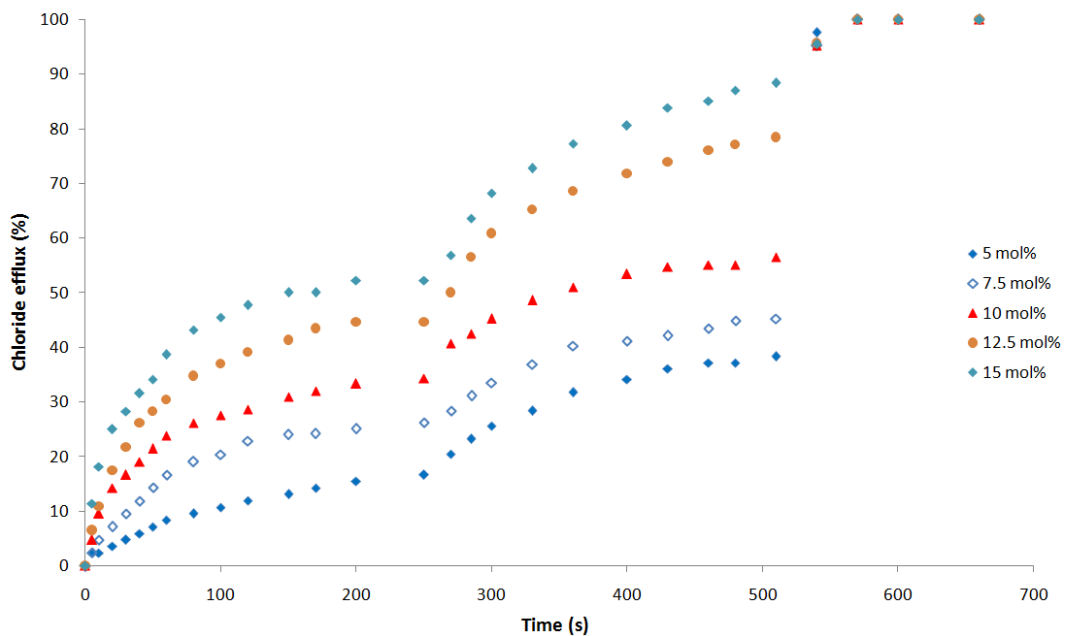
**Figure A2.21:** Hill plot analysis of **1** + 0.5 eq of PdCl<sub>2</sub>      EC<sub>50,500s</sub> = 7.0 mol%



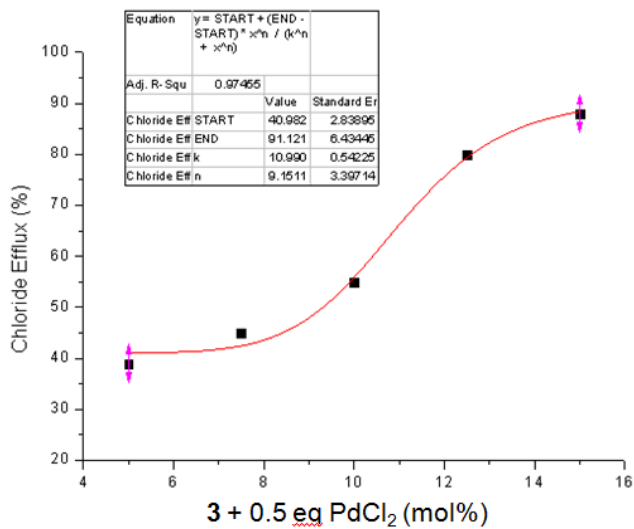
**Figure A2.22:** Kinetic experiment with different concentrations of **2** (relative to EYPC concentration 5mM) in liposomes. 0.5 eq of PdCl<sub>2</sub> (2.5 mM) relative to the concentration of **2** was added at 250 s. Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



**Figure A2.23 :** Hill plot analysis of **2** + 0.5 eq of PdCl<sub>2</sub>      EC<sub>50,500s</sub> = 9.5 mol%

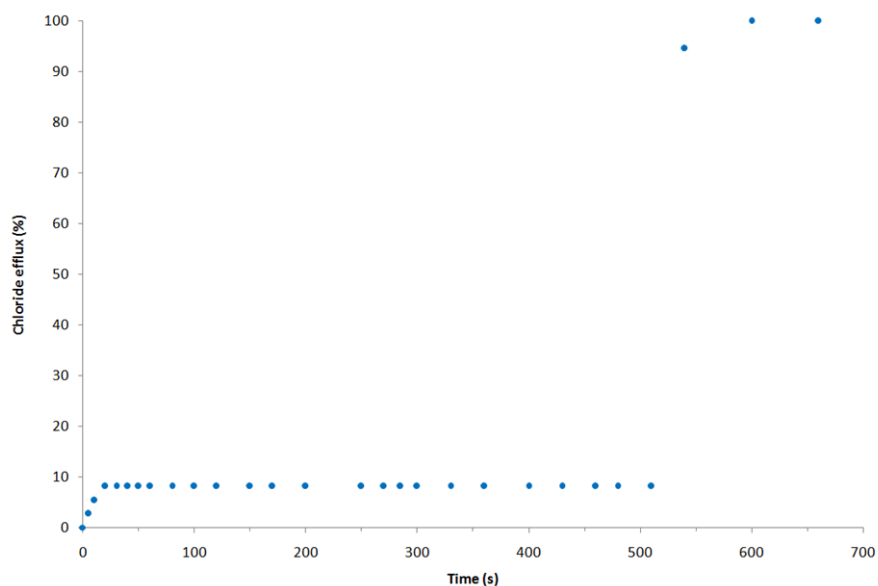


**Figure A2.24 :** Kinetic experiment with different concentrations of **3** (relative to EYPC concentration 5 mM) in liposomes. 0.5 eq of PdCl<sub>2</sub> (2.5 mM) relative to the concentration of **3** was added at 270 s. Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

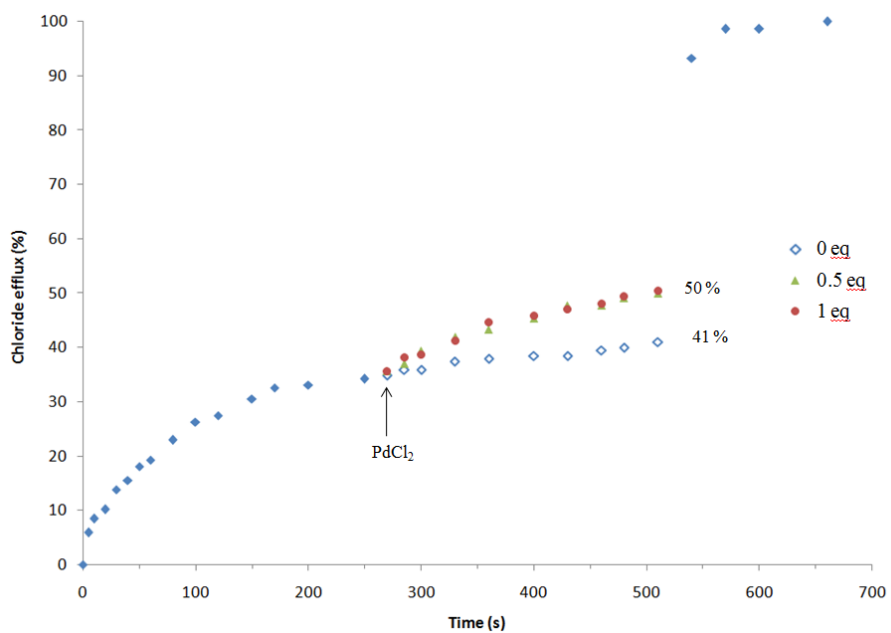


**Figure A2.25 :** Hill plot analysis of **3** + 0.5 eq of PdCl<sub>2</sub>      EC<sub>50,500s</sub> = 10.9 mol%

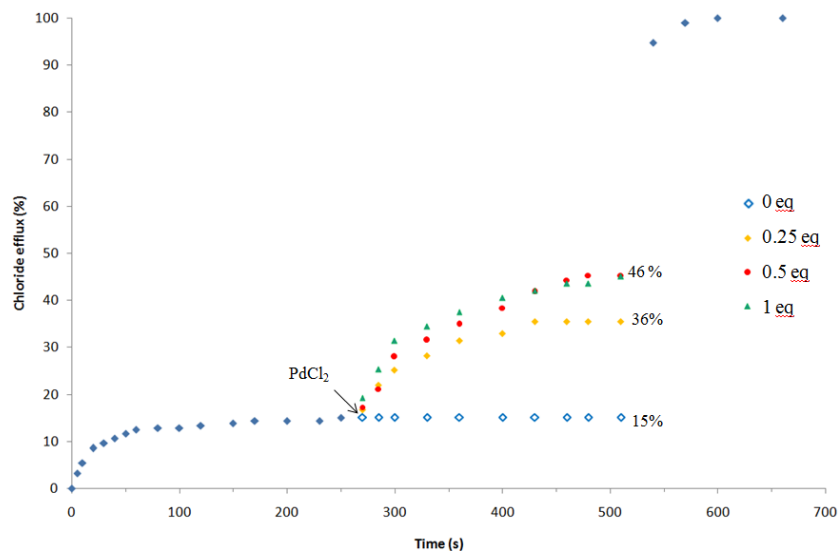
## Addition of PdCl<sub>2</sub>



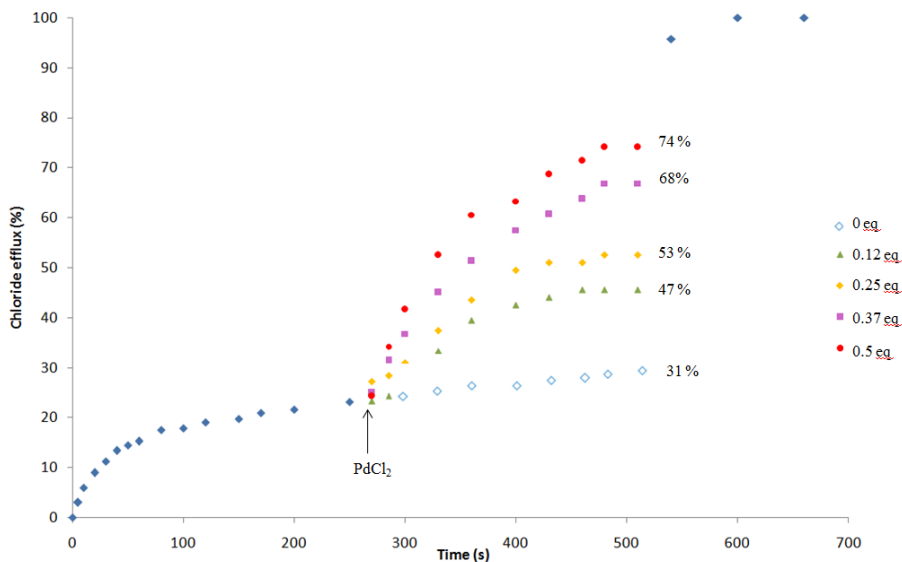
**Figure A2.26 :** Residual chloride efflux promoted by 6.25 mol% of PdCl<sub>2</sub> in MeOH (relative to EYPC concentration 5 mM). Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



**Figure A2.27 :** Addition of PdCl<sub>2</sub> in solution in MeOH (equiv. relative to **1**) at 270 s in presence of 5 mol% of **1** (relative to EYPC concentration 5 mM). Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

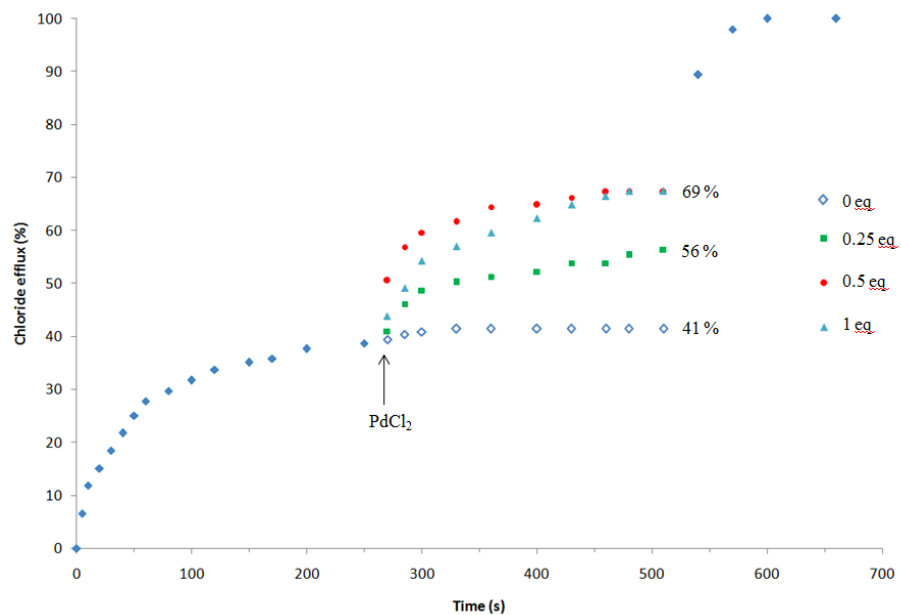


**Figure A2.28 :** Addition of PdCl<sub>2</sub> in solution in MeOH (equiv. relative to **2**) at 270 s in presence of 5 mol% of **2** (relative to EYPC concentration 5 mM). Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



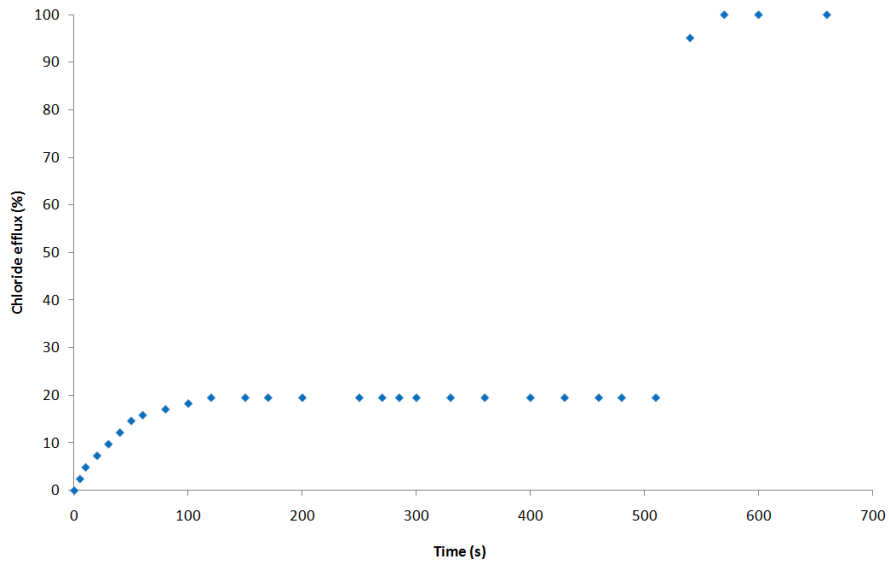
**Figure A2.29 :** Addition of PdCl<sub>2</sub> in solution in MeOH (equiv. relative to **2**) at 270 s in presence of 12.5 mol% of **2** (relative to EYPC concentration 5 mM). Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



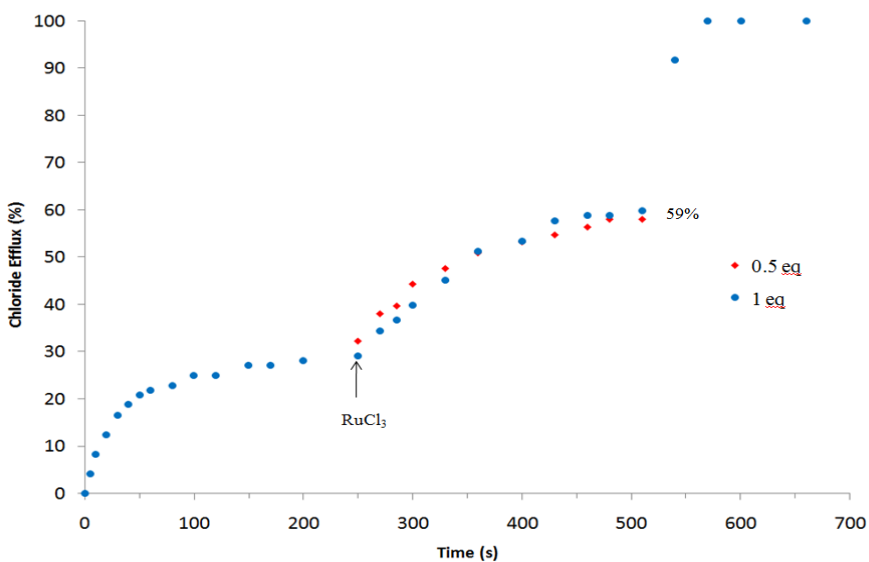


**Figure A2.30** : Addition of PdCl<sub>2</sub> in solution in MeOH (equiv. relative to **3**) at 270 s in presence of 12.5 mol% of **3** (relative to EYPC concentration 5 mM). Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

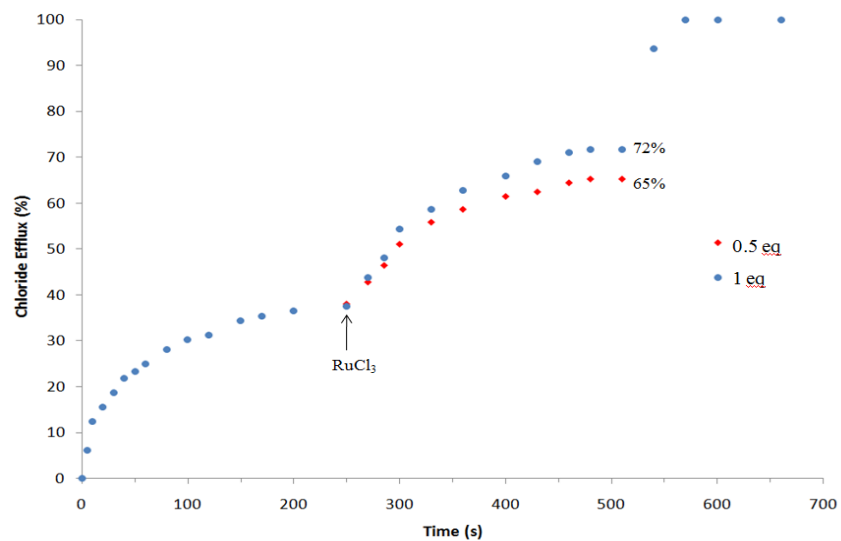
## Addition of RuCl<sub>3</sub>



**Figure A2.31** : Residual chloride efflux induced by the addition of 6.25 mol% of RuCl<sub>3</sub> in MeOH (relative to EYPC concentration 5 mM). Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

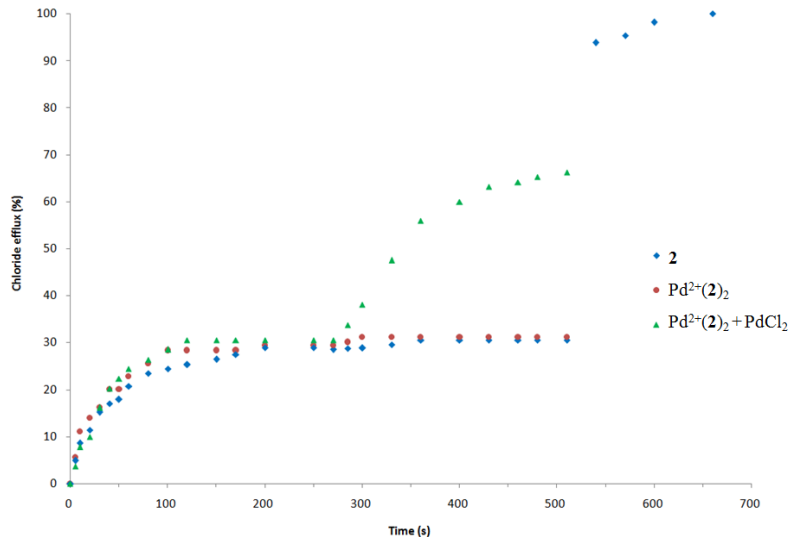


**Figure A2.32** : Addition of RuCl<sub>3</sub> in solution in MeOH (equiv. relative to **2**) at 270 s in presence of 12.5 mol% of **2** (relative to EYPC concentration 5 mM). Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

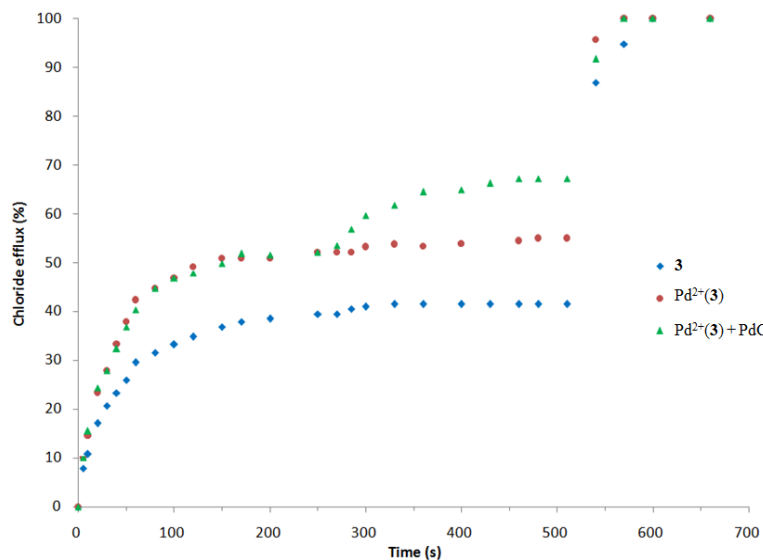


**Figure A2.33** : Addition of  $\text{RuCl}_3$  in solution in MeOH (equiv. relative to **3**) at 270 s in presence of 12.5 mol% of **3** (relative to EYPC concentration 5 mM). Experiments were performed at room temperature. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

## Addition of a the pre-formed MOST

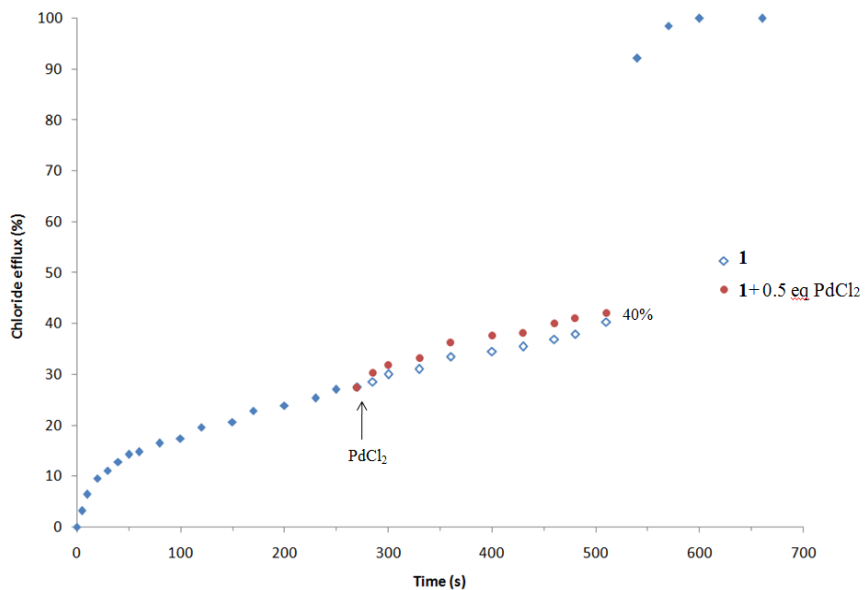


**Figure A2.34** : Comparison of the chloride efflux induced by 12.5 mol% of **2** (blue curve), by 12.5 mol% of the pre-formed complex Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> (red curve), and by 12.5 mol% the pre-formed complex Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> followed by a new addition of a PdCl<sub>2</sub> aliquot (0.5 eq) at 270 s (green curve). Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

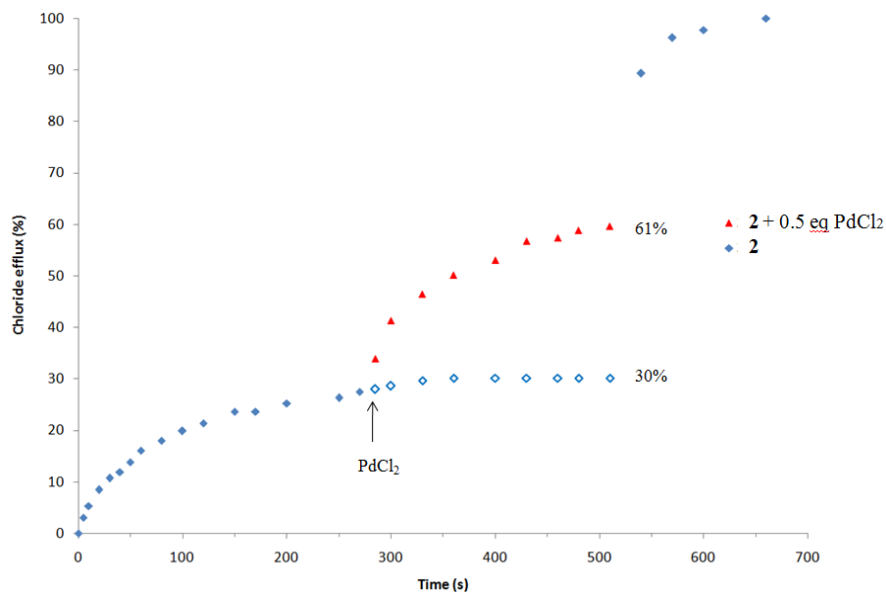


**Figure A2.35** : Comparison of the chloride efflux induced by 12.5 mol% of **3** (blue curve), by 12.5 mol% of the pre-formed complex Pd<sup>2+</sup>(**3**) (red curve), and by 12.5 mol% the pre-formed complex Pd<sup>2+</sup>(**3**) followed by a new addition of a PdCl<sub>2</sub> aliquot (0.5 eq) at 270s (green curve). Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

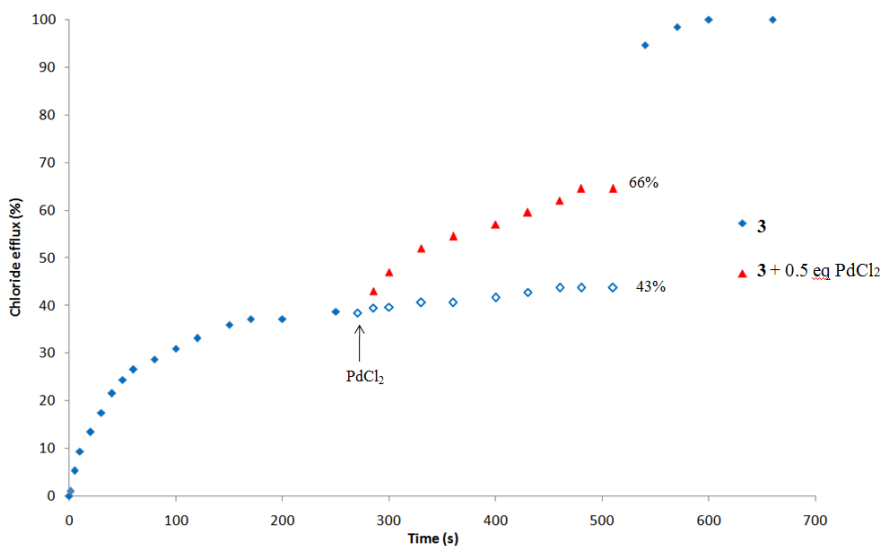
### Chloride transport experiment in EYPC/cholesterol 7/3 LUVs



**Figure A2.36:** Relative chloride transport activity of **1** at 5 mol% (relative to EYPC/cholesterol concentration 5 mM) in blue, and by **1** (5 mol%) followed by the addition of a PdCl<sub>2</sub> aliquot (2.5 mol%) at 270 s in red. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



**Figure A2.37 :** Relative chloride transport activity of **2** at 12.5 mol% (relative to EYPC/cholesterol concentration 5mM) in blue, and by **2** (12.5 mol%) followed by the addition of a PdCl<sub>2</sub> aliquot (6.25 mol%) at 270 s in red. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.



**Figure A2.38 :** Relative chloride transport activity of **3** at 12.5 mol% (relative to EYPC/cholesterol concentration 5mM) in blue, and by **3** (12.5 mol%) followed by the addition of a PdCl<sub>2</sub> aliquot (6.25 mol%) at 270 s in red. Triton X was added at 525 s to lyse the liposomes.

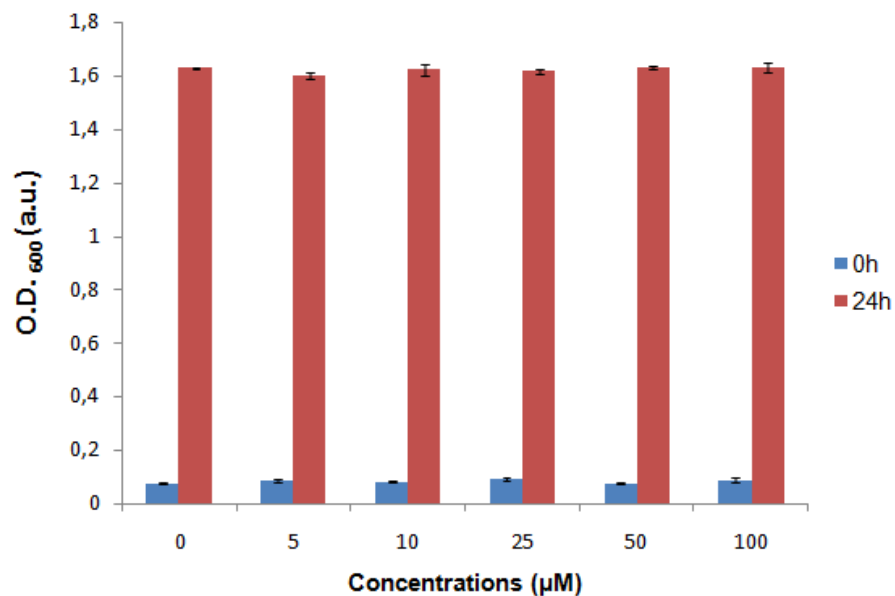
## Minimal inhibitory concentration (MIC) assays

5 mL of Lysogeny Broth (LB) medium were inoculated with *Bacillus thuringiensis* (HD73 strain). The preculture was grown overnight at 37°C under agitation at 230 RPM, and resuspended in 75 mL of a fresh LB medium. The culture was grown at 37°C during 2 more hours. After this time, the culture was rediluted in fresh LB medium to obtain an OD<sub>600</sub> of 0.1-0.2. Each well was filled with 195 µL bacterial cultures and 5 µL of DMSO or compounds in DMSO solution, as the final volume in each well was 200 µL and the max concentration of DMSO was 5%. The plates were agitated at 230 RPM in a thermostated incubator at 37°C and the solution OD<sub>600</sub> was monitored over time.

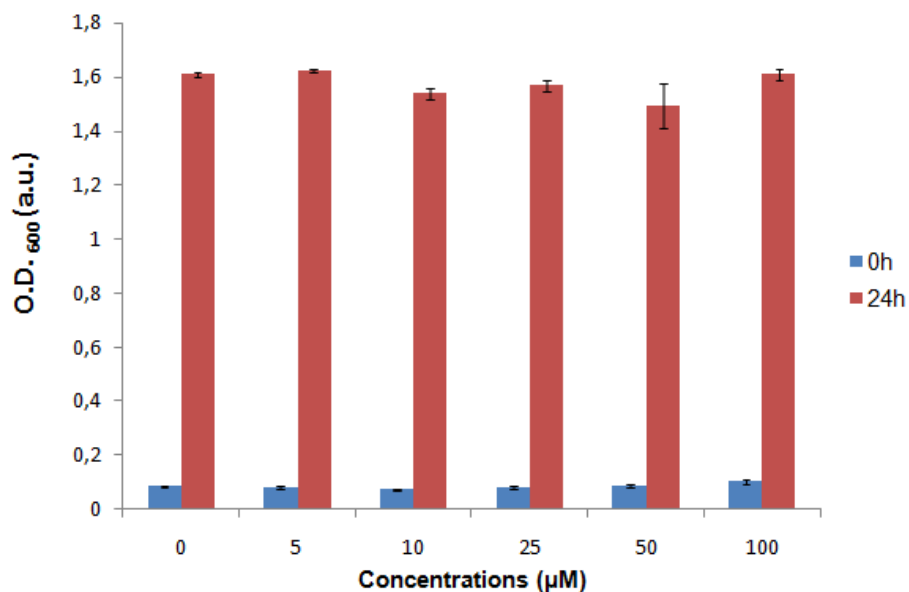
Every experiment was repeated in triplicate on independent bacterial cultures.

The MICs were determined as the minimal concentration at which no bacterial growth was detected.

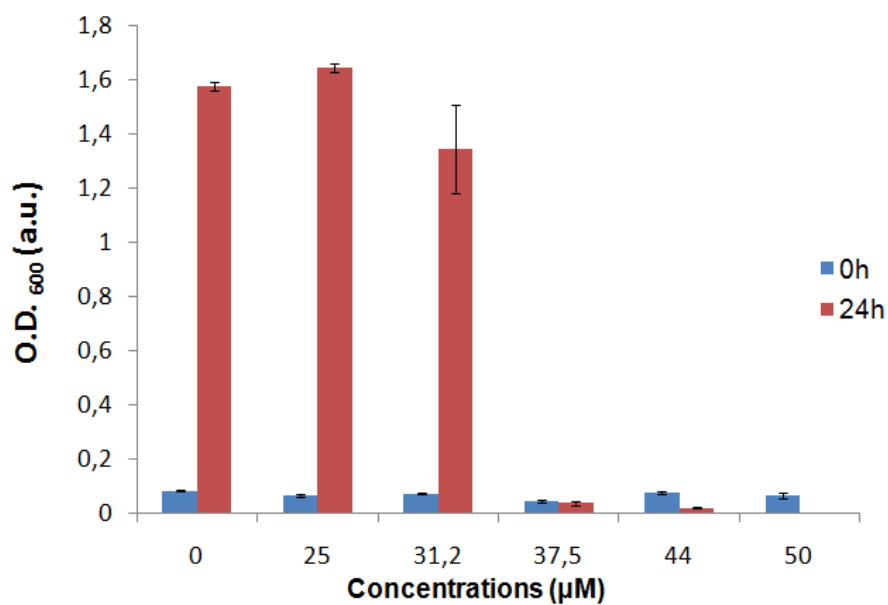
### Wild-type Gram-positive *Bacillus thuringiensis*



**Figure A2.39** : Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* induced by **1** after 24 h of incubation.

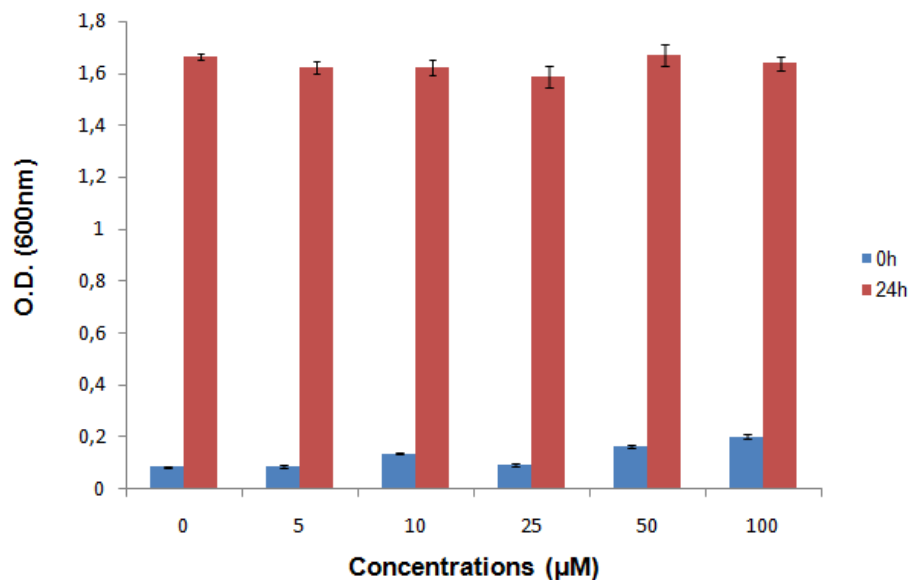


**Figure A2.40** : Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* induced by **2** after 24 h of incubation.

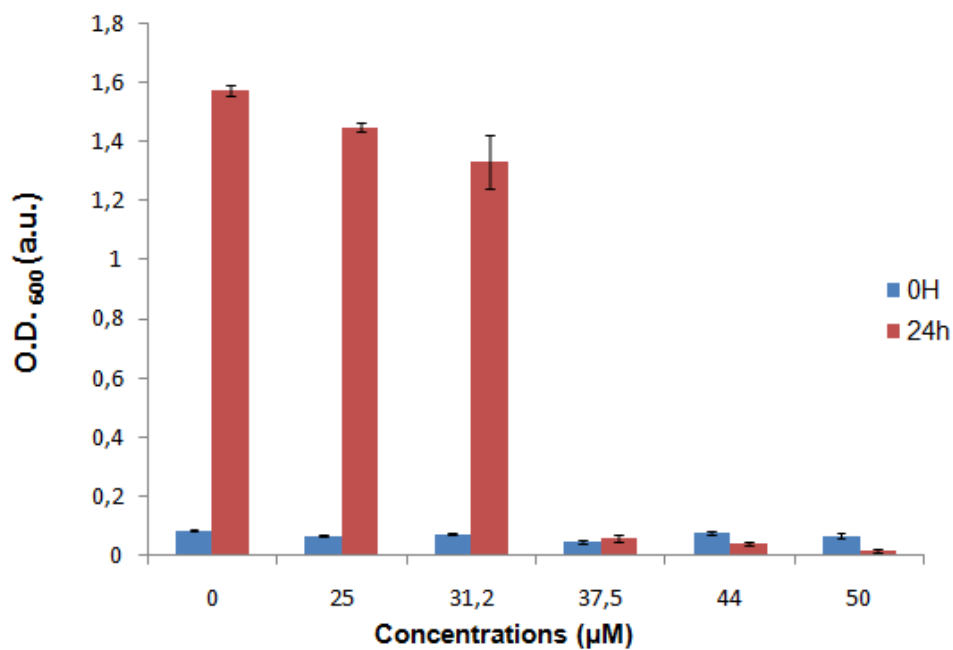


**Figure A2.41** : Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* induced by **3** after 24 h of incubation. MIC = 37 µM

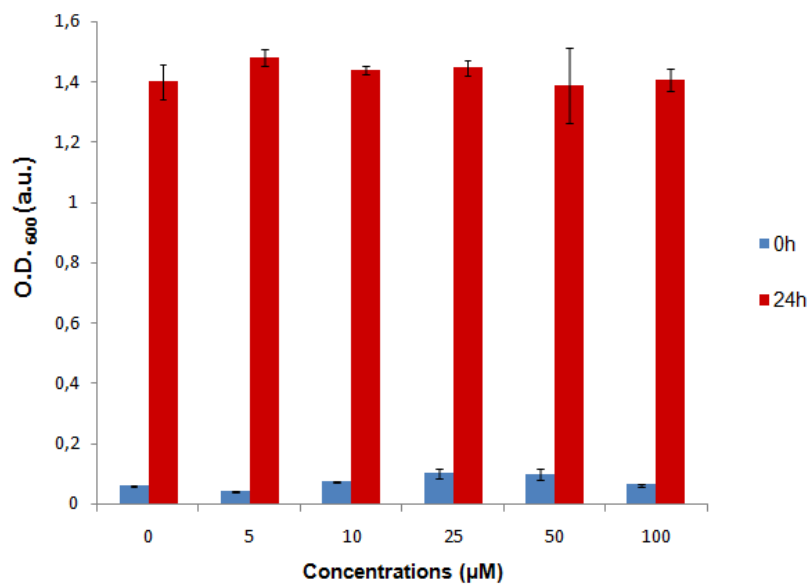




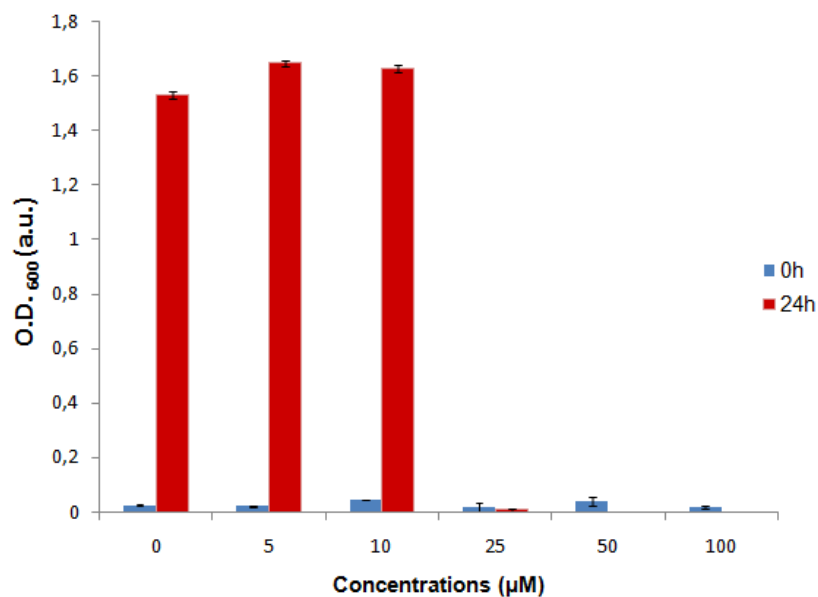
**Figure A2.42** : Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* induced by the pre-formed complex  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{2})_2$  after 24 h of incubation.



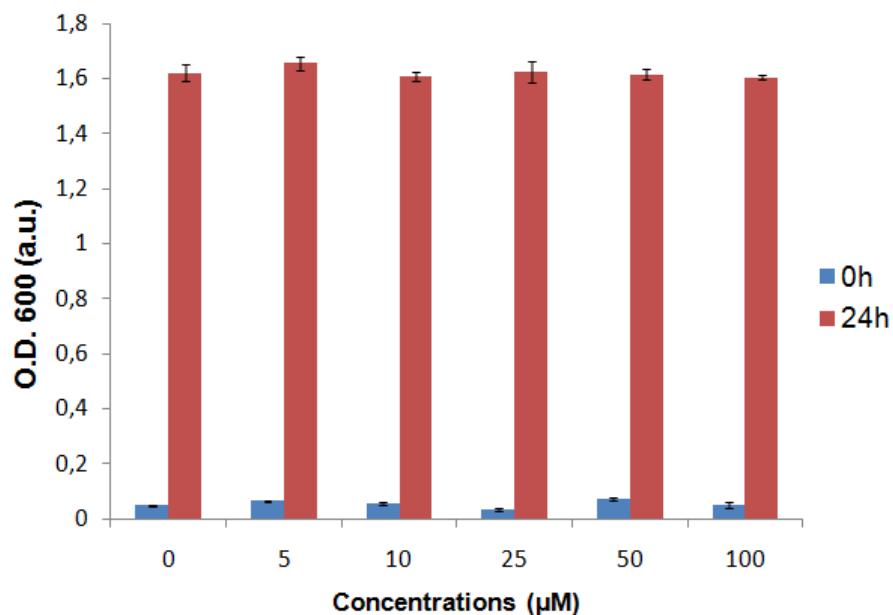
**Figure A2.43** : Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* induced by the pre-formed complex  $\text{Pd}^{2+}(\mathbf{3})$  after 24 h of incubation. MIC = 37  $\mu\text{M}$



**Figure A2.44** : Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* obtained after 24h. 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> (relative to the concentration of **2**) were added after 1 h of incubation of bacteria with ligand **2**.



**Figure A2.45** : Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* obtained after 24h. 0.5 equivalents of PdCl<sub>2</sub> (relative to the concentration of **3**) were added after 1 h of incubation of bacteria with ligand **3**. MIC = 10-25 µM



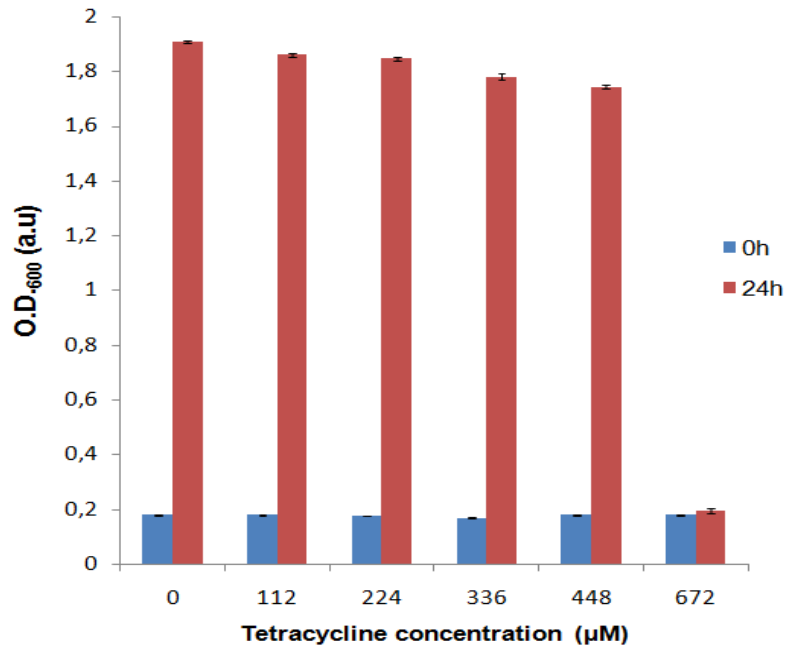
**Figure A2.46 :** Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* obtained after 24 h of incubation in presence of different concentrations of PdCl<sub>2</sub>.

#### **Tetracycline-resistant *Bacillus thuringiensis* strain.**

5 mL of Lysogeny Broth (LB) medium with different concentrations of tetracycline (11 µM to 112 µM) were inoculated with *Bacillus thuringiensis* tetracycline-resistant (HD73 strain containing a PBESV plasmid). The preculture was grown overnight at 37 °C under stirring (230 RPM), and resuspended in 50 mL of a fresh LB medium having the same concentration of tetracycline. The culture was grown at 37 °C during 2 more hours. After this time, the culture was rediluted in fresh LB + tetracycline medium to obtain an OD<sub>600</sub> of 0.1-0.2. Assays were performed in 96-well culture plates. Each well was filled with 195 µL bacterial cultures and 5 µL of DMSO or compounds in DMSO solution, as the final volume in each well was 200 µL and the max concentration of DMSO was 5%. The plates were agitated at 230 RPM in a thermostated incubator at 37 °C and the solutions OD<sub>600</sub> was monitored over time.

Every experiment was repeated in triplicate from different bacterial cultures.

The MICs were determined as the minimal concentration at which no bacterial growth was detected.



**Figure A2.47 :** Dose-dependent growth inhibition of tetracycline-resistant *Bacillus thuringiensis* obtained after 24 h of incubation with different concentration of tetracycline.

## Molecular modeling

All calculations were performed on a Windows® Vista platform. Semi-empirical quantum calculations were undertaken using the PM6 method in gas phase (MOPAC2012TM; ©Stewart Computational Chemistry) for **3**, Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> and Pd<sup>2+</sup>(**3**). All structures were optimized to a gradient inferior to 0.1 using the eigenvector following method. A model of the EYPC bilayer was constructed using 100 molecules of phosphatidylcholine, with different conformations and 15 Å layers of water molecules on each side, after a 500 ps molecular dynamics (MD) simulation at 1000 K, as previously described.<sup>3</sup> To investigate the stability of optimized Pd<sup>2+</sup>(**2**)<sub>2</sub> and Pd<sup>2+</sup>(**3**) in the phospholipid bilayer, we performed a 200 ps MD simulation with periodic boundary conditions at 300 K. The cut-off for non-bonded interactions was taken to be 10 Å in all the simulations. At the beginning, we carried out high temperature annealed MD simulations starting at 1000 K (2 ps) annealing to 0 K (10 ps). The simulations in aqueous solution were relaxed using the steepest descent method until a gradient difference of 0.1 kcal/mol was reached. After energy minimization of the system at 0 K, the MD simulation was initialized using a time step of 1 fs for 200 ps. The temperature was kept constant at 300 K yielding a canonical ensemble (NVT).

---

<sup>3</sup> Heller, M Schaefer, K Schulte, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8343

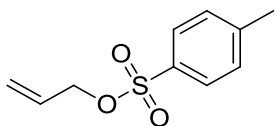
### **Annexe 3 : Partie expérimentale de l'article 3 :**

« Membrane active cationic cholic acid-based molecular umbrellas »

## Synthesis

The synthesis of the Umbrella part (“*Umbrella*” (*compound 6*)) used in *compound 7* procedure was already reported in the literature and was followed without modifications. Characterization data were in accordance with the literature.<sup>1</sup>

### (Allyl 4-methylbenzenesulfonate)



Allyl alcohol (1 eq, 10 mmol, 598 mg) was added to a solution of sodium hydride (3 eq, 31 mmol, 741 mg) in dry dichloromethane (30 ml). The white solution was stirred at 0° C. A suspension of 4-toluenesulfonyl chloride (1.5 eq, 15 mmol, 2.48 g) in dry dichloromethane (10 ml) was added dropwise to the solution and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After washing with NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10ml), the organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum, affording a light yellow oil. (1.87 g, **86 %**)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : δ(ppm) = 7.84 (d, *J*=8 Hz, 2 H), 7.38 (d, *J*=8 Hz, 2 H), 5.80 - 5.91 (m, 1 H), 5.26 - 5.39 (m, 2 H), 4.57 (dt, *J*<sub>1</sub>=6.0, *J*<sub>2</sub>=1.2 Hz, 2 H), 2.49 ppm (s, 3 H)

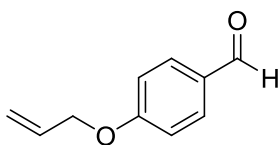
**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ(ppm) = 144.9, 133.4, 130.3, 129.9, 127.9, 120.3, 70.8, 21.6

**HR-MS ESI** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 213.0579, ESI [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 213.0570.

*Characterization data were in accordance with the literature.*<sup>2</sup>

- 
1. C. Chhun, J. Richard-Daniel, J. Kempf and A. R. Schmitzer, *Org. Biomol. Chem*, **2013**, *11*, 6023.
  2. D. J. Del Valle and M. J. Krische, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 10986.

**Compound 1 (4-(Allyloxy)benzaldehyde)**



A solution of allyl 4-methylbenzenesulfonate (1 eq, 8.82 mmol, 1.87 g) in CH<sub>3</sub>CN (10 ml) was added dropwise to a suspension of 4-hydroxybenzaldehyde (1 eq, 8.82 mmol, 1.08 g) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 eq, 8.82 mmol, 1.22 g) in CH<sub>3</sub>CN (20 ml). The pink mixture was heated to reflux for 4 h then cooled down to room temperature. The solvent was evaporated under vacuum and the crude product was solubilized in H<sub>2</sub>O (80 ml). After extraction with EtOAc (3 x 30 ml), the organic layer was washed with H<sub>2</sub>O (1 x 30 ml), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The yellow oil was purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, 100 % CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to yield an yellow oil (1.36 g, **95 %**).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 9.92 (s, 1 H), 7.87 (dt, *J*<sub>1</sub>=8.0, *J*<sub>2</sub>=2.0 Hz, 2 H), 7.05 (dt, *J*<sub>1</sub>=8.0, *J*<sub>2</sub>=4.0 Hz, 2 H), 6.01 - 6.16 (m, 1 H), 5.34 - 5.52 (m, 2 H), 4.66 (dt, *J*<sub>1</sub>=5.3, *J*<sub>2</sub>=1.5 Hz, 2 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ(ppm): 190.8, 163.6, 132.3, 132.0, 130.0, 118.4, 115.0, 69.0

**HR-MS ESI** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 163.0754      ESI [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 163.0749

[M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 185.0573      ESI [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 185.0567

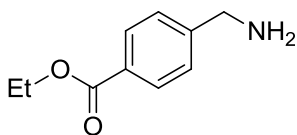
*Characterization data were in accordance with the literature.*<sup>4</sup>

---

3. M. Iinuma, K. Moriyama and H. Togo, *Eur. J. Org. Chem.*, **2014**, 772.



**Compound 2 (Ethyl 4-(aminomethyl)benzoate)**



Acetyl chloride (6 eq, 198 mmol, 14.2 ml) was added dropwise to a suspension of 4-aminomethylbenzoic acid (1 eq, 33 mmol, 5.00 g) in EtOH (125 ml). The white suspension was heated to reflux for 24 h and then the solution was cooled down to room temperature. The white crystals formed were filtered, washed with hexane then dissolved in a saturated solution of  $K_2CO_3$  (200 ml). After extraction with  $CH_2Cl_2$  (3 x 100 ml), the organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated under vacuum, affording a light yellow oil (4.32 g, **73%**)

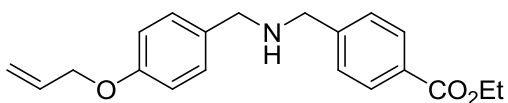
**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$ (ppm): 8.10 (d,  $J=8.4$  Hz, 2 H), 7.38 (d,  $J=8.4$  Hz, 2 H), 4.40 (q,  $J=7.2$  Hz, 2 H), 3.97 (s, 2 H), 1.57 (s, 2 H), 1.42 (t,  $J=7.2$  Hz, 3 H)

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 75MHz)  $\delta$ (ppm): 166.0, 148.1, 129.3 128.5, 126.5, 60.4, 45.7, 13.9

**HR-MS ESI**  $[M+H]^+_{calc} = 180.1019$ ,  $ESI [M+H]^+_{found} = 180.1017$

*Characterization data were in accordance with the literature.*<sup>5</sup>

**Compound 3 (Ethyl 4-((4-(allyloxy)benzylamino)methyl)benzoate)**



A solution of 4-(allyloxy)benzaldehyde (1 eq, 7.13 mmol, 1.16 g), ethyl 4-(aminomethyl)benzoate (1 eq, 7.13 mmol, 1.28 g) and sodium sulfate (3 eq, 14.3 mmol, 2.03 g) in dichloromethane (30 ml) was heated to reflux for 24 h. After cooling down the mixture to

---

4. C. Chhun and A. R. Schmitzer, *Med. Chem. Comm*, **2011**, 2, 987

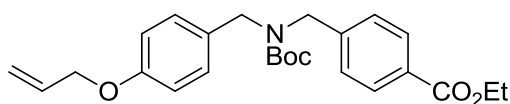
room temperature, a first suspension of sodium borohydride (1.5 eq, 10.1 mmol, 0.41 g) in methanol (5 ml) was added. After 2h, a second suspension of sodium borohydride (1.5 eq, 10.7 mmol, 0.41 g) in methanol (5 ml) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solution was acidified with 10 % HCl until pH= 2, evaporated under vacuum and the crude product was solubilized in a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturated solution. After extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 ml), the organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The colorless oil was purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>; Hexane:EtOAc 80:20) (1.51g, **68 %**)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm) = 8.00 - 8.07 (m, 2 H), 7.45 (dt, *J*<sub>1</sub>=8.8, *J*<sub>2</sub>=0.7 Hz, 2 H), 7.27 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 6.92 (dt, *J*<sub>1</sub>=8.0, *J*<sub>2</sub>=0.4 Hz, 2 H), 6.04 - 6.15 (m, 1 H), 5.45 (dd, *J*<sub>1</sub>=17.2, *J*<sub>2</sub>=1.7 Hz, 1 H), 5.32 (dd, *J*<sub>1</sub>=10.5, *J*<sub>2</sub>=1.5 Hz, 1 H), 4.57 (dt, *J*<sub>1</sub>=5.3, *J*<sub>2</sub>=1.6 Hz, 2 H), 4.41 (q, *J*=7.2 Hz, 2 H), 3.88 (s, 2 H), 3.77 (s, 2 H), 1.68 (br. s., 1 H), 1.43 (t, *J*=7.2 Hz, 3 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): 166.6, 157.7, 145.7, 133.4, 132.4, 129.8, 129.7, 129.3, 129.2, 128.8, 128.0, 127.9, 117.6, 114.7, 68.9, 60.9, 52.7, 52.6, 52.1, 14.4

**HR-MS ESI** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 326.1751    ESI [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 326.1760

**(Ethyl 4-(((4-(allyloxy)benzyl)(tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzoate)**



**Compound 3** (1 eq, 4.6 mmol, 1.51 g) was added to a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (1 eq, 4.6 mmol, 1.00 g) and Amberlyst resin 15 (15 % weight, 0.23 g) in EtOH (10 ml) heated at 50°C. After 1 h, the mixture was cooled to room temperature, filtered and concentrated under vacuum to give an yellow oil. (1.87 g, **96 %**)

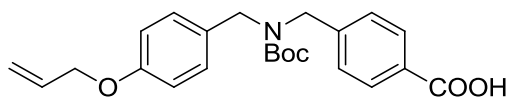
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm) = 8.03 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 7.22 - 7.35 (m, 2 H), 7.15 (d, *J*=11.7 Hz, 2 H), 6.90 (d, *J*=7.7 Hz, 2 H), 6.02 - 6.15 (m, 1 H), 5.45 (d, *J*=17.2 Hz, 1 H), 5.32

(d,  $J=10.5$  Hz, 1 H), 4.54 - 4.60 (m, 2 H), 4.25 - 4.51 (m, 6 H), 1.46 - 1.60 (m, 9 H), 1.43 (td,  $J_1=7.1, J_2=0.8$  Hz, 3 H)

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta(\text{ppm}) = 166.5, 158.0, 155.9, 143.4, 133.3, 129.9, 129.8, 129.7, 129.4, 129.1, 128.8, 128.7, 127.1, 117.7, 114.8, 80.3, 68.9, 60.9, 49.0, 48.7, 28.4, 27.4, 14.3$

**HR-MS ESI**  $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}} = 448.2094$  ESI  $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}} = 448.2107$

**Compound 4 (4-(((4-(Allyloxy)benzyl)(tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)benzoic acid)**



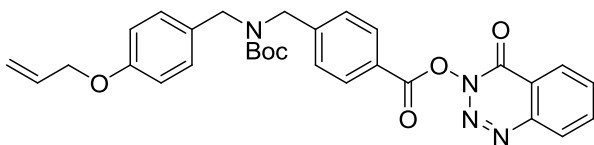
Potassium hydroxide (10 eq, 44 mmol, 2.47 g) was added to a solution of the previous Boc-compound (1 eq, 4.40 mmol, 1.87g) in MeOH (40 ml). The mixture was heated to reflux for 20 h then cooled to room temperature and acidified with HCl 10 %. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 80 ml) and the combined organic layers were washed with water (60 ml), dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under vacuum to yield a yellow oil (1.68 g, **96%**).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta(\text{ppm})$ : 8.09 (d,  $J=8.4$  Hz, 2 H), 7.29 (m, 2 H), 7.16 (d,  $J=9.5$  Hz, 2 H), 6.91 (d,  $J=8.0$  Hz, 2 H), 6.01 - 6.18 (m, 1 H), 5.45 (dd,  $J=17.3, 1.6$  Hz, 1 H), 5.33 (dd,  $J=10.5, 1.3$  Hz, 1 H), 4.57 (d,  $J=5.3$  Hz, 2 H), 4.27 - 4.51 (m, 4 H), 1.43 - 1.60 ppm (m, 9 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta(\text{ppm}) = 170.3, 158.0, 155.9, 133.2, 130.5, 129.8, 129.4, 128.9, 128.0, 127.8, 127.2, 117.7, 114.8, 80.4, 68.9, 49.2, 28.4$

**HR-MS ESI**  $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{calc}} = 420.1781$  ESI  $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{found}} = 420.1789$ .

### Compound 5



To a solution of **4** (1 eq, 4.23 mmol, 1.68 g) in dry dichloromethane (20 ml) were added hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine (1.1 eq, 4.66 mmol, 0.76 g) and N-N'-dicyclohexylcarbodiimide (1.1 eq, 4.66 mmol, 0.96 g). The mixture was stirred at room temperature for 24 h and the white product formed was filtered and washed with dichloromethane (20 ml). The colorless solution was concentrated under vacuum and the yellow oil obtained was purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95/5) to give a white product (1.92 g, **84 %**)

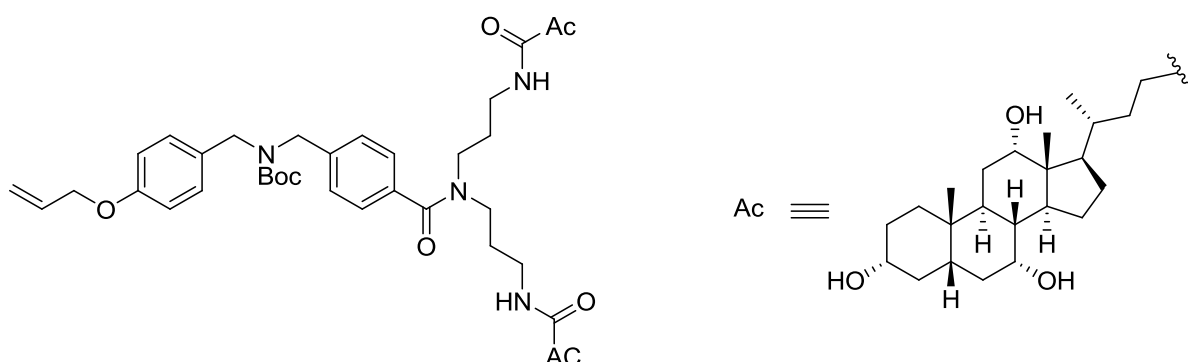
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm) = 8.46 (dd,  $J_1=7.9$ ,  $J_2=0.9$  Hz, 1 H), 8.30 (d,  $J=8.0$  Hz, 1 H), 8.25 (d,  $J=8.4$  Hz, 2 H), 8.07 (td,  $J_1=7.7$ ,  $J_2=1.4$  Hz, 1 H), 7.88 - 7.94 (m, 1 H), 7.33 - 7.47 (m, 2 H), 7.10 - 7.25 (m, 2 H), 6.91 (d,  $J=7.9$  Hz, 2 H), 6.03 - 6.16 (m, 1 H), 5.46 (dd,  $J_1=17.2$ ,  $J_2=1.7$  Hz, 1 H), 5.29 - 5.38 (m, 1 H), 4.58 (dt,  $J_1=5.3$ ,  $J_2=1.5$  Hz, 2 H), 4.46 (br. s., 4 H), 1.45 - 1.60 (m, 9 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ(ppm) = 162.6, 158.2, 155.9, 150.6, 144.5, 135.5, 133.3, 132.8, 131.0, 129.7, 129.5, 129.1, 128.8, 128.3, 127.5, 125.9, 124.2, 122.4, 117.8, 114.9, 80.5, 68.9, 49.4, 28.4

**HR-MS ESI** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 543.2238      ESI [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 543.2242

[M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 565.2058      ESI [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 565.2064

## Compound 7



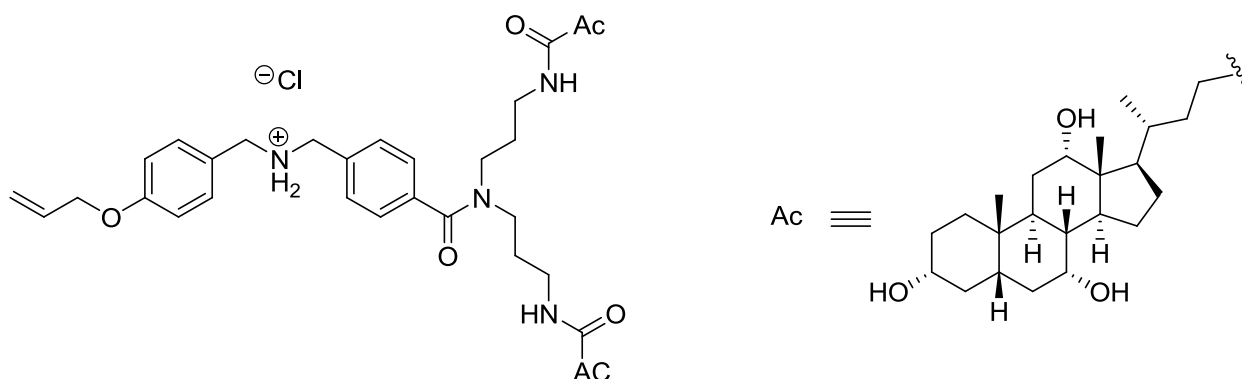
To a solution of *Umbrella* (2 eq, 0.550 mmol, 500 mg) in dry DMF (10 ml) heated to 50°C was added the triethylamine (15 eq, 3.64 mmol, 0.51 ml) and the **6** (1 eq, 0.243 mmol, 132 mg). The solution was heated to 70 °C for 24 h, cooled to room temperature and concentrated under vacuum. Purification by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1) resulted an orange solid (304 mg, **97%**).

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD, 400 MHz)  $\delta$ (ppm) = 7.26 - 7.41 (m, 4 H), 7.10 - 7.22 (m, 2 H), 6.92 (dd,  $J_1=8.6, J_2=2.0$  Hz, 2 H), 6.01 - 6.14 (m, 1 H), 5.44 (d,  $J=20$  Hz, 1 H), 5.28 (d,  $J=12$  Hz, 1 H), 4.53 - 4.58 (m, 2 H), 4.31 - 4.50 (m, 4 H), 3.96 (m, 2 H), 3.81 (br. s., 2 H), 3.51 - 3.62 (m, 2 H), 3.39 (br. s., 2 H), 2.97 - 3.08 (m, 2 H), 1.20 - 2.37 (m, 64 H), 0.96 - 1.09 (m, 9 H), 0.93 (d,  $J=1.8$  Hz, 6 H), 0.71 ppm (d,  $J=14.1$  Hz, 6 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD, 125 MHz)  $\delta$ (ppm) = 175.5, 175.3, 172.6, 158.1, 156.2, 135.3, 133.5, 128.9, 128.5, 127.7, 127.3, 126.4, 116.1, 114.5, 80.3, 72.6, 71.4, 68.4, 67.7, 67.4, 46.6, 46.1, 42.6, 41.8, 41.6, 39.6, 39.0, 36.6, 36.3, 35.5, 35.1, 34.5, 32.8, 31.9, 29.8, 28.2, 27.4, 27.1, 26.5, 25.1, 22.9, 21.8, 16.4, 11.7, 7.8

**HR-MS ESI**  $[M+H]^+_{\text{calc}} = 1291.882$       ESI  $[M+H]^+_{\text{found}} = 1291.874$   
 $[M+Na]^+_{\text{calc}} = 1313.864$       ESI  $[M+Na]^+_{\text{found}} = 1313.861$

## Compound 8



A 4M HCl solution (75 eq, 11.4 mmol, 0.95 ml) was added dropwise to a solution of the **7** (1 eq, 0.15 mmol, 196 mg) in EtOH at 0°C. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was evaporated under vacuum the crude product was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) and filtered to obtain the chloride salt of the umbrella thread. (179 mg, **quantitative yield**)

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD, 400 MHz) δ(ppm) = 7.67 (d, *J*=6.6 Hz, 2 H), 7.43 - 7.52 (m, 4 H), 7.04 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 6.01 - 6.14 (m, 1 H), 5.42 (dd, *J*<sub>1</sub>=17.2, *J*<sub>2</sub>=1.3 Hz, 1 H), 5.27 (d, *J*=10.4 Hz, 1 H), 4.60 (d, *J*=5.3 Hz, 2 H), 4.33 (br. s., 2 H), 4.26 (s, 2 H), 3.97 (br. s., 2 H), 3.82 (br. s., 2 H), 3.58 (m, 2 H), 3.37 - 3.45 (m, 2 H), 3.24 - 3.31 (m, 4 H), 2.99 (br. s., 2 H), 1.23 - 2.54 (m, 54 H), 0.98 - 1.10 (m, 8 H), 0.93 (s, 6 H), 0.73 (br. s., 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD, 125 MHz) δ(ppm) = 175.6, 175.4, 171.9, 159.8, 137.6, 133.2, 132.5, 131.3, 130.2, 126.8, 122.8, 116.4, 114.8, 72.6, 71.4, 68.5, 67.7, 50.5, 50.1, 46.6, 46.1, 42.6, 41.8, 41.6, 39.6, 39.1, 36.6, 36.3, 35.6, 35.1, 34.5, 32.9, 32.6, 32.0, 29.9, 28.3, 27.4, 27.1, 26.5, 22.8, 21.8, 16.4, 11.7

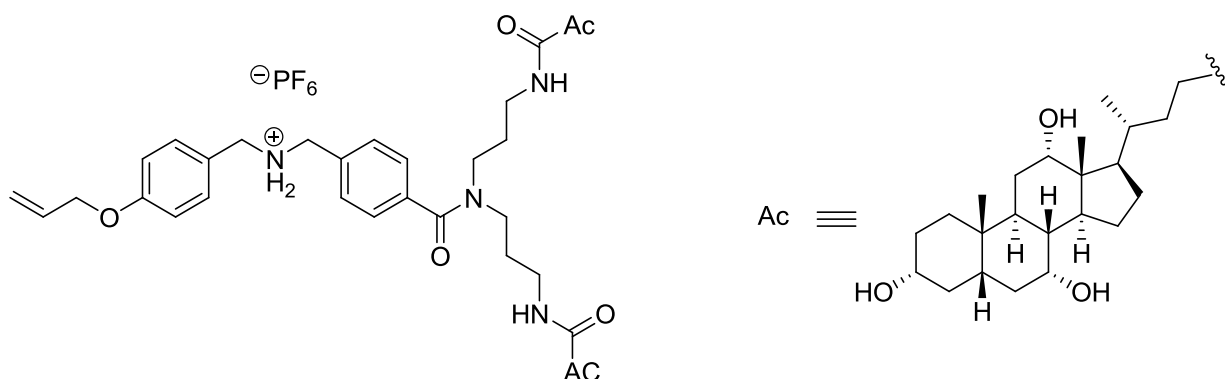
**HR-MS ESI** [M\*]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 1191.8295

ESI [M\*]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 1191.8282

[M+H]<sup>2+</sup><sub>calc</sub> = 596.9223

ESI [M+H]<sup>2+</sup><sub>found</sub> = 596.9213

### *Umbrella monomer (UM)*



Potassium hexafluorophosphate (2 eq, 0.49 mmol, 91 mg) was added to a solution of **8** (1 eq, 0.25 mmol, 304 mg) in 1 ml of methanol. The yellow solution was stirred at room temperature for 24 h. The solution was evaporated under vacuum then the crude product was dissolved in water (5 ml) and filtered to obtain **UM**. (294 mg, **quantitative yield**)

**RMN <sup>1</sup>H** (MeOD, 400 MHz)  $\delta$ (ppm) = 7.59 (d,  $J=8.0$  Hz, 2H), 7.50 (d,  $J=8.0$  Hz, 2H), 7.44 (d,  $J=8.0$  Hz, 2H), 7.05 (d,  $J=8.0$  Hz, 2H), 6.08 (m, 1H), 5.42 (dq,  $J=16.0, 4.0$  Hz, 1 H), 5.28 (dq,  $J=12.0, 4.0$  Hz, 1 H), 4.60 (dt,  $J=4.0$  Hz, 2 H), 4.31 (m, 2 H), 4.23 (br. s., 2 H), 3.97 (br. s., 2 H), 3.82 (br. s., 2 H), 3.59 (m, 2 H), 3.40 (m, 2 H), 3.27 (m, 4 H), 2.99 (m, 2 H), 1.20 - 2.37 (m, 54 H), 0.98 - 1.10 (m, 8 H), 0.94 (s, 6 H), 0.73 (s, 6 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (MeOD, 125 MHz)  $\delta$ (ppm) = 172.5, 172.0, 159.7, 137.7, 133.1, 132.6, 131.3, 130.1, 127.0, 122.9, 116.3, 115.1, 72.6, 71.4, 68.5, 67.6, 50.5, 50.0, 46.6, 46.1, 42.5, 41.6, 41.7, 39.6, 39.1, 36.5, 36.2, 35.6, 35.1, 34.5, 32.9, 32.6, 31.9, 29.8, 28.3, 27.3, 27.0, 26.4, 22.8, 21.7, 16.4, 11.6

**HR-MS ESI**  $[M^*]^+_{\text{calc}} = 1191.8295$       ESI  $[M^*]^+_{\text{found}} = 1191.8272$   
 $[M+H]^{2+}_{\text{calc}} = 596.9223$       ESI  $[M+H]^{2+}_{\text{found}} = 596.9205$   
 $[M^*]^-_{\text{calc}} = 144.9647$       ESI  $[M^*]^-_{\text{found}} = 144.9654$

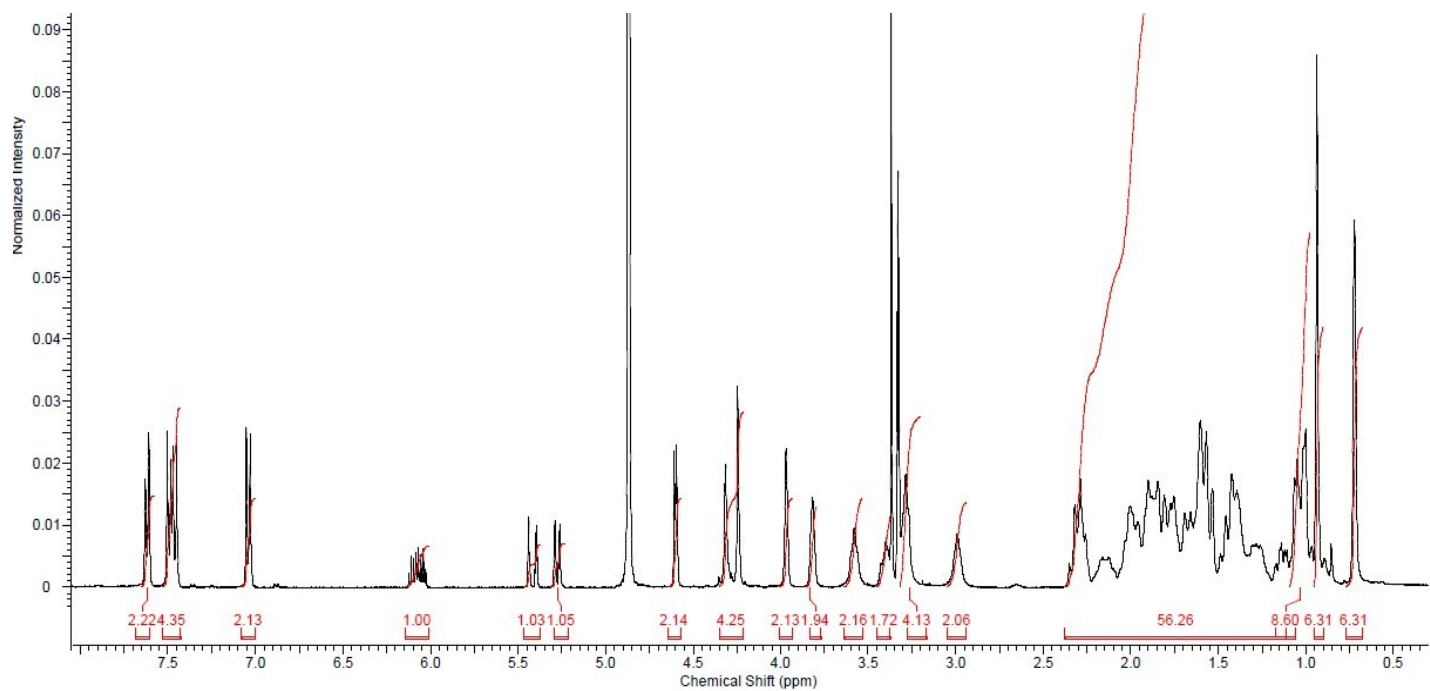


Figure A3.1 :  $^1\text{H}$  NMR spectra of UM

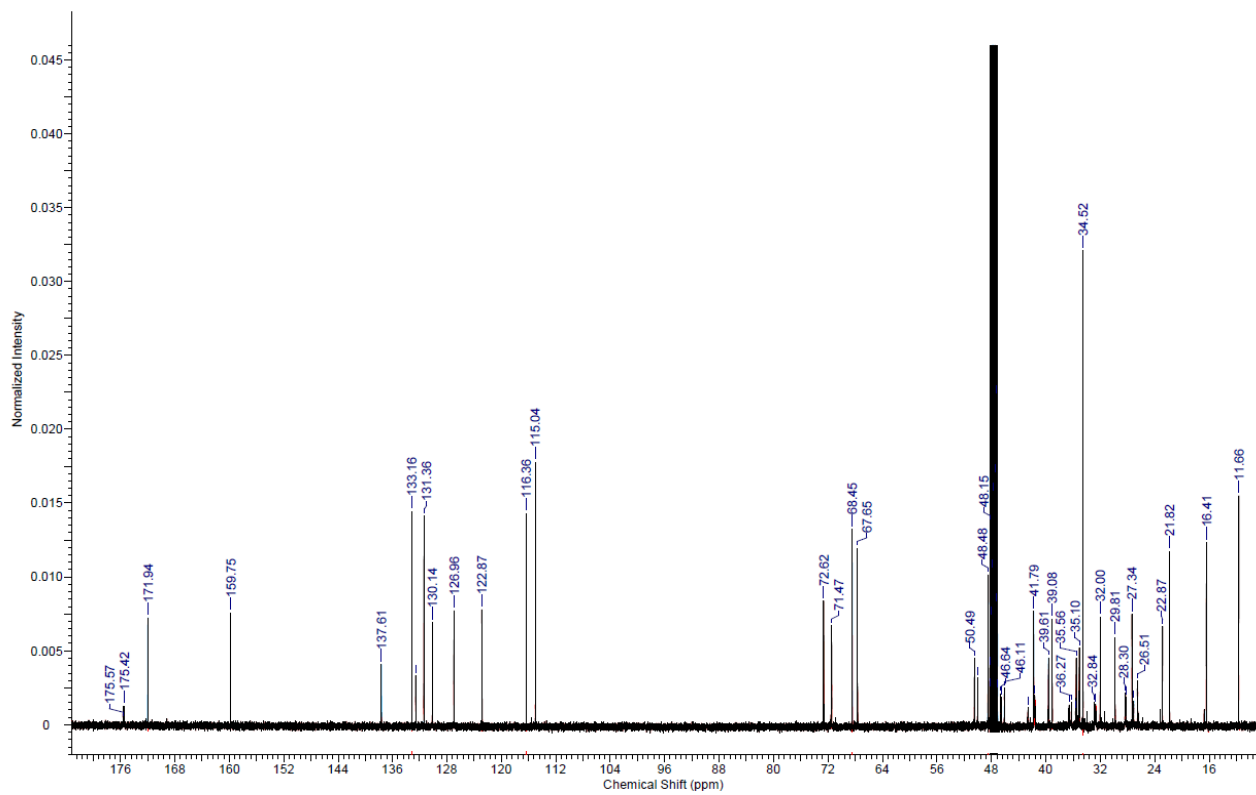
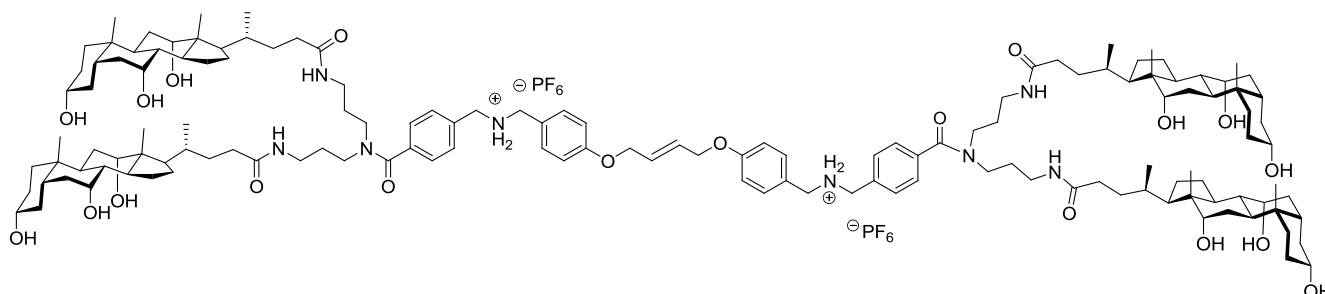


Figure A3.2 :  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of UM



### *Umbrella dimer (UD)*



Grubb's second generation catalyst (10 mol%,  $3.86 \cdot 10^{-3}$  mmol, 3.3 mg) and *p*-benzoquinone (10 mol%,  $3.86 \cdot 10^{-3}$  mmol,  $\approx 1$  mg) were added to a solution of **UM** (1 eq, 0.04 mmol, 51.7 mg) in 3 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The brown solution was stirred at  $40^\circ\text{C}$  for 24h. The mixture was cooled to room temperature and filtered. The brown solid was dissolved in methanol and evaporated under vacuum to give brown oil. The product was purified by preparative TLC ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1), to yield **UD** (90.9 mg, **quantitative yield**).

**RMN  $^1\text{H}$**  : (MeOD, 700 MHz)  $\delta(\text{ppm}) = 7.48$  (m, 4 H), 7.39 (t,  $J=7.4$  Hz, 4 H), 7.28 (m, 3 H), 7.20 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H), 6.94 (m, 3 H), 6.79 (d,  $J=9.0$  Hz, 2 H), 4.61 (m, 2 H), 3.74 - 3.99 (m, 20 H), 3.57 (m, 5 H), 3.39 (m, 5 H), 3.29 (m, 8 H), 3.01(m, 5 H), 0.84 - 2.34 (m, 205 H), 0.71 ppm (m, 12 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  : (MeOD ,175 MHz)  $\delta(\text{ppm}) = 175.4, 175.3, 172.6, 129.8, 129.7, 128.7, 126.3, 115.0, 114.6, 114.5, 72.6, 71.5, 67.6, 51.5, 46.6, 46.1, 42.6, 41.8, 41.6, 39.6, 39.1, 36.6, 36.2, 35.5, 35.1, 34.5, 34.5, 32.8, 32.7, 31.9, 31.7, 29.8, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.3, 28.2, 27.3, 27.1, 26.5, 26.2, 22.9, 22.3, 21.9, 21.8, 16.4, 13.0, 11.7$

**Maldi TOF-TOF**  $[\text{M-PF}_6]^+_{\text{calc}} = 2501.60$   $[\text{M-PF}_6]^+_{\text{found}} = 2501.57$

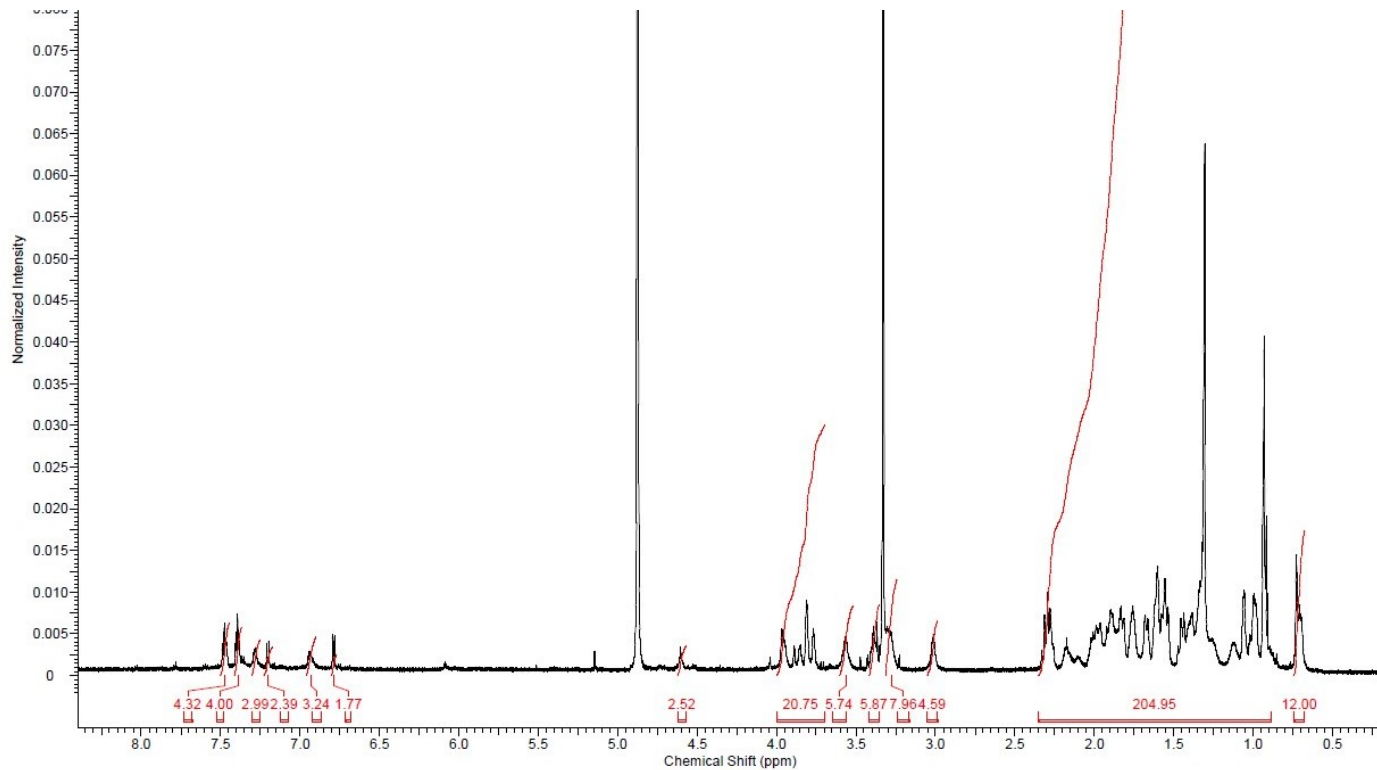


Figure A3.3 :  $^1\text{H}$  NMR spectra of UD

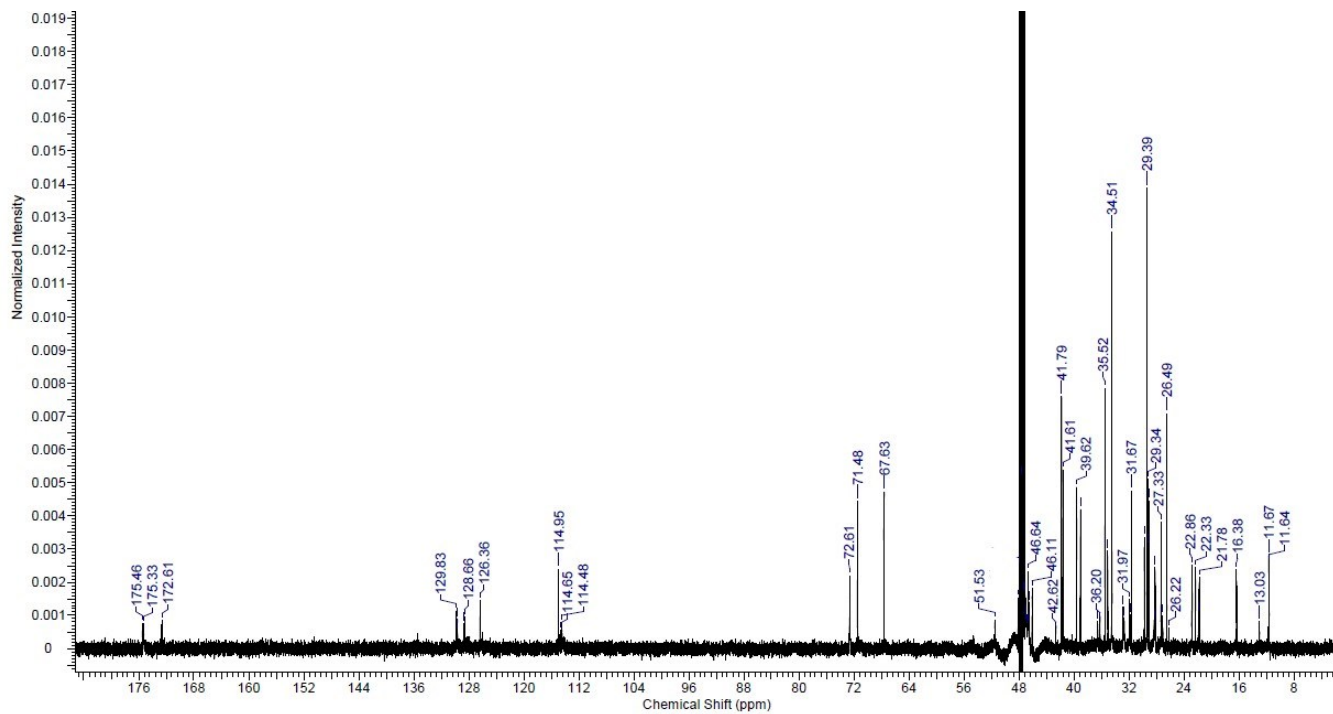


Figure A3.4 :  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of UD

## Ion transport experiments

### Preparation of EYPC large unilamellar vesicles (LUVs) for lucigenin based assays

A phospholipid film was formed by evaporating 1 ml chloroform solution containing 25 mg of EYPC, under vacuum at 25°C during 2 hours. The lipid film was then hydrated with 1 mL of a 2 mM lucigenin containing a buffer solution (10 mM, pH = 6.2) with NaCl (100 mM). The obtained suspension was subjected to at least 8 freeze/thaw/vortex cycles (1 cycle = 1 minute at - 78°C followed by 1 minute at 35°C and 1 minute in vortex). The solution was then extruded through a 100 nm polycarbonate membrane 21 times until the solution was transparent and passed down a Sephadex G-25 column to remove extravesicular lucigenin dye. The liposomes were eluted with a solution containing 10 mM of phosphate buffer (pH = 6.2) with 100 mM of NaCl. 5.3 mL of liposomes solution were isolated after separation. The stock solution was diluted to obtain a 5 mM lipid solution, assuming all EYPC was incorporated into the liposomes.

### Chloride transport assays with EYPC LUVs

A 50  $\mu$ L aliquot of the solution of EYPC LUVs (5 mM) were added to a 2.5 mL gently stirred thermostated to 25°C buffer solution containing 10 mM phosphate salt (pH = 6.2) with 100 mM NaNO<sub>3</sub>. The lucigenin fluorescence was monitored by excitation at  $\lambda_{\text{ex}} = 372$  nm and the emission was recorded at  $\lambda_{\text{em}} = 503$  nm. At  $t = 50$  s, 50  $\mu$ L of a solution of transporter at different concentrations in MeOH were added. At  $t = 300$  s, 100  $\mu$ L of a Triton-X 5% solution were added to lyse all liposomes to obtain the maximum of lucigenin fluorescence. The temperature was set to 25°C.

Experiments were repeated in triplicate and all the reported traces are the average of the three independent trials.

### Chloride transport assays with EYPC LUVs in different internal phosphate buffer

The chloride transport assays with EYPC LUVs in different phosphate buffer was similar to the protocol describe previously. Different external buffer solution 10 mM phosphate salt (pH = 6.2) with 100 mM NaX (X= NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) or 50 mM Na<sub>2</sub>X (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) were used.

### **Chloride transport assays with EYPC LUVs in different external phosphate buffer**

The chloride transport assays with EYPC LUVs in different phosphate buffer was similar to the protocol describe previously. Different internal buffer solution 10 mM phosphate salt (pH = 6.2) with 100 mM  $XNO_3$  ( $X = Na^+, Cu^+$ ) or 50 mM  $X_2NO_3$  ( $Ca^{2+}$ ) were used.

### **Preparation of EYPC/cholesterol 7/3 LUVs for lucigenin based assays.**

The preparation of EYPC/cholesterol (7/3, w/w, 60.8 mg LUVs) is based on the protocol of the preparation of EYPC LUVs described above.

### **Chloride transport assays with EYPC/cholesterol 7/3 LUVs.**

The chloride transport with EYPC/cholesterol 7/3 LUVs is identical to the chloride transport experiment through EYPC LUVs described above.

### **Preparation of EYPC LUVs for carboxyfluorescein (CF) based assays.**

The preparation of EYPC LUVs for CF transport assays is based on the protocol described above, including the following modifications. Internal buffer: 20 mM carboxyfluorescein solution diluted in phosphate buffer (20 mM, pH = 7.3) with NaCl (100 mM). External buffer: 20 mM of phosphate buffer with 100 mM of NaCl.

### **CF transport assays with EYPC LUVs.**

The CF transport through EYP LUVs is based on the procedure of chloride transport through EYPC LUVs described above, including the following modifications. A 10  $\mu$ L aliquot of the stock solution of EYPC LUVs (5 mM) were added to a 3 mL gently stirred thermostated external buffer solution 20 mM phosphate salt with 100 mM NaCl (pH = 7.3). The carboxyfluorescein fluorescence was monitored by excitation at  $\lambda_{ex} = 497$  nm and the emission was recorded at  $\lambda_{em} = 520$  nm.

### **Preparation of EYPC LUVs for HPTS based assays.**

The preparation of EYPC LUVs for HPTS based assays is based on the protocol described above, including the following modifications. Internal buffer: 10 mM sodium phosphate with

0.1 mM HPTS, 100 mM NaCl, pH = 6.4. External buffer: 10 mM sodium phosphate with 100 mM NaCl, pH = 6.4.

### **HPTS assays with EYPC LUVs.**

The transport through EYPC LUVs is based on the procedure of chloride transport through EYPC LUVs described above, including the following modifications. The HPTS fluorescence was monitored by excitation at  $\lambda_{\text{ex}} = 403$  nm and  $\lambda_{\text{ex}} = 460$  nm and the emission was recorded at  $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm

### **Conversion of fluorescence data into % of chloride efflux**

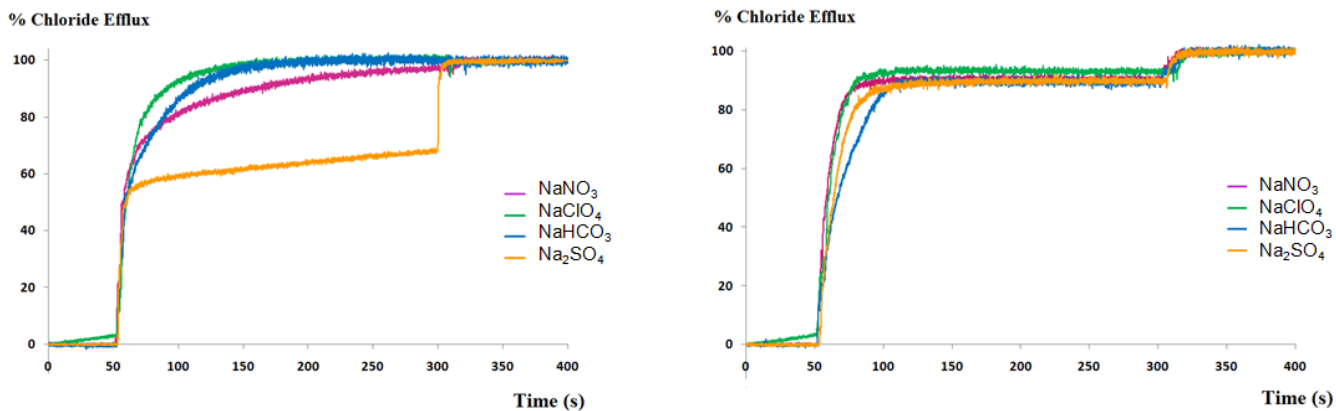
The residual fluorescence of the transporter was subtracted from each transport assays, then the curves were normalized using the following equation:

$$\% \text{Cl}_{\text{efflux}} = 100 * \frac{I - I_0}{I_{\text{max}} - I_0}$$

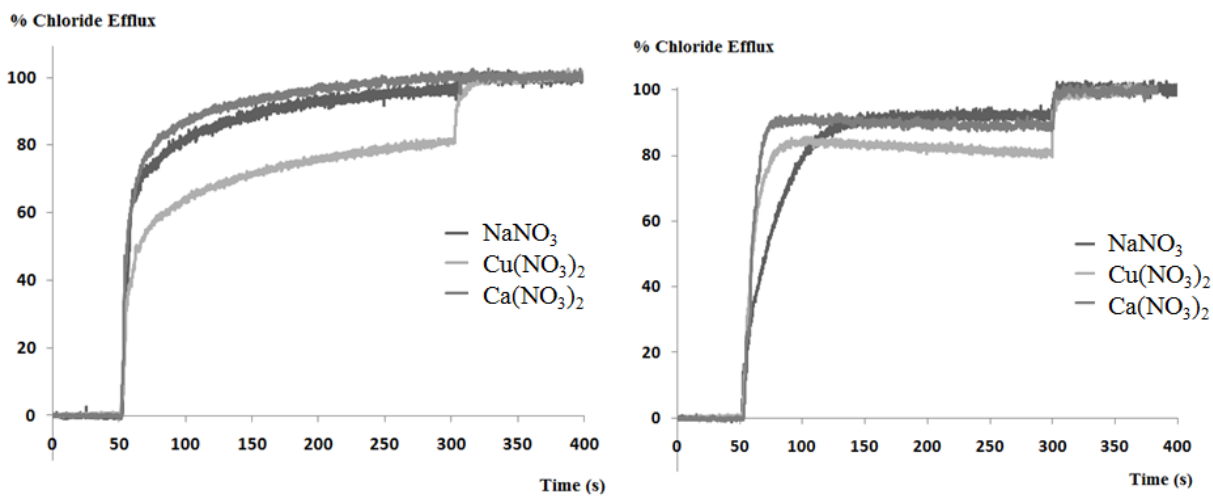
With  $I$  = fluorescence intensity

$I_0$  = fluorescence intensity before addition of the transporter

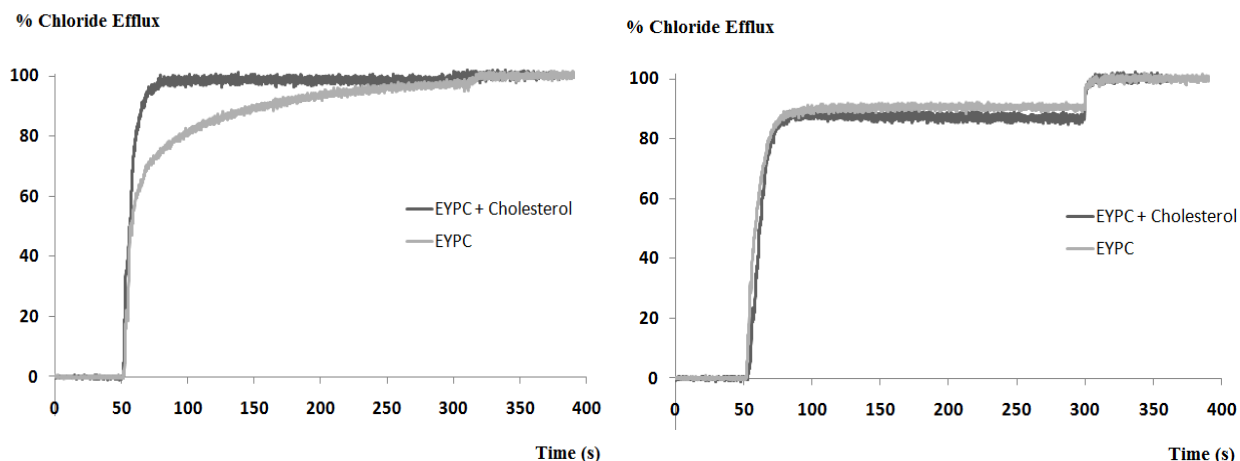
$I_{\text{max}}$  = fluorescence intensity at the end of the experiment.



**Figure A3.5 :** Relative chloride transport activity of **UM** (left) and **UD** (right) at 13.5 mol% (relative to the EYPC concentration) in liposomes buffered in different external solutions:  $\text{NaNO}_3$  (pink),  $\text{NaClO}_4$  (green),  $\text{NaHCO}_3$  (blue) and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (orange).



**Figure A3.6 :** Relative chloride transport activity of **UM** (left) and **UD** (right) at 13.5 mol% (relative to EYPC concentration) in liposome buffered in different external solutions:  $\text{NaNO}_3$  (dark grey),  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  (light grey),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (black).



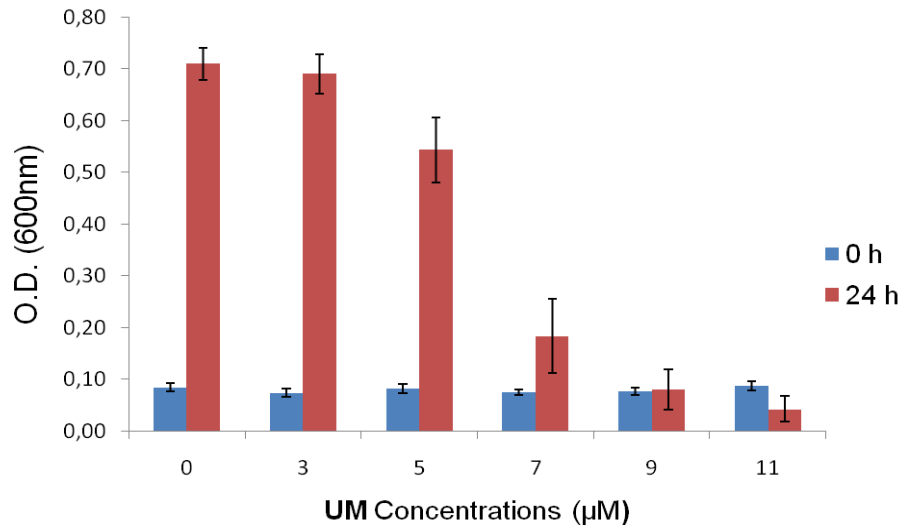
**Figure A3.7 :** Relative chloride transport activity of **UM** (left) and **UD** (right) at 13.5 mol% (relative to EYPC concentration) in EYPC liposome (grey) and EYPC/cholesterol (black).

### **Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC)**

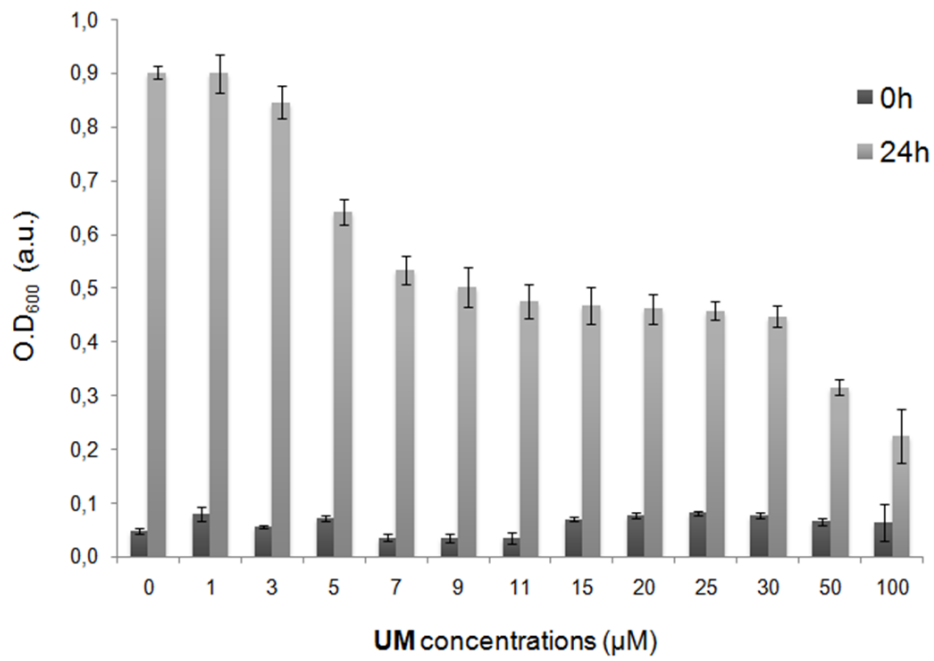
5 mL of lysogeny broth (LB) medium were inoculated with *Escherichia coli* (SK037 strain) or *Bacillus thuringiensis* (HD73 strain). The precultures were grown overnight at 37°C under agitation at 230 RPM, and resuspended in 75 mL of a fresh LB medium before growing at 37°C during 2 more hours. After this time, the cultures were rediluted in fresh LB medium to obtain an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.1-0.2.

Assays were performed in 96-well culture plates. Each well was filled with 185 µL bacterial cultures, 10 µL MiliQ water and 5 µL of DMSO or compounds in DMSO solution, as the final volume in each well was 200 µL and the max concentration of DMSO was 5%.

The plates were agitated at 230 RPM in a thermostated incubator at 37°C and the OD<sub>600</sub> was monitored at t = 0 h and t = 24 h. Every experiment was repeated in triplicate on independent bacterial cultures. The MICs were determined as the minimal concentration at which no bacterial growth was detected.



**Figure A3.8 :** Dose-dependent growth inhibition of *Bacillus thuringiensis* by UM.



**Figure A3.9 :** Dose-dependent growth inhibition of *Escherichia coli* by UM.

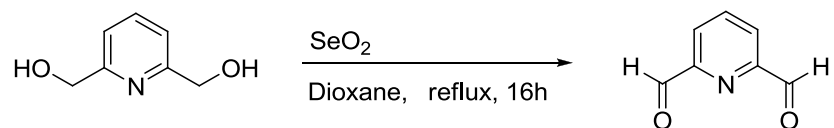


## **Annexe 4 : Partie expérimentale du chapitre 5 :**

Synthèse de rotaxanes parapluies comportant une roue biologiquement active

## Synthesis

### 2,6-Pyridinedicarboxaldehyde (5.2)



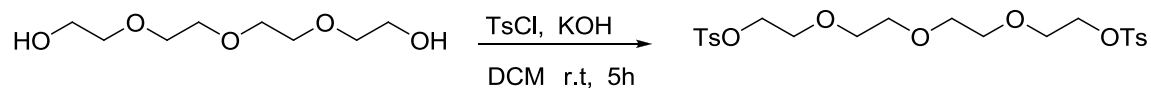
2,6-pyridine dimethanol ( 1eq, 409 mg, 2.94 mmol) and selenium oxide (1.1 eq, 3.23 mmol, 358 mg) were dissolved in dioxane (9 ml) and the solution was heated to reflux for 3 h. The mixture was then cooled to room temperature, filtered off on celite and the colorless solution was evaporated on vacuum. The product was dissolved on DCM, passed on a silica pad and evaporated in vacuo. The white solid was recrystallized form hot Et<sub>2</sub>O affording white crystals (96 mg, **24 %**)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 10.06 (s, 2H); 8.07 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.90 (d, *J*=7.6 Hz, 1H)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ(ppm): 192.5; 153.2; 138.6; 125,5

**HR-MS ESI** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 136.0393      ESI [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 136.0380

### Tetra(ethylene glycol) di-p-tosylate (5.4)



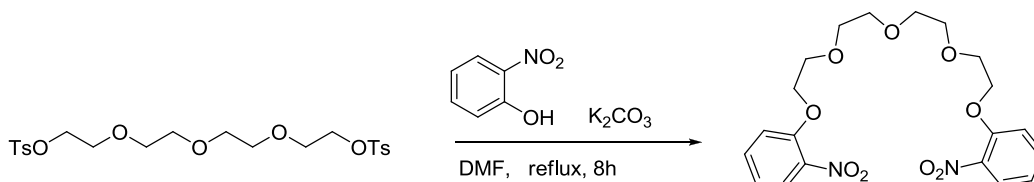
To a solution of tetra(ethylene glycol) (1 eq, 1.0 g, 5.15 mmol) and p-toluenesulfonyl chloride (2 eq, 1.96 g, 10 mmol) in dichloromethane (15 ml) cooled to 0 °C was added potassium hydroxide (8 eq, 2.31 g, 41.2 mmol). The white mixture was stirred for 5 h at 0°C and 50 ml of water was added to quench the reaction. After extraction with DCM ( 3 x 30 ml), the organic layer was washed with 50 ml of water, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum affording a colorless oil (2.46 g, **95 %**).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 7.82 (d, J= 8 Hz, 4 H), 7.37 (d, J= 8 Hz, 4 H), 4.18 (m, 4 H), 3.70 (m, 4 H), 3.59 (s, 8 H), 2.48 (s, 6 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ(ppm): 144.8; 133.0; 130.4; 128.9; 70.8; 70.6; 69.4; 68.9; 21.3

**HR-MS ESI** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 503.1404      ESI [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 503.1410

### 1,11-Bis(2-nitrophenoxy)3,6,9-trioxaundecane (5.5)



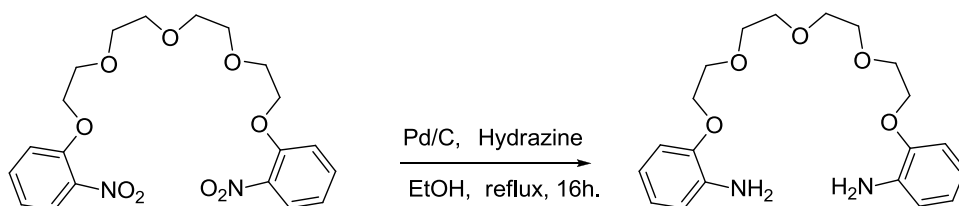
To a solution of 2-nitrophenol (2 eq, 1.36 g, 9.79 mmol) and potassium carbonate (2 eq, 1.35 g, 9.79 mmol) in DMF (20 ml) was added a solution of *Tetra(ethylene glycol) di-p-tosylate* **5.4** (1 eq, 2.45 g, 4.89 mmol) in DMF (10 ml). The mixture was heated to 130 °C during 10 h then cooled to room temperature and evaporated under vacuum. 50 ml of water were added to dissolve the mixture and extracted with AcOEt (4x20 ml). The organic layer was washed with water (3x25 ml), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum. The orange product was purified by flash chromatography (SiO<sub>2</sub>, AcOEt/Hex 8:2) giving an yellow oil (1.34 g, **63%**).

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 7.81 (dt, J=8.1, 1.6 Hz, 2 H), 7.51 (tdd, J=8.0, 1.6 Hz, 2 H), 7.12 (d, J=8.4 Hz, 2 H), 7.01 (m, 2 H), 4.26 (t, J=4.8 Hz, 4 H), 3.89 (m, 4 H), 3.60 - 3.80 ppm (m, 8 H)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ(ppm): 151.0; 140.3; 134.2; 125.7; 120.1; 115.3; 71.0; 69.9; 68.3; 68.1;

**HR-MS ESI** [M+Na]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 459.1374      ESI [M+Na]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 459.1389

### 1,11-Bis(2-aminophenoxy) 3,6,9-trioxaundecane (5.6)



To a solution of *1,11-Bis(2-nitrophenoxy)3,6,9-trioxaundecane* **5.5** (1 eq, 1.34 g, 3.07 mmol) in ethanol (60 ml) was added palladium on activated charcoal 10% (0.1 eq, 32 mg, 0.31 mmol) and the solution was heated to 50 °C. A solution of hydrazine hydrate 60 % (14 eq, 2.10 ml, 43 mmol) in EtOH (7ml) was added dropwise then the mixture was heated to reflux for 3h. The brown mixture was filtered over celite and the yellow solution was evaporated under vacuum. The product was purified by flash chromatography giving white oil (0.98 g, **85%**)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm): 6.85 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 6.76 (m, 4 H), 6.68 (m, 2 H), 4.09 - 4.17 (m, 4 H), 3.82 - 3.88 (m, 4 H), 3.63 - 3.75 (m, 10 H),

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ(ppm): 146.8; 136.4; 122.1; 119.1; 116.3; 111.4; 71.0; 69.9; 68.5; 68.3

**HR-MS ESI** [M+H]<sup>+</sup><sub>calc</sub> = 377.2071      ESI [M+H]<sup>+</sup><sub>found</sub> = 377.2081

