

Université de Montréal

**Perturbation de la membrane cellulaire par des composés
cationiques : transport transmembranaire contrôlé et
applications biologiques**

par

Julien Gravel

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 2017

© Julien Gravel, 2017

Résumé

Les sels contenant des cations organiques sont une classe importante de composés cliniquement utilisés. Ils possèdent de nombreuses propriétés qui sont utilisées pour des applications biologiques, dont, entre autres, la possibilité de perturber les membranes cellulaires. Dans cette thèse, nous nous intéressons particulièrement au déséquilibre de l'homéostasie induit par l'insertion de certains sels d'imidazolium dans la membrane phospholipidique. La perturbation membranaire qui en résulte ouvre la porte au développement de certaines applications potentielles, telles que le traitement de maladies provenant des dysfonctions du transport ionique transmembranaire, ou bien comme stratégie émergente pour attaquer efficacement des microorganismes indésirables, comme les bactéries multirésistantes, fléau des temps modernes.

Pour ce faire, nous avons démontré le transport transmembranaire d'anions effectué par une nouvelle classe de transporteurs mobiles organiques : des sels d'imidazolium fonctionnalisés par des groupements adamantyles. Le contrôle du processus de transport peut être réalisé par l'ajout de cyclodextrines, qui conduit à la formation d'une entité supramoléculaire incapable de perturber la membrane phospholipidique. L'ajout d'un composé invité compétitif permet de disloquer le transporteur du complexe supramoléculaire et de restaurer l'activité de transport transmembranaire. Ce système a ensuite été étudié pour une application potentielle comme stratégie d'administration de médicament contrôlable. La toxicité des sels d'imidazolium contre des bactéries *Bacillus thuringiensis* a été démontrée comme étant réversible, selon le même modèle que le transport transmembranaire. Nous présentons également un essai spectroscopique simple qui nous permet de quantifier la perméabilisation des membranes des bactéries *Escherichia coli*. Cette nouvelle approche permet le suivi de la perméabilisation de la membrane bactérienne, induite par le chlorure de benzalkonium ou par d'autres composés cationiques.

Mots-clés : Sels d'imidazolium, cyclodextrines, chimie supramoléculaire, auto-assemblage, transport ionique transmembranaire, membranes cellulaires, phospholipides.

Abstract

Salts containing organic cations are an important class of clinically used compounds. They possess numerous biological applications resulting from their capacity to disrupt cellular membranes. In this thesis, we are particularly interested in the disruption of homeostasis disruption induced by the insertion of imidazolium salts in phospholipid membranes. The resulting membrane disruption has potential applications, such as the treatment of diseases arising from the dysfunction of ion transport, or in an emerging strategy to target effectively the membranes of unwanted microorganisms, such as multidrug resistant bacteria, a scourge of modern times.

We present the transmembrane transport of anions by a new class of organic mobile transporters: adamantyl-functionnalized imidazolium salts. The transport process can be controlled by the addition of cyclodextrins that form supramolecular entities that are unable to disrupt the phospholipid membrane. The transmembrane transport properties of the imidazolium salts can be completely restored by the addition of a competitive guest. This system had shown a potential application as a controllable drug delivery strategy, where the toxicity of imidazolium salts toward *Bacillus thuringiensis* bacteria has been demonstrated to be reversible, by modulating transmembrane ion transport. We also present a simple spectroscopic assay that we developed to quantify permeabilization of the bacterial envelope of *Escherichia coli*. The novel approach can be used to monitor the permeabilization of the bacterial membrane that is induced by benzalkonium chloride or other cationic compounds.

Keywords : Imidazolium salts, cyclodextrins, supramolecular chemistry, self-assembly, transmembrane ion transport, cell membranes, phospholipids.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	xii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction générale	1
1.1 La chimie supramoléculaire	1
1.1.1 Les interactions intermoléculaires	2
1.1.2 Les macrocycles en chimie supramoléculaire	8
1.1.3 Les récepteurs d'anions.....	10
1.2 La membrane cellulaire	11
1.2.1 La bicouche de phospholipides	13
1.2.2 Le transport transmembranaire.....	16
1.3 Les composés cationiques.....	23
1.3.1 Les composés ammoniums quaternaires.....	24
1.3.2 Les sels d'imidazolium	26
1.4 Description du projet de recherche.....	32
1.4.1 Propriétés anionophores de sels d'imidazolium fonctionnalisés par des groupements adamantyles.....	32
1.4.2 Formation du complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine et développement d'un système de transport transmembranaire réversible	33
1.4.3 Application biologique du système de transport transmembranaire anionique réversible.....	34
1.4.4 Mise au point d'un essai quantitatif pour évaluer la perturbation de l'enveloppe bactérienne à Gram négatif.....	34

1.5 Références	36
Chapitre 2 : Transport transmembranaire d'anions dans des liposomes par des sels d'imidazolium fonctionnalisées par des groupements adamantyles	41
2.1 Préface	41
2.1.1 Concepts et méthodes utilisées	42
Article 1 : Transmembrane anion transport mediated by adamantyl-functionalised imidazolium salts	47
2.2 Abstract	48
2.3 Introduction	48
2.4 Results and discussion	50
2.4.1 Synthesis	50
2.4.2 Transmembrane anion transport activity and mechanism	52
2.5 Conclusion	62
2.6 Acknowledgements	63
2.7 References	63
Chapitre 3 : Transport anionique réversible dans des liposomes par l'utilisation d'un système supramoléculaire compétitif	66
3.1 Préface	66
3.1.1 Concept et méthodes utilisées	67
Article 2 : Host-guest strategy to reversibly control a chloride carrier process with cyclodextrins	69
3.2 Abstract	70
3.3 Introduction	70
3.4 Results and discussion	72
3.4.1 Supramolecular complex characterization	72
3.4.2 Lucigenin-based ion transport studies	75
3.4.3 Planar lipid bilayer experiments	81
3.5 Conclusion	83
3.6 Experimental section	83
3.7 Acknowledgements	86

3.8 References	86
Chapitre 4 : Étude d'un système supramoléculaire réversible dans des membranes complexes	88
4.1 Préface	88
4.1.1 Concepts et méthodes utilisées	90
Article 3 : Host-guest strategy to potently camouflage and restore the activity and toxicity of drugs affecting bacterial growth and viability	92
4.2 Abstract	93
4.3 Introduction	93
4.4 Results and discussion	94
4.5 Conclusion	100
4.6 Acknowledgements	100
4.7 References	100
Chapitre 5 : Mise au point d'un essai pour quantifier la perméabilisation de l'enveloppe bactérienne à Gram négatif	102
5.1 Préface	102
5.1.1 Concepts et méthodes utilisées	103
Article 4 : Adaptation of a bacterial membrane permeabilization assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride as a membrane-disrupting agent	105
5.2 Abstract	106
5.3 Introduction	106
5.4 Results and discussion	110
5.5 Conclusion	117
5.6 Acknowledgements	118
5.7 References	119
Chapitre 6 : Conclusion et Perspectives	121
6.1 Transport transmembranaire contrôlé : vers le ciblage de la toxicité	121
6.2 Perméabilisation des membranes bactériennes	125
6.3 Références	128

Partie expérimentale	129
Liste des tableaux de la partie expérimentale	130
Liste des figures de la partie expérimentale	131
Annexe 1 : Informations supplémentaires de l'article 1 « Transmembrane anion transport mediated by adamantyl-functionalised imidazolium salts »	136
Annexe 2 : Informations supplémentaires de l'article 2 « Host-guest strategy to reversibly control a chloride carrier process with cyclodextrins ».....	163
Annexe 3 : Informations supplémentaires de l'article 3 « Host-guest strategy to potently camouflage and restore the activity and toxicity of drugs affecting bacterial growth and viability ».....	182
Annexe 4 : Informations supplémentaires de l'article 4 « Adaptation of a bacterial membrane permeabilization assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride as a membrane-disrupting agent ».....	198
Références de la partie expérimentale	216

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Résumé des interactions intermoléculaires	2
Tableau 1.2 Gradients transmembranaires d'ions dans une cellule eucaryote	16
Table 2.1 Kinetic parameters of molecule 2.3·NTf₂	57
Table 2.2 Binding constants of chloride with transporters 2.1·NTf₂ , 2.2·NTf₂ , 2.3·Br , 2.3·NTf₂ , 2.4·NTf₂ and 2.5·NTf₂	58
Table 3.1 Association constants for adamantane guests.....	80
Table 5.1 EC ₅₀ of BAC determined from the biphasic dose-response analysis	113
Tableau 6.1 Valeurs des MICs des composés 6.5 à 6.8	126

Liste des figures

Figure 1.1 Exemples de l'effet hydrophobe	3
Figure 1.2 Exemples d'interactions π	5
Figure 1.3 Exemples d'interactions de type pont hydrogène	6
Figure 1.4 Exemple de liaisons halogène	6
Figure 1.5 Exemples d'interactions électrostatiques ioniques et dipolaires.....	7
Figure 1.6 Exemples de macrocycles fréquemment utilisés en chimie supramoléculaire	8
Figure 1.7 Les cyclodextrines.....	9
Figure 1.8 La membrane cellulaire procaryote.....	12
Figure 1.9 Exemple d'un phospholipide	14
Figure 1.10 Perméabilité de solutés communs face à la bicouche de phospholipides.....	14
Figure 1.11 Représentation schématique d'un liposome.....	15
Figure 1.12 Schémas des différents modes de transport	17
Figure 1.13 Premiers exemples de transporteurs synthétiques	18
Figure 1.14 Transporteurs d'anions à base de stéroïdes et de cyclohexanes.....	20
Figure 1.15 Transporteurs d'anions à base de phénylthiourée	21
Figure 1.16 Transporteurs d'anions utilisant les interactions anion- π	22
Figure 1.17 Transporteur d'anions utilisant les liaisons halogène.....	23
Figure 1.18 Quelques exemples de composés cationiques cliniquement utilisés.....	24
Figure 1.19 Exemples de QACs couramment utilisés	25
Figure 1.20 Effet synergique de l'activité biocide de 1.10 et de la β -CD sur l'enveloppe d'un virus.....	26
Figure 1.21 Quaternisation de l'imidazole.....	27
Figure 1.22 Synthèse de sels d'imidazolium à partir d'amines	28
Figure 1.23 Synthèse de sels d'imidazolium sans halogénure à partir d'un alcool	28
Figure 1.24 Premiers exemples de récepteurs d'anions basés sur des sels d'imidazolium.....	28
Figure 1.25 Matériaux polymères antibactériens à base de sels d'imidazolium et leurs activités antibactériennes.....	29
Figure 1.26 Représentation de la formation d'un biofilm bactérien	30

Figure 1.27 Structure du pillararène 1.22 aux propriétés inhibitrices de formation d'un biofilm	31
Figure 1.28 Structures des premiers transporteurs d'anions basés sur des sels d'imidazolium, de benzimidazolium ou de benzimidazole.	33
Figure 1.29 Images SEM de bactéries <i>E. coli</i>	35
Figure 2.1 Structure de sondes fluorescentes utilisées en transport ionique	42
Figure 2.2 Schéma du tube en U	44
Figure 2.3 Adamantyl-imidazolium salts	49
Figure 2.4 Synthesis of imidazolium salts 2.1·Br and 2.1·NTf₂	50
Figure 2.5 Synthesis of imidazolium salts 2.2·Br , 2.3·Br , 2.4·Br and 2.5·Br	51
Figure 2.6 Synthesis of imidazolium salts 2.2·NTf₂ , 2.3·BF₄ , 2.3·PF₆ , 2.3·NTf₂ , 2.4·NTf₂ and 2.5·NTf₂	51
Figure 2.7 Relative chloride transport activity of different bromide imidazolium salts.....	52
Figure 2.8 Relative chloride transport activity of imidazolium salt 2.3 bearing different counter-anion	53
Figure 2.9 Relative chloride transport activity of imidazolium salt 2.3·NTf₂	54
Figure 2.10 Relative chloride transport activity of transporter 2.3·NTf₂ at different concentrations	56
Figure 2.11 Hill plot analysis obtained from data shown in figure 2.10.....	57
Figure 2.12 Relative chloride transport activity of imidazolium salt 2.3·Br	59
Figure 2.13 Relative chloride transport activity of imidazolium salt 2.3·NTf₂	60
Figure 2.14 Anion metathesis between transporter molecule 2.3·Br and extravesicular anion before undergoing chloride transport process.....	60
Figure 2.15 HPTS-based transport assay of imidazolium salt 2.3·NTf₂	61
Figure 3.1 Représentation schématique du transport réversible activé par un ligand et désactivé par la β -CD	66
Figure 3.2 Représentation schématique du montage expérimentale de la BLM	68
Figure 3.4 ¹ H NMR Job plot of carrier 3.1 with β CD	73
Figure 3.5 Packing motif of 3.1 and 3.1:(βCD)₂ showing their self-assembly in the solid state	75
Figure 3.6 Relative chloride transport activity of 3.1 with β CD	76

Figure 3.7 Relative chloride transport activity of 3.1 at 20 mol% relative to EYPC added at 50 s and β CD was added at 100 s in different concentrations.....	78
Figure 3.8 Reversible transport process	79
Figure 3.9 Reversible chloride transport activity of 3.1 at 20 mol% relative to EYPC added at 50 s. The chloride transport is inhibited by the addition of 4 eq. of β CD at 75 s. Excess of a competitive guest is added at 125 s.....	80
Figure 3.10 Reversible anion transport process in BLM bilayer experiment.....	81
Figure 3.11 Inhibition of the anion transport process by addition of β CD in the trans chamber	82
Figure 4.1 Assemblage supramoléculaire d'un polymère antibactérien et son désassemblage pour le contrôle réversible de la génération de ROS.....	89
Figure 4.2 Fonctionnement de l'essai LIVE/DEAD™ <i>BacLight</i> ™.....	90
Figure 4.3 Deactivation of the antibacterial properties of 4.1 by the formation of 4.1:(βCD)₂ inclusion complex and reactivation of its biological activity by the addition of a competitive guest	95
Figure 4.4 Bacterial growth for <i>B. thuringiensis</i> treated with 4.1 , 4.1:(βCD)₂ and 4.1:(βCD)₂:CG	96
Figure 4.5 Membrane integrity assays of <i>B. thuringiensis</i> treated with 4.1 , 4.1:(βCD)₂ and 4.1:(βCD)₂:CG	97
Figure 4.6 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> using the <i>BacLight</i> ™ stains after incubation for 3 hours with 4.1 , 4.1:(βCD)₂ and 4.1:(βCD)₂:CG	98
Figure 4.7 Hemolytic activities of 4.1 , 4.1:(βCD)₂ and 4.1:(βCD)₂:CG after 24 hours.....	99
Figure 5.1 Perméabilisation de la membrane bactérienne : hydrolyse de l'ONPG en ONP en présence d'un perturbateur membranaire	103
Figure 5.2 Détermination de la perméabilisation de la membrane externe d'une bactérie par l'observation de l'insertion du N-phényl-1-naphtylamine (NPN).....	104
Figure 5.3 Chemical structure of benzalkonium chloride	108
Figure 5.4 Dose-response relationship between the concentration of polymyxin B and the ONPG hydrolysis rate for a bacterial population of 7.2×10^7 colony forming units (CFU)·mL ⁻¹	111
Figure 5.5 Dose-response relationship between the concentration of BAC and the ONPG hydrolysis rate for different bacterial populations	112

Figure 5.6 Linear relationship between the 2nd EC ₅₀ and the bacterial population	114
Figure 5.7 Relative fluorescence of NPN induced by different concentration of BAC	115
Figure 5.8 Long-term membrane permeabilization induced by BAC at sub-MIC concentrations at a bacterial population of 2.2×10^7 CFU·mL ⁻¹	117
Figure 6.1 Structure du conjugué β -CD-AF 6.1 proposé.	122
Figure 6.2 Représentation schématique illustrant la stratégie d'administration ciblée de médicaments	123
Figure 6.3 Proposition de la synthèse pour le conjugué β -CD-AF 6.1	124
Figure 6.4 Structures des sels de benzimidazolium étudiés pour leurs propriétés antibactériennes	125
Figure 6.5 Cinétique de l'hydrolyse de l'ONPG des composés 6.5 à 6.8 à une population bactérienne de 2.5×10^7 CFU·mL ⁻¹	127

Liste des abréviations

Å :	Angström
ACN :	Acétonitrile
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Adm :	Adamantyle
ADP :	Adénosine diphosphate
AF :	Acide folique
AP :	Acide ptéroïque
ATP :	Adénosine triphosphate
BAC :	Benzalkonium chloride
BLM :	Black lipid membrane
Boc :	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle
<i>B. thuringiensis</i> :	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CB[7] :	Cucurbit[7]urile
CD :	Cyclodextrine
CFTR :	Cystic fibrosis transmembrane regulator
CGTase :	Cyclodextrine glycosyltransférase
DCM :	Dichlorométhane
DMF :	Diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPPC :	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DPhPC :	1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocoline
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
Eq. :	Equivalent
<i>et al.</i> :	Et alii (« et autres » en latin)
<i>etc.</i> :	Et cætera (« et les autres choses » en latin)
EYPC :	Egg yolk phosphatidylcholine
Glu :	Acide glutamique
GlyR :	Glycine receptor
h :	Heure

HBTU :	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HPTS :	8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate de trisodium
HRBC :	Human red blood cell
HRMS :	High resolution mass spectrometry
J :	Constante de couplage
λ_{em} :	Longueur d'onde d'émission
λ_{ex} :	Longueur d'onde d'excitation
LB :	Lysogeny broth
LC :	Liquid chromatography
LUV :	Large unilamellar vesicle
μ L :	Microlitre
μ m :	Micromètre
m :	Multiplet
Me :	Méthyle
mg :	Milligramme
mL :	Millilitre
MHz :	Mégahertz
MIC :	Minimal inhibition concentration
min :	Minute
mM :	Millimolaire
MS :	Mass spectrometry
mV :	Millivolt
N.B. :	Nota bene (« bien noter que » en latin)
nm :	Nanomètre
NMP :	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NMR :	Nuclear magnetic resonance
NPN :	<i>N</i> -phényl-1-naphtylamine
NTf ₂ :	Bis(trifluoromethylsulfonyl)amide
OD :	Optical density
ONP :	Ortho-nitrophénol
ONPG :	Ortho-nitrophényl- β -galactoside

OTf :	Triflate
p. :	Page
ppm :	Partie par million
pF :	Picofarad
PG :	Peptidoglycanes
PI :	Propidium iodide
PPV :	Poly(phenylenevinylene)
QAC :	Quaternary ammonium compound
RF :	Récepteur de folates
RTFK :	Régulateur transmembranaire de la fibrose kystique
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROS :	Reactive oxygen species
s :	Seconde (ou singulet en caractérisation RMN)
SEM :	Scanning electron microscope
t :	Triplet
TBAC :	Tetrabutylammonium chloride
TBAF :	Tetrabutylammonium fluoride
THF :	Tétrahydrofurane
TOF :	Time of flight
Trp :	Tryptophane
UV :	Ultraviolet
Vis :	Visible
XRD :	X-ray diffraction

À Christine et Vicky, les femmes de ma vie

Remerciements

Jamais je n'aurais pu entreprendre l'envergure de ces études seul. C'est pourquoi il est d'une importance capitale de remercier ceux qui m'ont soutenu, aidé et encouragé, et il y en a beaucoup!

Bien sûr, je remercie en premier Andreea, sans qui rien de tout ceci n'aurait pu prendre forme. Merci beaucoup Andreea de m'avoir accepté au sein du groupe et encadré durant ces sept années, du premier cycle à la fin de mes études graduées. Je te remercie pour tes conseils, ton aide, tes idées et, surtout, ta persévérance : je sais que cela n'a pas toujours été facile! Merci beaucoup pour le nombre de fois où tu m'as partagé tout le plaisir que tu as dans la vie. Je me souviendrai toujours de l'appui que tu m'as apporté et t'en serai éternellement reconnaissant.

Je souhaite aussi remercier mon groupe. Tout d'abord, mes mentors, ceux qui m'ont inspiré le long de mes études : Marc, Mathieu Branca, Nadim, Vincent et Salim. Sans vous, je n'aurais probablement jamais commencé ces études et je n'aurais pas eu le plaisir d'avoir développé cette passion. Un merci particulier à Vincent, qui m'a suivi et conseillé tout le long de mon cursus (il a même révisé cette thèse!), vraiment, merci. Je remercie également tous les membres du groupe avec lesquels j'ai interagi pendant mes stages et lors de mes études graduées. Merci beaucoup Alexandra Doré, Audrey Hébert, Audrey Provencher, Christine, Claude, Dat, Farza, Josée, Margaux, Maria, Marie, Samantha, Thierry, Valentina, Vanessa, et tous les stagiaires! Vous avez tous contribué à une atmosphère plaisante qui m'a donné le goût de venir travailler tous les jours! Un merci à mes stagiaires avec qui j'ai probablement plus appris que je ne leur ai enseigné : Sébastien Camiré, Prunelle et Sébastien Néron.

Merci beaucoup Jérémie et Solène d'avoir partagé plein de moments avec moi. Que ce soit en prenant un (ou des) verre, en mangeant du poulet péruvien ou en faisant des surprises à So, c'était toujours très agréable de partager histoires et fous rires avec vous.

Julie, un grand merci juste pour toi, car nous avons partagé beaucoup (tout?) lors de nos études graduées. Cela fait maintenant un an que tu es partie et je dois te dire que ça me manque beaucoup de travailler avec toi. Nous formions une équipe formidable et j'espère retrouver ce genre de symbiose avec de futurs collègues et amis. Tu as rendu ces quatre années incroyables!

Je tiens à remercier aussi les collègues des groupes voisins! Je pense au Pr. Shawn Collins, qui était toujours là lorsque j'avais des questions. Je pense à Anne-Catherine qui m'a aidé lors de mon séminaire. Bien sûr, je remercie tous les membres du groupe que j'ai côtoyés : Anna, Antoine, Augusto, Clémentine, Émilie, Éric, Jean-Cristophe, Marie-Ève, Mike, Michael, Mylène, Philippe, Shawn Jr et Tatiana.

Je remercie les étudiants du groupe de Catherine Paradis-Bleau, qui m'ont soutenu lorsque je travaillais auprès d'eux. J'aimerais remercier plus particulièrement Karine, Larbi, Imène, Rim et Sean, qui m'ont tout montré en laboratoire de microbiologie.

Je remercie les amis du Bac qui m'ont suivi dans cette aventure! Merci Alexandra Aubé, Jeffrey, Mathieu Charbonneau, Sébastien Maillette, Sarah et Sophie. Merci pour tout!

Merci beaucoup aux professeurs qui m'ont épaulé durant ces sept années : Pr. Joelle Pelletier, Pr. William Lubell et Pr. Kevin Wilkinson. Un grand merci, aussi, pour m'avoir laissé utiliser vos équipements de recherche. Merci à tous les services du département, particulièrement Sylvie Bilodeau du service de RMN, Alexandra Furtos du service de spectrométrie de masse et Huguette Diné des laboratoires académiques.

Plus personnellement, je tiens à remercier ma famille de m'avoir donné et redonné le courage nécessaire pour terminer cette entreprise. Merci maman et papa d'être là, de m'écouter et de m'encourager toujours. Merci à mon frère Étienne et ma sœur Marie-Lyne, qui ont été à l'écoute dans les moments plus difficiles. Je vous aime.

Je dois aussi remercier ma seconde famille, mes amis qui sont plus que des amis. Merci à vous : Adam, Alex, Cesar, Corey, Dabe, Évelyne, Isoz, JF, Joannie, Joly, Jose, Karol, Maude, Mel, Pascal, Samir, Steph, Tomek, Typh et Woj, Vous avez été là dans les moments les plus fous et les plus fous. Merci de m'avoir épaulé tout le long de mes études. Je vous aime.

Finalement, je dois remercier mon épouse, Christine, avec qui je partage ma vie depuis maintenant treize ans. Merci de faire partie de ma vie, de me donner de l'amour et du courage pour traverser tous les défis qui se présentent devant nous. Je continue de vous aimer plus fort chaque jour, toi et notre petite Vicky.

Chapitre 1 : Introduction générale

Ce travail de recherche consiste en l'utilisation de nos connaissances en chimie supramoléculaire afin de perturber les membranes cellulaires à l'aide de stimuli externes. Il est question ici d'une perturbation au sens large. C'est-à-dire qu'on pourrait parler, par exemple, de perturbation par insertion d'une molécule dans la bicouche de phospholipides dans le but d'y effectuer une activité différente de la nature propre de la membrane cellulaire. Ceci peut se traduire par du transport transmembranaire,^{1,2} la formation de canaux ou de pores dans la membrane,^{3,4} la solubilisation des phospholipides, conduisant à la dégradation de la membrane cellulaire,⁵ ou même la pénétration favorisée d'un médicament à l'intérieur de la cellule⁶. En effet, aucune de ces propriétés ne pourraient être achevées efficacement sans une perturbation externe de l'intégrité de la membrane cellulaire.

C'est dans ce contexte que notre groupe de recherche s'intéresse à la perturbation de la membrane cellulaire, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, tout en exploitant les concepts de la chimie supramoléculaire.

1.1 La chimie supramoléculaire

La chimie supramoléculaire se définit comme étant la chimie « au-delà de la molécule » : la chimie de l'assemblage moléculaire et du lien intermoléculaire non-covalent.⁷ Il s'agit d'un domaine hautement interdisciplinaire regroupant la chimie organique pour l'aspect de la synthèse, la chimie inorganique pour l'aspect de la coordination métal-ligand, la chimie physique pour les études expérimentales et théoriques sur les différentes interactions et aussi la biochimie pour tous les processus biologiques qui exploitent largement les interactions supramoléculaires.⁷ Ce domaine d'expertise fait maintenant l'objet de deux prix Nobel qui ont été attribués, en 1987, à Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn et Charles J. Pedersen « pour leur développement et leur utilisation de molécules avec des interactions *structures-spécifiques* possédant de hautes sélectivités » ainsi que, plus récemment en 2016, à Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart et Bernard L. Feringa « pour le design et la synthèse de machines moléculaires ». ^{8,9} Les concepts et technologies développés par ces pionniers ont en commun

l'utilisation d'interactions intermoléculaires pour former des espèces supramoléculaires : des supermolécules.

1.1.1 Les interactions intermoléculaires

Les supermolécules sont assemblées par des interactions non-covalentes qui sont considérablement plus faibles que les interactions covalentes. Ces liaisons, partiellement résumées au tableau 1.1, vont de 2 kJ·mol⁻¹ pour des interactions de dispersion (van der Waals) jusqu'à 300 kJ·mol⁻¹ pour les interactions de type ion-ion.¹⁰

Tableau 1.1 Résumé des interactions intermoléculaires¹⁰⁻¹²

Interaction	Énergie (kJ·mol ⁻¹)
Hydrophobe	Reliée à l'énergie de l'interaction solvant-solvant
Van der Waals	< 5
π - π	0 - 50
Cation- π	5 - 80
Anion- π	1 - 100
Pont hydrogène	4 - 120
Liaison halogène	5 - 50
Dipôle-dipôle	5 - 50
Ion-dipôle	50 - 200
Ion-ion	200 - 300

Quoique généralement faibles individuellement, c'est de par leur coopération que ces interactions peuvent former des complexes supramoléculaires stables. Chaque interaction sera définie dans les prochaines sections.

1.1.1.1 L'effet hydrophobe

L'effet hydrophobe provient de l'exclusion des composés non-polaires dans une solution aqueuse (figure 1.1).

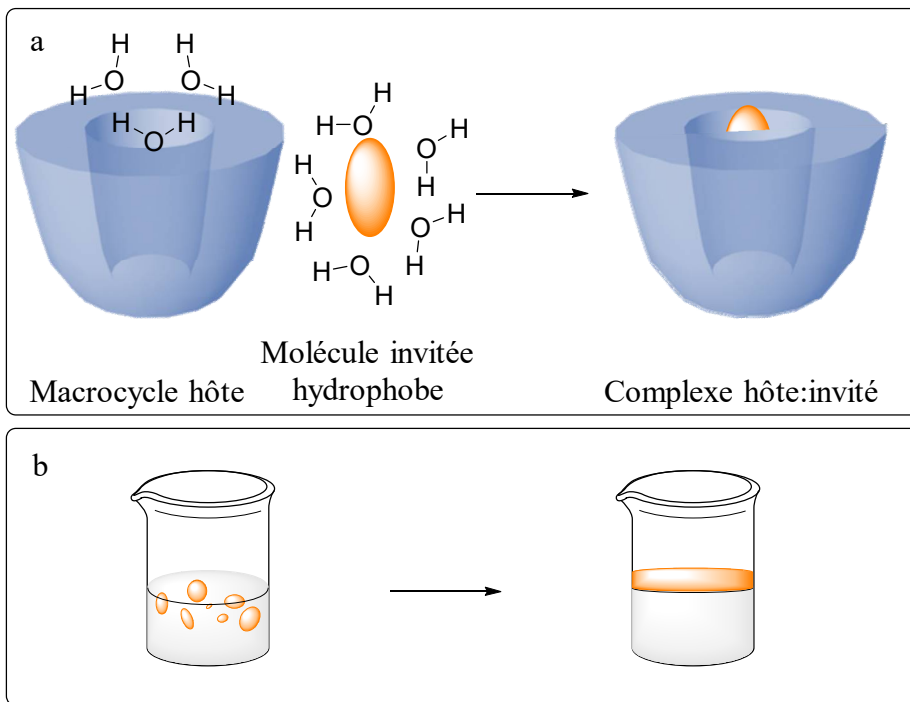


Figure 1.1 Exemples de l'effet hydrophobe : a) effet hydrophobe enthalpique produit par la formation d'un complexe hôte:invité soluble, b) effet hydrophobe entropique produit par l'interaction de molécules hydrophobes dans l'eau.

L'effet hydrophobe joue des rôles clés dans des processus biologiques importants, tels que la formation de la bicouche de phospholipides des membranes cellulaires, le repliement des protéines, la reconnaissance entre une protéine et un ligand, *etc.*¹³ L'effet hydrophobe peut être séparé en deux composantes énergétiques : les composantes enthalpique et entropique. La physique des interactions hydrophobes change avec la température, la taille et la forme des solutés, mais les deux composantes peuvent être décrites sommairement. L'effet hydrophobe enthalpique peut se décrire lorsqu'une molécule invitée hydrophobe se retrouve dans la cavité hydrophobe d'une molécule hôte (figure 1.1a).¹⁰ Ce type d'interaction a lieu car l'eau n'interagit

pas fortement avec la cavité hydrophobe de la molécule hôte et ne solvate pas adéquatement la molécule invitée. Lorsque le complexe est formé, l'énergie du système est réduite par les nouvelles interactions entre les molécules d'eau disloquées de l'intérieur de la cavité hydrophobe et celles présentes dans le milieu aqueux. Le complexe supramoléculaire formé est alors solvato. (N.B. Un facteur entropique est aussi associé à ce processus : des interactions favorables sont retrouvées dans la structure du solvant aqueux suite à la complexation entre les molécules hôte et invitée). L'effet hydrophobe entropique s'explique par l'association de molécules hydrophobes en solution aqueuse, telle qu'un mélange d'huile dans l'eau (figure 1.1b).¹⁰ En effet, un gain entropique est obtenu en ayant une seule phase hydrophobe qui s'y forme, ainsi qu'une seule phase aqueuse. Ainsi, l'énergie libre du système hétérogène s'en voit stabilisée.

1.1.1.2 Les interactions van der Waals

Les interactions van der Waals sont les plus faibles interactions supramoléculaires connues. Elles proviennent de la polarisabilité du nuage électronique entre des espèces qui sont à proximité. Il s'agit ainsi de dipôles induits instantanément dûs au mouvement électronique autour du noyau atomique. La force de cette interaction est dépendante de la polarisabilité de la molécule, mais reste tout de même très faible et décroît exponentiellement par rapport à la distance entre les molécules.¹⁰

1.1.1.3 Les interactions π

Trois types d'interactions π sont retrouvés dans les systèmes supramoléculaires, à savoir les interactions cation- π , anion- π et π - π (figure 1.2). L'énergie des interactions cation- π (figure 1.2a) et anion- π (figure 1.2b) sont comparables.¹⁴ La force de ces interactions dépend fortement de la grandeur du moment quadripolaire (une mesure de la distribution de la charge d'une molécule par rapport à un axe),¹⁴ ainsi que de la polarisation moléculaire du système aromatique.¹⁵ Il existe aussi deux types d'interactions π - π qui jouent de manière importante sur l'arrangement intermoléculaire : l'empilement π (figure 1.2c) et l'empilement T (figure 1.2d).

Ces interactions sont le résultat de l'attraction entre la charge du nuage d'électrons- π d'un noyau aromatique avec la structure- σ chargée positivement d'une molécule voisine,¹⁶ qui sont, de la même façon que les interactions cation- π et anion- π , le résultat de la polarisation moléculaire du système aromatique.

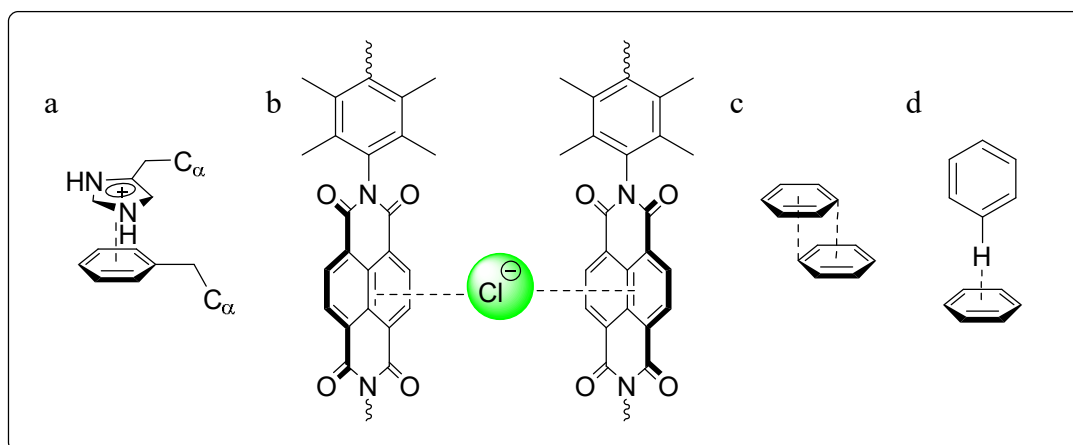


Figure 1.2 Exemples d'interactions π : a) interaction cation- π de chaînes latérales d'un acide aminée entre l'histidine et la phénylalanine,¹⁷ b) interactions anion- π entre un groupement oligo-(*para*-phénylène)-*N,N*-naphtalenediimide et un chlorure,¹⁸ c) interaction π - π de type empilement π , d) interaction π - π de type empilement T.

1.1.1.4 Les ponts hydrogène et les liaisons halogène

Les ponts hydrogène sont un type d'interaction directionnelle de type dipôle-dipôle entre un donneur et un accepteur de proton. Le donneur de proton est un groupe contenant un atome d'hydrogène attaché à un atome électronégatif (généralement N ou O) formant ainsi un dipôle doté d'une charge positive partielle sur l'atome d'hydrogène. L'accepteur de proton possède un atome électronégatif (généralement N ou O, rarement F) qui peut interagir avec le dipôle positif du donneur.^{10,19,20} Cette liaison non-covalente est notamment présente au sein de la structure en double hélice de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (figure 1.3). De par sa fréquence et sa compréhension, le pont hydrogène est considéré comme l'une des interactions les plus utiles dans la conception de systèmes supramoléculaires.

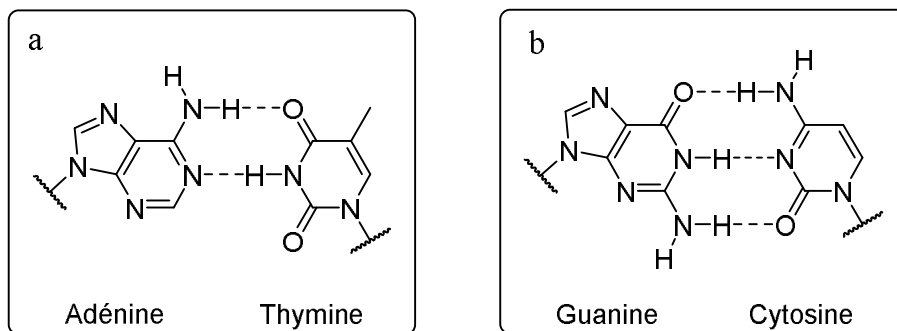


Figure 1.3 Exemples d'interactions de type pont hydrogène : a) ponts hydrogène de l'appariement des bases azotées adénine et thymine, b) ponts hydrogène de l'appariement des bases azotées guanine et cytosine.

Les liaisons halogène sont également formées par des donneurs et des accepteurs, mais dans ce cas-ci c'est un halogène qui est partagé et non pas un hydrogène. Dans ce cas (figure 1.4), le donneur est soit un halogène, soit un halogénure d'alkyle ou d'aryle facilement polarisable (fréquemment I ou Br), qui possède un dipôle positif. L'accepteur possède, quant à lui, une paire d'électrons non-liants qui peuvent interagir avec le donneur d'halogène.^{11,21} Cette interaction contre-intuitive est maintenant bien établie, même si encore peu d'exemples de son utilisation sont rapportés dans la littérature.¹¹

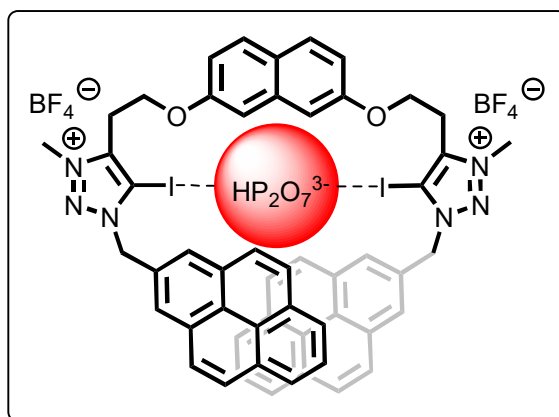


Figure 1.4 Exemple de liaisons halogène entre une sonde fluorescente à base d'iodo-triazolium et de pyrophosphate d'hydrogène.²²

1.1.1.5 Les interactions ioniques et dipolaires

Les interactions ioniques et dipolaires sont des interactions électrostatiques basées sur l'attraction coulombienne entre deux charges opposées.²³ La plus forte de ces interactions, l'interaction ion-ion (figure 1.5a), est non-spécifique et non-directionnelle contrairement aux interactions ion-dipôle (figure 1.5b) et dipôle-dipôle (figure 1.5c), qui sont dépendantes de l'orientation du dipôle. Les interactions directionnelles amènent une certaine rigidité dans l'espace, permettant seulement à des espèces complémentaires de former une entité supramoléculaire. Il est aussi à noter que l'interaction ion-dipôle est à la base de la solvation des ions dans l'eau.

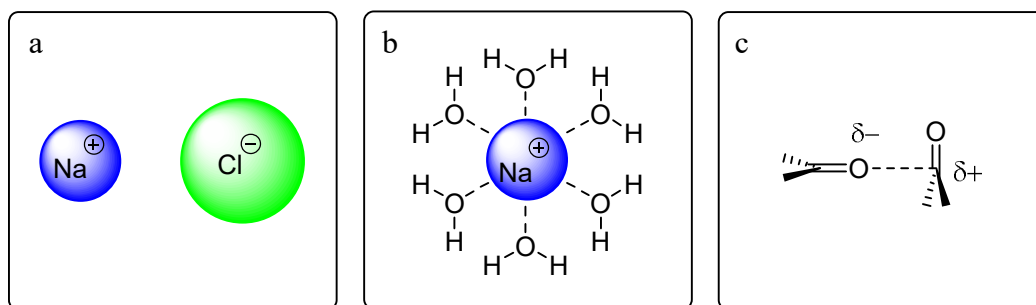


Figure 1.5 Exemples d'interactions électrostatiques ioniques et dipolaires : a) interaction ion-ion du chlorure de sodium, b) interaction ion-dipôle entre le cation sodium et l'eau (exemple de solvation), c) interaction dipôle-dipôle de l'acétone.

Une grande majorité des interactions décrites dans cette section seront nécessaires à la compréhension des travaux présentés dans cette thèse. Elles permettront par exemple de comprendre à la fois comment la bicouche de phospholipides est formée et comment un composé invité peut se positionner dans la cavité hydrophobe d'un macrocycle hôte pour former des complexes d'inclusion, et enfin comment on peut combiner ces concepts pour masquer et démasquer de façon contrôlée la toxicité d'un composé.

1.1.2 Les macrocycles en chimie supramoléculaire

Depuis l'établissement des bases de la chimie supramoléculaire, une grande variété de systèmes supramoléculaires a été développée. Ces systèmes possèdent une panoplie d'applications, notamment dans le cas des machines et interrupteurs moléculaires,^{24,25} des sondes analytiques,²⁶ *etc.* Dans la conception de ces systèmes aux propriétés multiples, certains macrocycles sont fréquemment utilisés. Ces macrocycles peuvent tous être facilement fonctionnalisés et leurs cavités peuvent servir d'hôtes à de petites molécules invitées hydrophobes, car ils peuvent développer des interactions supramoléculaires spécifiques (figure 1.6).

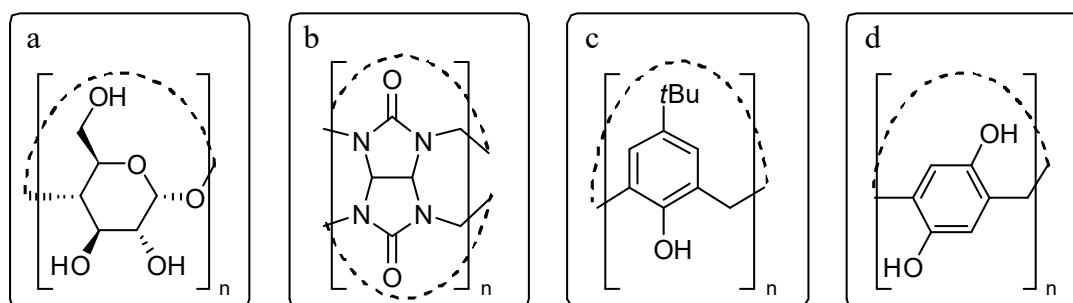


Figure 1.6 Exemples de macrocycles fréquemment utilisés en chimie supramoléculaire : a) les cyclodextrines, b) les cucurbituriles, c) les calixarènes d) les pillararènes. La fourchette d'unités de répétitions du monomère se situe entre $n = 4$ et 8 , en général.

Quatre grandes familles de macrocycles sont à mentionner. Les cyclodextrines (figure 1.6a) font partie d'une famille d'oligosaccharides cycliques de D-glucose liés par un lien 1,4-glycosidique. Les cucurbituriles (figure 1.6b) sont des oligomères cycliques de glycouriles pontés par des unités méthylènes. Les calixarènes (figure 1.6c) sont des macrocycles produits par la condensation de phénols *para*-substitués à du formaldéhyde. Leurs côtés supérieurs et inférieurs peuvent être fonctionnalisés par différents substituants. Finalement, les pillararènes (figure 1.6d) sont des macrocycles de cinq à dix unités d'hydroquinones liés par des unités méthylènes en positions 2 et 2'.

Parmi ces composés cycliques, les cyclodextrines sont les macrocycles les plus couramment utilisés. Dans le cadre de ce travail, un intérêt particulier sera donné à cette famille de macrocycles et plus particulièrement à la β -cyclodextrine. C'est pourquoi cette famille de macrocycles est présentée plus en détail dans la section suivante.

1.1.2.1 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des produits semi-naturels provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon par l'enzyme cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) provenant de différentes bactéries.²⁷ De par leur faible coût de production, ainsi que leur toxicité limitée, les CDs sont utilisées comme ingrédients dans divers domaines industriels. Elles se retrouvent dans différentes formulations pharmaceutiques, alimentaires ou cosmétiques.²⁸ Les CDs les plus utilisées sont l' α -CD, la β -CD et la γ -CD qui possèdent respectivement six, sept et huit unités de glucoses (figure 1.7).

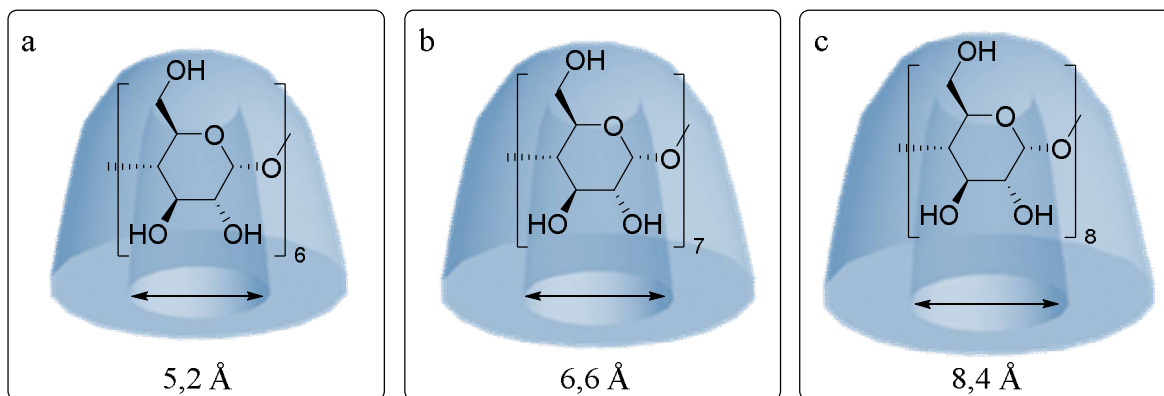


Figure 1.7 Les cyclodextrines : a) α -cyclodextrine, b) β -cyclodextrine, c) γ -cyclodextrine.²⁹

L'utilisation principale des CDs en industrie pharmaceutique est due à la formation de complexes, généralement de stœchiométrie 1:1, entre une molécule thérapeutique logée dans la cavité hydrophobe de la CD (telle que présentée à la figure 1.1a). La formation de ces complexes d'inclusion procure généralement un intérêt quant à l'administration d'un médicament, en lui

conférant de nouvelles propriétés physicochimiques et biologiques.³⁰ Plusieurs avantages peuvent être obtenus lorsque la CD est utilisée dans une formulation : une solubilité accrue d'un composé hydrophobe, une libération contrôlée, une plus grande biodisponibilité, une plus grande facilité de conservation ainsi que de stockage, *etc.*³¹ Par exemple, des produits contenant de la nicotine sont utilisés pour aider à cesser de fumer. La nicotine est un composé relativement volatile et oxydable. Elle doit donc être stabilisée dans sa formulation pharmaceutique. Ainsi, la nicotine peut être protégée de l'oxydation en formant un complexe d'inclusion avec la β -CD.³²

Les CDs peuvent aussi jouer le rôle de vecteurs pour libérer un médicament dans des conditions spécifiques. C'est le cas de l'utilisation de la dégradation contrôlée d'un complexe hôte:invité selon un changement de pH, l'augmentation de la température ou le clivage enzymatique des liaisons glycosidiques.^{33,34} Yousef *et al.* ont récemment démontré que le relargage de la doxorubicine (un médicament anticancéreux hydrophobe) d'un complexe comportant différents vecteurs biocompatibles à base de β -CDs se faisait de façon contrôlée et plus rapide à des pH acides.³⁵ Ils ont démontré que la libération contrôlée de la doxorubicine, ainsi que la biocompatibilité des vecteurs à base de β -CDs peuvent rapidement trouver application dans le domaine de la chimiothérapie car les effets secondaires des traitements sont réduits dans ce cas.

Enfin, il ne fait aucun doute que les CDs, les macrocycles les plus utilisées en chimie supramoléculaire, constituent une plateforme polyvalente qui continuera de faire l'objet de recherches de pointe, tout particulièrement pour leurs propriétés pharmaceutiques intéressantes. Dans cette thèse, elles ont été utilisées dans le but de former des complexes d'inclusion et moduler certaines propriétés de la molécule invitée. Elles ont d'ailleurs été étudiées pour moduler les propriétés de transport transmembranaire des récepteurs d'anions.

1.1.3 Les récepteurs d'anions

Les composés anioniques sont omniprésents et jouent des rôles majeurs à travers la chimie biologique, médicale et environnementale. L'adénosine triphosphate (ATP), une source d'énergie majeure dans les cellules, est négativement chargée. L'ADN est un biopolymère

ionisé qui se comporte comme un polyanion. Aussi, plus de 70 % des substrats enzymatiques et cofacteurs impliqués dans les processus biologiques portent une charge négative nette.³⁶ Considérant que les anions sont essentiels au bon fonctionnement de multiples processus biologiques, il n'est pas surprenant que la reconnaissance d'anions en chimie supramoléculaire ait connu une énorme croissance dans les 30 dernières années. Plusieurs champs d'applications en sont ressortis : leur détection, leur extraction, leur assemblage, le transport et la catalyse.³⁷ Toutefois, ces applications sont issues des mêmes domaines (biologique, médical et environnemental) et nécessitent que la reconnaissance de l'anion se fasse en milieu aqueux. La conception des récepteurs d'anions en solution aqueuse est un défi majeur en chimie supramoléculaire. Tout d'abord, les anions sont largement solvatés par l'eau, généralement plus que les cations analogues en taille.³⁸ De plus, ils affichent une gamme étendue d'hydrophilie et d'hydrophobie, selon la nature de l'anion.³⁹ Finalement, les anions possèdent des géométries et des densités électroniques très variées, conduisant à des interactions électrostatiques généralement faibles avec le récepteur.⁴⁰ Afin de surmonter ces défis, les chimistes supramoléculaires utilisent l'arsenal d'interactions intermoléculaires à leur disposition, afin de stabiliser un anion dans un complexe de type hôte:invité. Par exemple, les interactions utilisées sont, en général, les ponts hydrogène,^{41,42} les liaisons halogène,^{22,43} les interactions anion- π ⁴⁴ ou l'utilisation de l'effet hydrophobe.⁴⁵

Lorsque les récepteurs d'anions s'insèrent dans une membrane cellulaire, ils peuvent avoir un effet sur les gradients anioniques cellulaires et l'homéostasie, un paramètre essentiel à la survie des cellules. Dans ce travail de recherche, une attention particulière a été portée aux récepteurs d'anions et leurs applications en transport anionique transmembranaire.

1.2 La membrane cellulaire

Tous les organismes vivants partagent, au niveau cellulaire, certaines particularités biochimiques essentielles à leur survie. Il existe aussi des constituants essentiels dont toute cellule vivante a besoin pour exister : la membrane plasmique, le cytoplasme, l'ADN et les ribosomes. La membrane cellulaire de n'importe quelle cellule joue le rôle clé de séparer l'intérieur de la cellule de son environnement externe. Toutefois, cette séparation demeure

sélective puisqu'une cellule doit être en mesure d'absorber les composés essentiels de l'extérieur et, en même temps, de rejeter les déchets produits à l'intérieur.⁴⁶ Les organismes vivants sont classés en deux grands types de cellules : les procaryotes et les eucaryotes.

Les procaryotes, identifiés aux bactéries, sont des organismes unicellulaires qui n'ont ni de noyaux ni d'organites. Ils possèdent une ou deux membranes et représentent l'organisation la plus simple des membranes cellulaires (figure 1.8).⁴⁷ Les bactéries se distinguent de par leurs membranes cellulaires mises en évidence par la coloration de Gram. On trouve des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif.⁴⁷

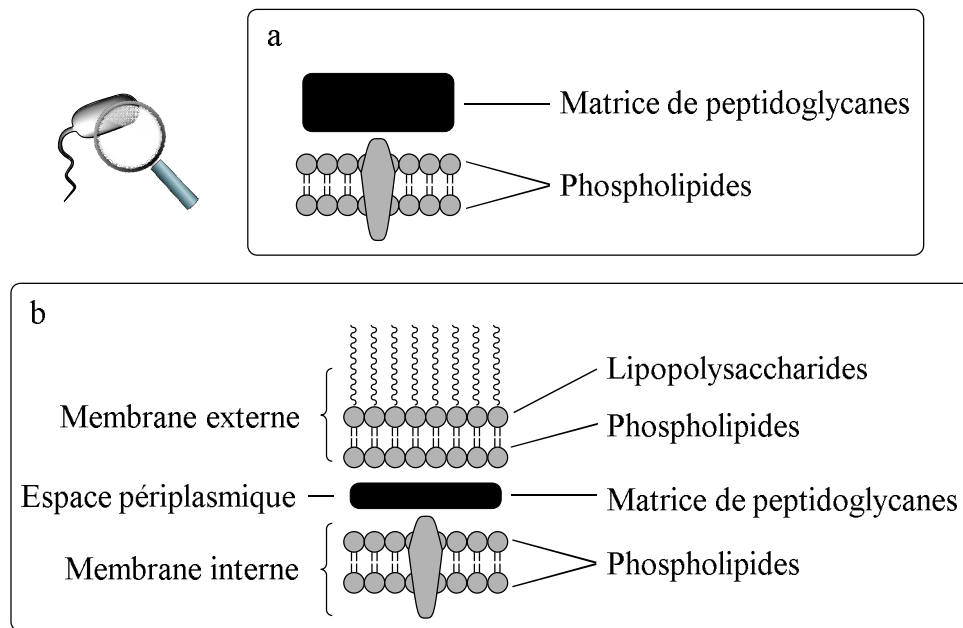


Figure 1.8 La membrane cellulaire procaryote : a) bactérie à Gram positif, b) bactérie à Gram négatif.

La bactérie à Gram positif ne possède qu'une seule membrane et est enveloppée d'une épaisse couche de peptidoglycane (PG) et de protéines (figure 1.8a). Comme la matrice de PG est exposée à l'environnement externe, elle réagit avec la coloration de Gram. La bactérie à Gram négatif possède quant à elle deux membranes : la membrane externe et la membrane interne. Elle possède aussi une matrice de PG un peu plus mince qui se situe dans l'espace

périplasmique (figure 1.8b). Dans ce cas, la matrice de PG n'est pas directement en contact avec l'environnement externe et ne peut pas réagir avec la coloration de Gram.⁴⁷ Il est également important de souligner qu'un des feuillettes de la membrane externe des bactéries à Gram négatif est composé de lipopolysaccharides.

Les eucaryotes sont identifiés aux grands règnes du monde vivant : les animaux, les champignons et les plantes. Similairement aux cellules procaryotes, les cellules eucaryotes possèdent une membrane cellulaire délimitant l'intérieur de la cellule de l'environnement externe. Dans tous les cas, il y a absence de PG, mais présence de stérols. L'intérieur de la cellule eucaryote est radicalement différent. Ces cellules possèdent des organites, aussi composés d'une membrane, qui subdivisent les activités cellulaires et compartimentent les fonctions.⁴⁷

Ces différences de composition des membranes cellulaires peuvent être exploitées pour obtenir une certaine sélectivité (par exemple altérer la membrane d'une bactérie sans affecter les membranes des cellules eucaryotes que nous allons présenter plus loin). Toutes les membranes cellulaires possèdent aussi une chose en commun : elles sont composées majoritairement de phospholipides.

1.2.1 La bicouche de phospholipides

Les phospholipides représentent l'élément majoritaire de toute membrane cellulaire. Ils composent, en général, plus de 50 % d'une membrane, le reste étant comblé par des protéines, des acides gras, du cholestérol, *etc.*⁴⁷ La phosphatidylcholine, un des phospholipides les plus communs dans les cellules eucaryotes,⁴⁸ en est un bon exemple (figure 1.9).

Le phospholipide est composé d'une unité glycérol, de deux acides gras, d'un groupement phosphate et d'un alcool (la choline dans l'exemple ci-dessous, figure 1.9a). Un phospholipide est toujours schématisé de la façon montrée à la figure 1.9b avec une tête polaire, composée du phosphate et de l'ammonium, et deux queues hydrophobes : les deux acides gras. En solution aqueuse, les phospholipides s'auto-assemblent en formant une bicouche (figure 1.9c). Plusieurs facteurs stabilisent la formation de cette bicouche. Tout d'abord, elle est

majoritairement stabilisée par l'effet hydrophobe. Aussi, des interactions ion-ion entre les têtes polaires, des ponts hydrogènes entre les têtes polaires et les molécules d'eau et des interactions van der Waals entre les queues hydrophobes stabilisent la formation de la bicouche.^{46,49} C'est cette bicouche de phospholipides qui forme la barrière semi-perméable qui régule le passage des solutés (figure 1.10).

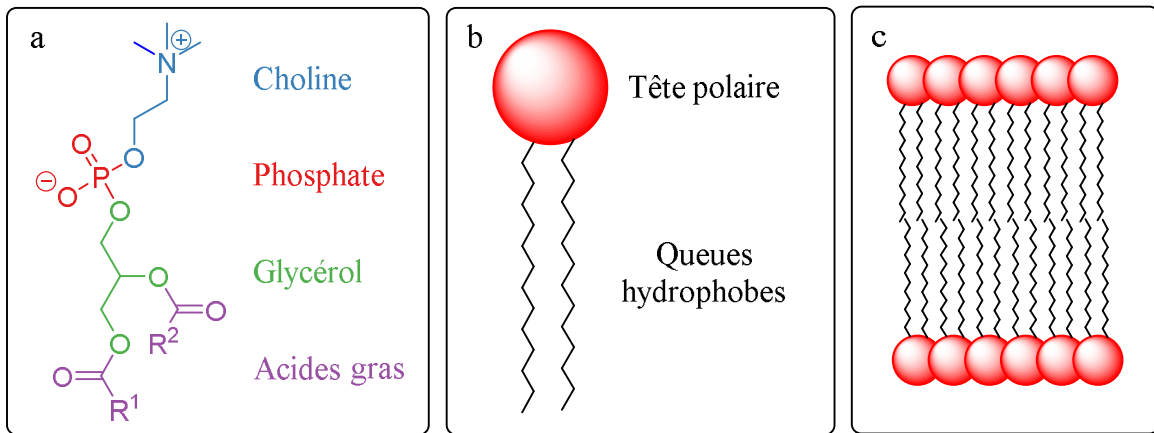


Figure 1.9 Exemple d'un phospholipide : a) la phosphatidylcholine, b) schématisation générale d'un phospholipide, c) schéma d'une bicouche de phospholipides.

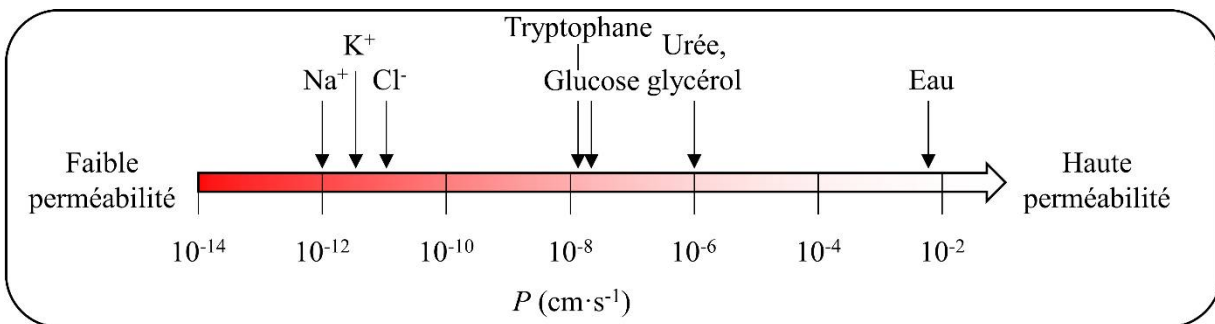


Figure 1.10 Perméabilité (en $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) de solutés communs face à la bicouche de phospholipides.⁵⁰⁻⁵²

La figure 1.10 montre la perméabilité de certains solutés face à la bicouche de phospholipides selon une échelle logarithmique qui s'étend jusqu'à dix ordres de grandeur. Les ions sont imperméables à la bicouche de phospholipides. Les grosses molécules polaires,

comme le glucose, l'urée ou le glycérol, possèdent de très faibles perméabilités. L'eau est en mesure de diffuser lentement, de façon passive, au travers de la bicouche. De la même façon, la membrane laisse traverser plus rapidement les petites molécules hydrophobes et les gaz, comme le dioxygène et le dioxyde de carbone.⁵⁰ Une perturbation de l'organisation locale des phospholipides dans la membrane peut faciliter l'insertion et le passage de solutés qui sont normalement imperméables à la membrane.

Le système modèle couramment utilisé pour mimer les membranes cellulaires sont les liposomes. Les liposomes sont des vésicules de forme sphérique formées par une bicouche de phospholipides contenant un noyau aqueux (figure 1.11).

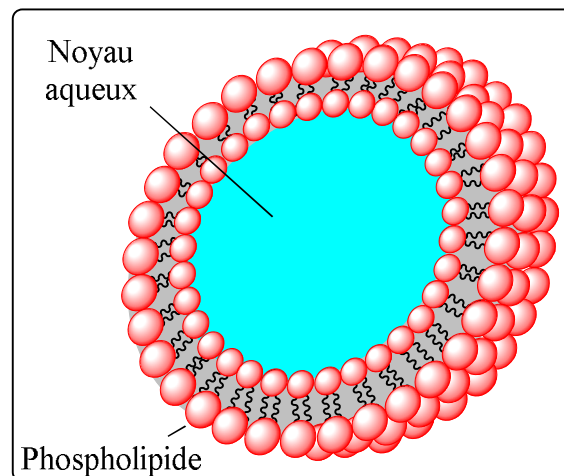


Figure 1.11 Représentation schématique d'un liposome.

Malgré le fait que les liposomes possèdent aussi une quantité impressionnante d'applications thérapeutiques dans le domaine de l'administration de médicaments,⁵³ dans ce travail de recherche, les liposomes ont été utilisés comme un modèle simplifié d'une membrane cellulaire.⁵⁴ Dans tous les projets entrepris dans notre groupe de recherche, nous commençons toujours avec le système le plus simple et nous nous intéressons à des systèmes de plus en plus complexes. Enfin, c'est en prenant en considération les forces intermoléculaires impliquées dans la formation de la bicouche de phospholipides et dans sa stabilité, qu'il est possible de la perturber et de développer des applications biologiques, tel que le transport transmembranaire.

1.2.2 Le transport transmembranaire

Une conséquence de la structure de la membrane cellulaire est l'isolation des compartiments intra et extracellulaires par deux barrières hydrophiles orientées vers les milieux aqueux, séparées par une barrière hydrophobe. Cette alternance de zones hydrophile/hydrophobe/hydrophile assure entre autres l'imperméabilité de la membrane cellulaire à la plupart de molécules. Il y a trois mécanismes naturels pour assurer le transport transmembranaire des composés essentiels à la survie de la cellule. Tout d'abord, le transport peut s'effectuer passivement, ce qui est le cas pour l'eau et les gaz qui traversent tout simplement la bicouche de phospholipides. Le transport peut aussi être facilité par des protéines, comme par exemple la diffusion facilitée du glucose par les protéines membranaires transporteuses de glucose.⁵⁵ Ces deux derniers exemples de transport procèdent selon un gradient de concentration et ne requièrent aucune énergie. Toutefois, tous les organismes vivants doivent établir et maintenir un gradient de solutés entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, comme par exemple maintenir certains gradients d'ions (tableau 1.2).^{46,50} Les dérèglements de ces gradients sont la cause de nombreuses maladies, généralement graves.

Tableau 1.2 Gradients transmembranaires d'ions dans une cellule eucaryote^{46,50}

Ions	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)	Gradient
Na ⁺	10	140	14-fois
K ⁺	140	5	28-fois
Mg ²⁺	30	1	30-fois
Ca ²⁺	<1	5	>5-fois
Cl ⁻	4	100	25-fois

Afin de maintenir ces gradients d'ions, la cellule utilise des mécanismes de transport actif utilisant de l'énergie sous forme d'ATP. Sans doute la protéine de transport actif la plus étudiée, la pompe sodium-potassium utilise l'hydrolyse de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP) afin de conserver les gradients de concentration nécessaires pour maintenir le potentiel électrochimique de la membrane, responsable de plusieurs activités physiologiques.⁵⁶ Le

transport transmembranaire, actif ou passif, s'effectue selon deux mécanismes généraux communs : le transport mobile ou au travers d'un canal transmembranaire (figure 1.12).

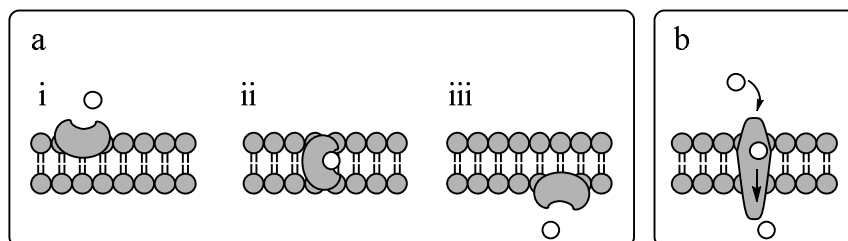


Figure 1.12 Schémas des différents modes de transport : a) transport mobile, b) transport au travers d'un canal transmembranaire.

Tel que démontré à la figure 1.12, un transporteur mobile doit lier le soluté à transporter (figure 1.12a, i), diffuser en tant que complexe au travers de la bicouche de phospholipides (ii) et relarguer le soluté de l'autre côté (iii). Dans le cadre du transport passif, les canaux transmembranaires offrent un passage aux solutés, les laissant diffuser au travers de la membrane cellulaire (figure 1.12b). Dans le domaine des transporteurs transmembranaires synthétiques, chacun des deux modes de transport possède ses avantages. En effet, la vitesse de transport est généralement plus élevée dans un canal transmembranaire, alors que le transport mobile permet de meilleures sélectivités.⁵⁷

À défaut d'avoir mis au point un système de transport actif contre le gradient de concentration ionique, le développement d'ionophores synthétiques facilitant le passage des ions au travers de la membrane cellulaire est à l'étude depuis un peu plus de 40 ans. Le premier exemple de transporteur transmembranaire mobile non-naturel, est l'éther dibenzo-18-couronne-6 (**1.1**, figure 1.13a).⁵⁸ Il a été synthétisé par Charles J. Pedersen dans les années 1960.⁵⁹ Vint ensuite le premier exemple de canal transmembranaire synthétique, à base de β -CD, dans les années 1980 (**1.2**, figure 1.13b).⁶⁰

Ces composés ont été caractérisés comme étant des transporteurs de cations. Le premier, **1.1**, est un transporteur mobile sélectif aux ions K^+ . Le second, **1.2**, lorsqu'ajouté à la préparation de liposomes, forme un canal transmembranaire transportant les ions Co^{2+} . Depuis, de nombreux

transporteurs de cations ont été développés, ouvrant la porte à une meilleure compréhension de leurs activités et possédant de bonnes sélectivités.⁶¹

Les transporteurs d'anions sont quant à eux restés peu étudiés jusque dans les années 1990. Reddy *et al.* rapportent le premier exemple de canal transmembranaire synthétique basé sur un récepteur de la glycine (GlyR), un transporteur naturel d'anions.⁶² Il avait été suggéré qu'un segment de 23 acides aminés de cette protéine était responsable du transport d'anions, hypothèse plus tard confirmée par des expériences de conductivité effectuées sur une bicouche plane de phospholipides, expérience aussi connue sous le nom de *Black Lipid Membrane* (BLM).⁶²

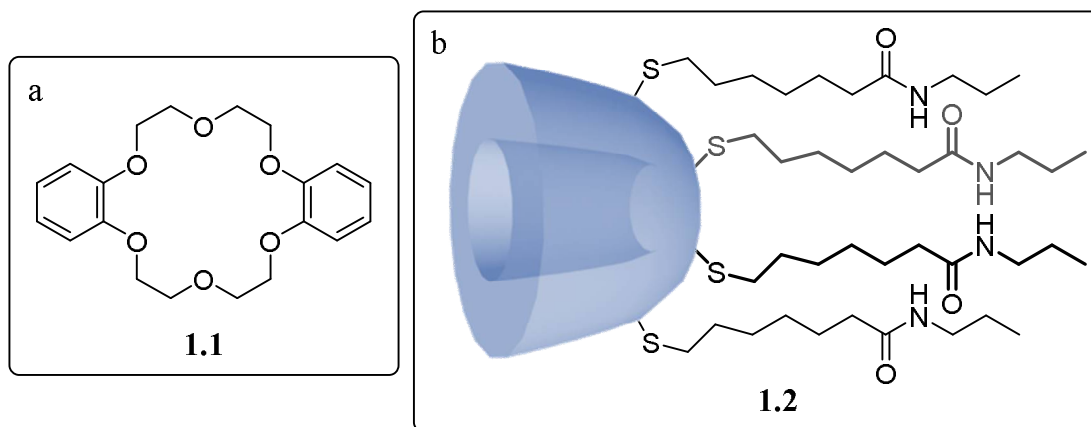


Figure 1.13 Premiers exemples de transporteurs synthétiques : a) l'éther dibenzo-18-couronne-6, un transporteur mobile, b) une β -CD tétrasubstituée, un demi-canal transmembranaire.

L'application potentielle des transporteurs synthétiques d'ions dans le traitement de maladies causées par un transport ionique déficient, appelées canalopathies, a poussé le développement et l'étude exhaustive de ce type de composés. Contrairement aux transporteurs de cations, très peu de métabolites secondaires naturels ont des propriétés de transport d'anions,⁵⁷ raison pour laquelle une attention particulière a été donnée aux transporteurs d'anions purement synthétiques.

1.2.2.1 Les transporteurs d'anions

Il existe certains espoirs qu'un transporteur d'anions synthétique soit applicable dans les soins contre la fibrose kystique, la canalopathie la plus courante dans les populations occidentales qui affecte le système respiratoire.^{63,64} Cette maladie est causée par la mutation d'un gène qui encode une protéine transmembranaire responsable du transport de chlorures, le régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (RTFK). Son insuffisance fonctionnelle entraîne une rétention de mucus dans les voies respiratoires, provoquant ainsi des infections chroniques suivies d'inflammations locales nocives pour les poumons.⁶⁴ Dans cette optique, un nombre important de nouveaux transporteurs synthétiques de chlorures, des canaux transmembranaires comme des transporteurs mobiles, ont été développés.⁵⁷

Au fil des années, la synthèse de transporteurs d'anions s'est affinée et plusieurs facteurs qui doivent être considérés lors de leur conception sont maintenant connus dans le domaine. Tout d'abord, la stratégie principale de reconnaissance d'anions est basée sur les interactions intermoléculaires de type ponts hydrogènes, anion- π ou bien les liaisons halogènes.

Parmi les exemples de transporteurs d'anions utilisant les interactions intermoléculaires de type ponts hydrogènes conventionnelles, certains motifs particulièrement récurrents sont connus dans la littérature. L'utilisation de récepteurs anioniques à base d'urée et de thiourée comme transporteurs de chlorures a tout d'abord été rapportée par Davis et ses collègues dans l'étude des composés **1.3** et **1.4** à base de stéroïdes et **1.5** et **1.6** à base de cyclohexanes (figure 1.14).⁶⁵⁻⁶⁷ Ils ont démontré que les récepteurs dérivés de thiourée étaient de bien meilleurs transporteurs d'anions que leurs analogues à base d'urée. En proposant l'utilisation d'analogues plus simples, à base de cyclohexanes, ils ont stipulé qu'une plus grande flexibilité dans la structure du transporteur a pour effet une augmentation considérable de l'activité de transport.

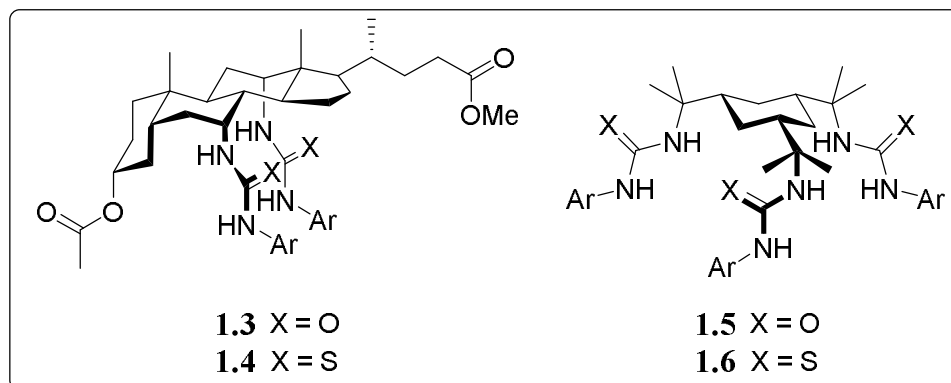


Figure 1.14 Transporteurs d'anions à base de stéroïdes et de cyclohexanes.

À l'aide de transporteurs de type 1-hexyl-3-phénylthiourée **1.7** (figure 1.15), Gale et ses collègues ont effectué une étude exhaustive de type relation structure-activité en faisant varier les substituants sur les groupements aryles.⁶⁸ Ils ont corrélé l'activité de transport à plusieurs facteurs. Tout d'abord, ils ont démontré l'importance de l'affinité entre le récepteur et l'anion qui était fortement corrélée à l'induction électronique des groupements électroattracteurs. Ils ont aussi démontré qu'une taille plus petite du récepteur contribuait à l'obtention d'un meilleur transport de chlorures. De plus, le modèle a souligné la lipophilie du transporteur comme étant le facteur le plus important dans le transport d'anions. D'ailleurs, ils ont démontré un peu plus tard que l'incorporation d'un groupe fonctionnel qui pouvait former un pont hydrogène intramoléculaire augmentait l'efficacité du transport (figure 1.15b).⁶⁹ Ils ont attribué cette augmentation d'efficacité à l'augmentation de la lipophilie du transporteur, permettant une meilleure pénétration du composé **1.8** dans la membrane phospholipidique.

Gale, ainsi que Davis, ont même été plus loin dans l'identification des paramètres qui gouvernent l'activité des transporteurs synthétiques en proposant le concept de la balance lipophile.⁷⁰ En utilisant une série de transporteurs possédant à la fois des affinités, des tailles ainsi que des lipophilies relatives étroitement similaires, ils ont démontré que les transporteurs qui avaient un site de liaison de l'anion au centre de la molécule présentaient une plus grande efficacité de transport, d'où le concept de balance des groupements lipophiles.

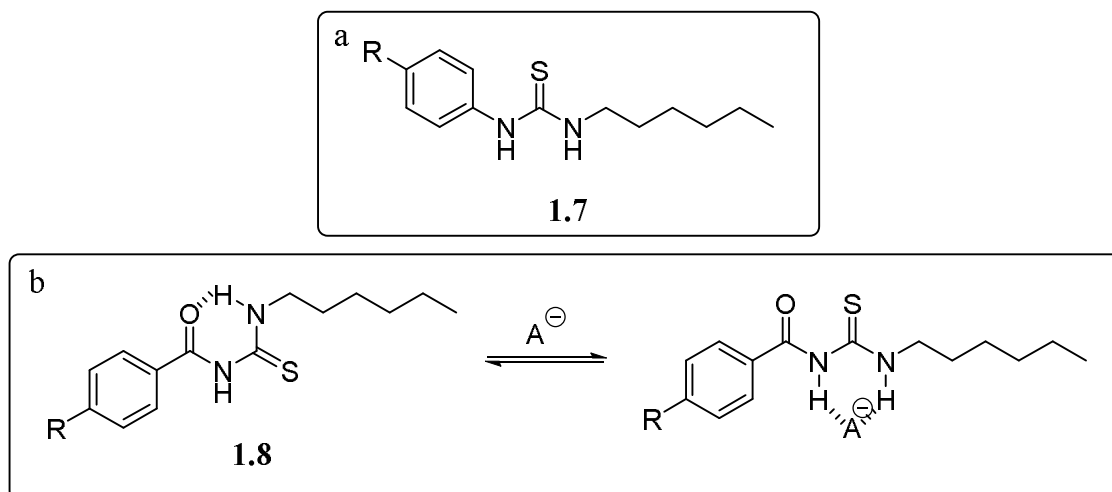


Figure 1.15 Transporteurs d'anions à base de phénylthiourée : a) 1-hexyl-3-phénylthiourée, b) formation d'un pont hydrogène intramoléculaire et intermoléculaire avec un anion.

Les transporteurs agissant par des interactions non conventionnelles sont moins fréquents. Matile et ses collègues ont développés les « glissades d'anions », des canaux transmembranaires n'agissant que par des interactions anion- π (figure 1.16).⁷¹ Ils ont proposé le transport des anions d'un site acide- π à un autre tout le long de la glissade et ceci fût confirmé par une étude de modèles plus simples de transporteurs, des analogues du monomère de naphthalènediimide.⁷²

Matile et Jentzsch ont aussi développé des transporteurs d'anions qui opèrent via des liaisons halogène, fonctionnant de la même façon que leurs « glissades d'anions » à l'aide d'une tige rigide **1.9** (figure 1.17).⁷³ Ils ont attribué l'activité de transport à la capacité de la tige rigide **1.9** à fournir une voie permettant aux anions de se lier de façon réversible en utilisant, à la fois, les interactions anion- π et les liaisons halogène (figure 1.17b), ce qui a été confirmé en démontrant que l'analogue portant les atomes de fluor transportait considérablement moins.

Cette section ne consiste qu'en un survol de différents types de transporteurs neutres connus, ainsi que certains des facteurs à considérer lors de leur conceptualisation. Le développement de transporteurs d'anions est toujours en plein essor et ils ne sont plus étudiés que dans des liposomes : depuis quelques années, les exemples de transporteurs d'anions synthétiques qui trouvent applications dans des cellules vivantes ne font qu'augmenter.² D'autre

part, les composés cationiques sont une classe de transporteurs intéressante grâce à leurs propriétés inhérentes de reconnaissance d'anions.

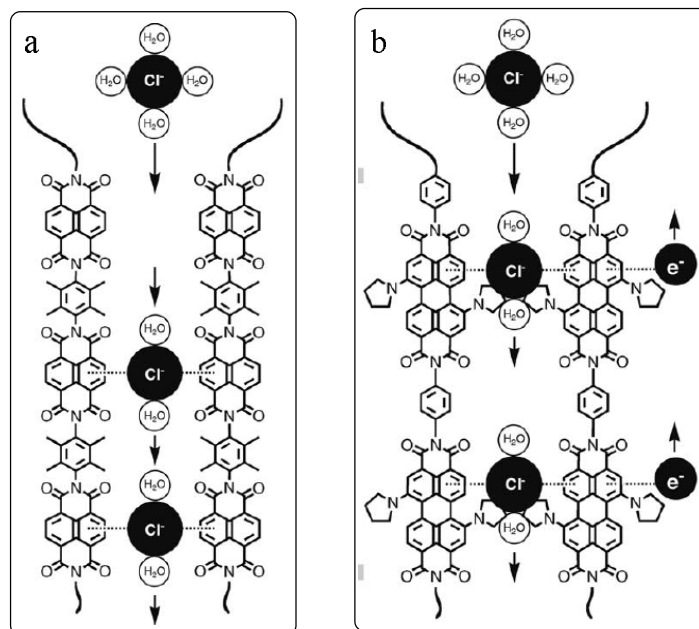


Figure 1.16 Transporteurs d'anions utilisant les interactions anion- π : a) oligonaphtalène-diimide, b) olygopérylènediimide. Adapté avec permissions de la réf. 71. Copyright 2009, Wiley.

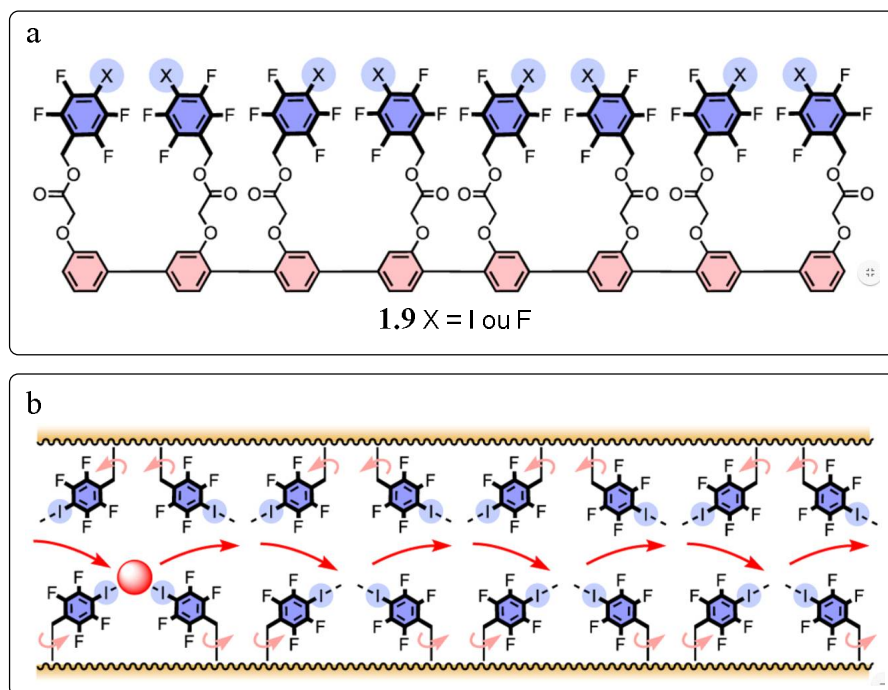


Figure 1.17 Transporteur d'anions utilisant les liaisons halogènes : a) structure générale de la tige rigide **1.9**, b) représentation schématique de la voie fournie par les liaisons halogènes. Adapté avec permissions de la réf. 73. Copyright 2013, American Chemical Society.

1.3 Les composés cationiques

Les composés cationiques représentent plus de 40% des médicaments cliniquement utilisés dans une panoplie d'applications biologiques (figure 1.18).⁷⁴ De plus, sous forme protonée à pH physiologique (pH = 7.4), les ammoniums quaternaires sont reconnus comme d'excellents agents antimicrobiens.⁷⁵⁻⁷⁷

Dans les prochains chapitres nous allons nous intéresser à la capacité des composés cationiques, plus particulièrement des ammoniums quaternaires et des sels d'imidazolium, à perturber la membrane phospholipidique et y transporter des anions.

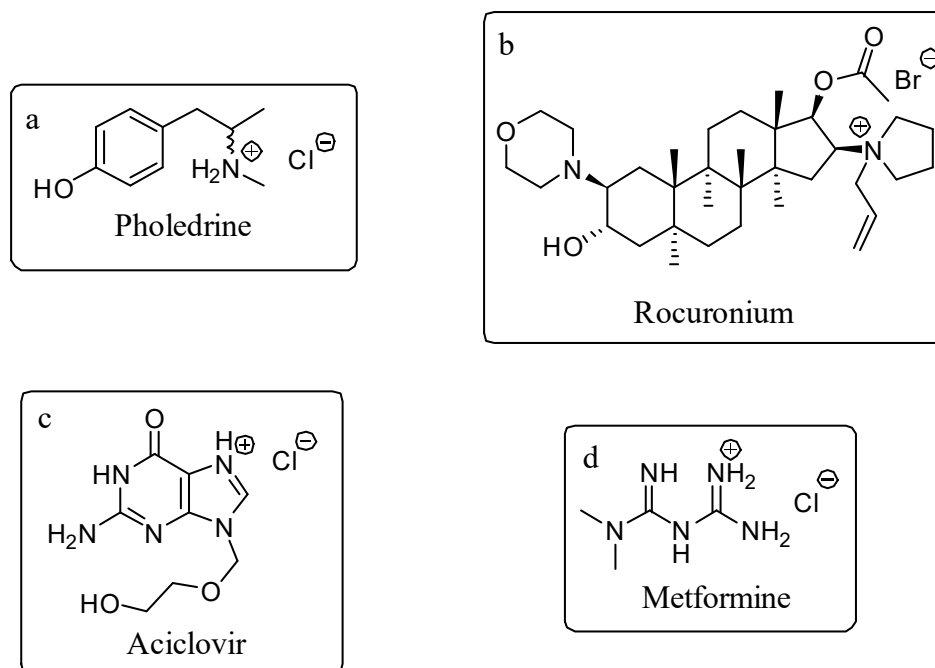


Figure 1.18 Quelques exemples de composés cationiques cliniquement utilisés : a) Pholedrine, un bloqueur de canaux ioniques, b) Rocuronium, un relaxant musculaire, c) Aciclovir, un antiviral, d) Metformine, un antidiabétique.

1.3.1 Les composés de type ammonium quaternaire

Les composés de type ammonium quaternaire (QACs, de l'anglais : quaternary ammonium compounds) sont une classe importante de composés qui possèdent des propriétés antimicrobiennes. Ils sont parmi les désinfectants les plus couramment utilisés actuellement. Les premières études des propriétés antimicrobiennes des QACs ont été rapportées en 1916, mais cette classe de composés n'a été réellement exploitée qu'à partir de 1935.⁷⁸ D'ailleurs, le professeur Jean-Marie Lehn a étudié les QACs comme récepteurs d'anions dans des « membranes » organiques liquides à la fin des années 1970.^{79,80} Par définition, les QACs sont des tensioactifs cationiques contenant un atome d'azote central lié à quatre différents groupes alkyles ou aryles avec au moins une composante hydrophobe majeure (figure 1.19).

Les QACs sont classifiés selon le nombre d'unités ammoniums contenues dans leur structure, la longueur de leurs chaînes alkyles, la ramification des chaînes alkyles ainsi que la présence de groupes aromatiques. Toutes ces variations affectent l'activité antimicrobienne,

ainsi que la sélectivité d'un QAC pour un microorganisme donné. Plusieurs produits antimicrobiens contiennent des mélanges de QACs afin d'augmenter leur efficacité ainsi que leur étendue d'action.⁸¹ À faible concentration, les QACs ont des propriétés fongistatiques, sporostatiques, bactériostatiques et tuberculostatiques, c'est-à-dire qu'ils inhibent la croissance des spores et de ces microorganismes. À plus haute concentration, les QACs deviennent microbicides contre ces mêmes familles : ils les tuent, littéralement.⁸² L'activité biocide d'un QAC est attribuée, a posteriori, aux interactions entre le QAC et la membrane des microorganismes. En termes de mécanisme d'action, il a été proposé que les QACs s'adsorbent tout d'abord à la paroi cellulaire, réagissent avec la membrane jusqu'à la désorganiser, pour ainsi amener à une fuite du matériel intracellulaire, jusqu'à provoquer la dégradation des protéines et des acides nucléiques.⁸²

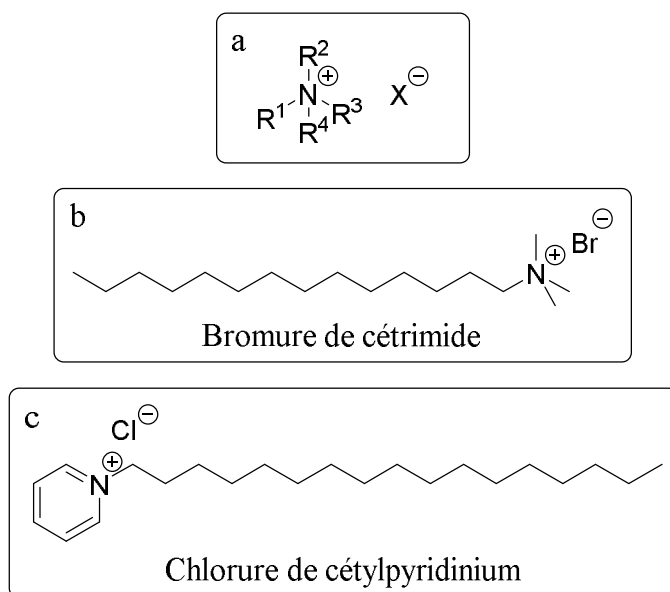


Figure 1.19 Exemples de QACs couramment utilisés : a) structure générale (l'anion (X^-) est généralement un chlorure ou un bromure), b) Bromure de cétrimide, c) Chlorure de cétylpyridinium.

Toutefois, l'utilisation trop répandue des QACs entraîne le développement d'organismes résistants par l'acquisition ou l'hyperexpression de pompes à efflux.^{82,83} L'étude d'une meilleure utilisation de ces composés est donc d'un grand intérêt. Dans cette optique, afin de

réduire l'impact éco-toxicologique des QACs, Leclercq et ses collègues ont proposé une assistance supramoléculaire synergique de l'activité biocide du chlorure de di-*N*-décyldiméthylammonium (**1.10**) avec la β -CD contre différents virus (figure 1.20).⁸⁴ En utilisant en synergie la perturbation de la membrane plasmique du virus par **1.10**, ainsi que les propriétés d'extraction de lipides des β -CDs, il a été possible d'utiliser une quantité bien moins importante en biocide tout en gardant l'effet désiré sur le virus. Ceci a pour résultat de directement diminuer l'empreinte éco-toxicologique du biocide **1.10** et fournit de nouveaux éléments à développer dans la lutte contre les infections.

Une sous-classe des QACs, les sels d'imidazolium, est particulièrement intéressante et constitue un point central des travaux proposés dans cette thèse.

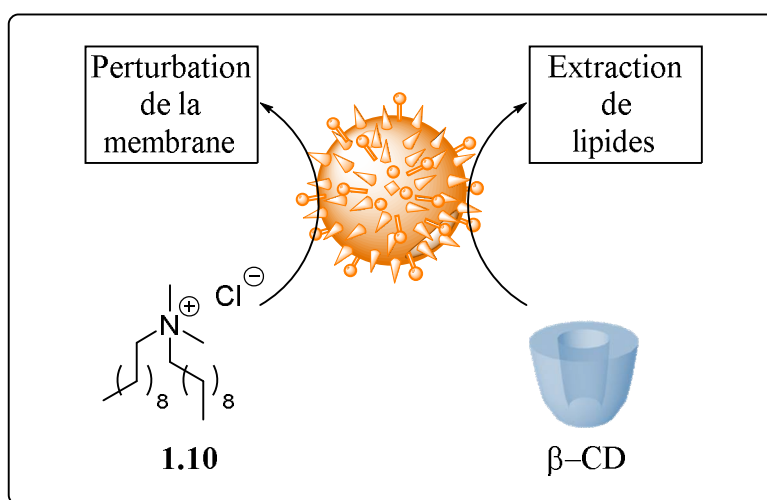


Figure 1.20 Effet synergique de l'activité biocide de **1.10** et de la β -CD sur l'enveloppe d'un virus.

1.3.2 Les sels d'imidazolium

Le noyau imidazole est présent dans de nombreux processus biologiques, par la reconnaissance de récepteurs à partir de l'histidine ou l'histamine, ce qui confère aux sels d'imidazolium une potentielle biocompatibilité.^{85,86} Ceci fait donc de ce composé cationique un candidat idéal dans la recherche de nouvelles applications biologiques. Les sels d'imidazolium

sont des composés très polyvalents facilement synthétisables et modulables. Ils ont notamment été étudiés et exploités pour leurs propriétés de liquides ioniques.^{87,88} Ils sont maintenant utilisés dans une multitude d'applications allant de solvants pour la synthèse organique aux composés possédant des propriétés anticancéreuses.^{86,89,90}

Comme procédure générale, les sels d'imidazolium peuvent être synthétisés par substitution nucléophile de l'imidazole commercialement disponible, en utilisant des halogénures d'alkyle ou d'aryle (figure 1.21).^{91,92}

Ce procédé de quaternisation donne habituellement de bons rendements. Ils peuvent aussi être obtenus par une condensation d'amines primaires, de composé dicarboxylé (glyoxal) et d'un aldéhyde (formaldéhyde) en deux étapes, en passant par un intermédiaire diimine (figure 1.22).⁹³⁻⁹⁵

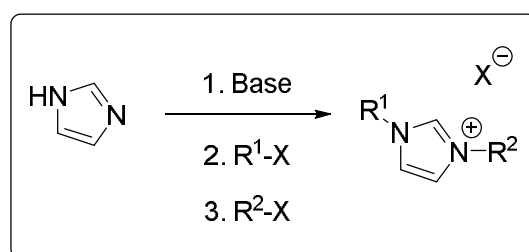


Figure 1.21 Quaternisation de l'imidazole.

Des sels d'imidazolium sans halogénure peuvent également être obtenus à partir d'un alcool (figure 1.23).⁹⁶ De plus, différents sels d'imidazolium peuvent être obtenus en effectuant une simple métathèse anionique conférant de nouvelles propriétés à ces composés.

Les premiers exemples de sels d'imidazolium comme récepteurs d'anions ont été publiés en 1999 par Pérez-García.^{97,98} Les cations imidazoliums contenus dans les récepteurs imidazoliophanes **1.11** – **1.19** (figure 1.24) possèdent la propriété de complexer les chlorures par la formation de ponts hydrogènes non-conventionnels C-H⋯Cl⁻, en plus des interactions ion-ion.

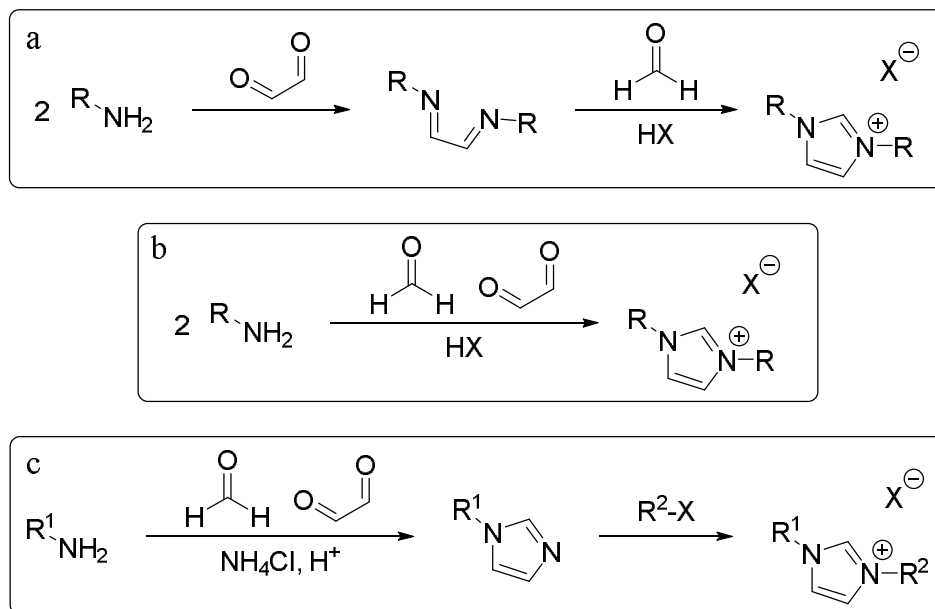


Figure 1.22 Synthèse de sels d'imidazolium à partir d'amines.

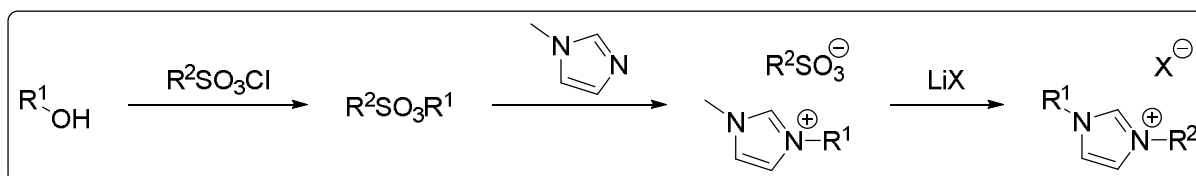


Figure 1.23 Synthèse de sels d'imidazolium sans halogénure à partir d'un alcool.

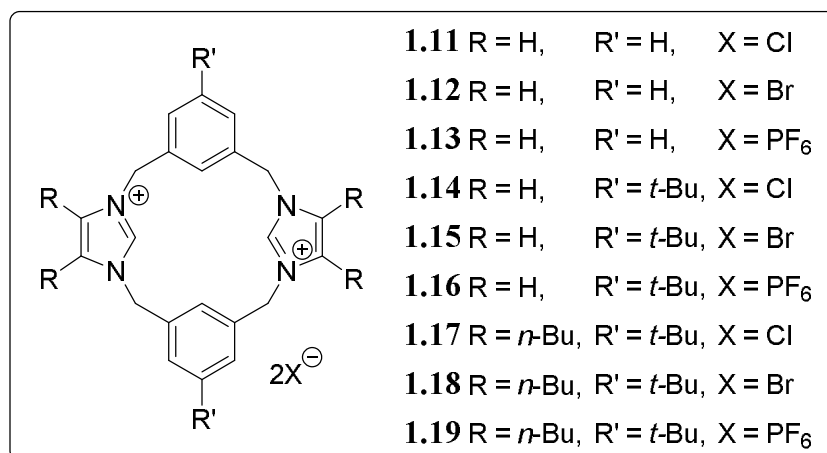


Figure 1.24 Premiers exemples de récepteurs d'anions basés sur des sels d'imidazolium.

C'est suite à cet exemple qu'une grande quantité de récepteurs d'anions contenant des cations imidazoliums dans leur structure ont été développés.⁹⁹

Il est maintenant établi que les sels d'imidazolium possèdent de nombreuses propriétés biologiques.¹⁰⁰ Une attention particulière a été consacrée aux matériaux polymères antimicrobiens et récemment les sels d'imidazolium ont été incorporés dans la structure de ces polymères.¹⁰¹ En 2015, Guo *et al.* ont décrit le copolymère **1.20** réticulé de styrène, d'acrylonitrile et de 3-heptyl-1-vinylimidazolium à hauteur de 35 %. Ce copolymère possède de fortes propriétés antibactériennes contre les souches à Gram positif *Staphylococcus aureus* et à Gram négatif *Escherichia coli* (figure 1.25).¹⁰²

D'autre part, une simple métathèse anionique pour obtenir le polymère **1.21** contenant des sels d'imidazolium avec le tryptophane (Trp) comme contre-anion a permis d'augmenter substantiellement l'activité antimicrobienne en tuant 80 et 90 % des bactéries *S. aureus* et *E. coli*, respectivement, suite à seulement 1 h de contact avec le polymère (figure 1.25). Ceci n'était pas complètement inattendu, car le Trp seul peut inhiber la croissance de ces bactéries. Ainsi, la combinaison des propriétés antibactériennes des cations imidazoliums et de l'anion Trp confère à ce polymère une activité antimicrobienne synergique.

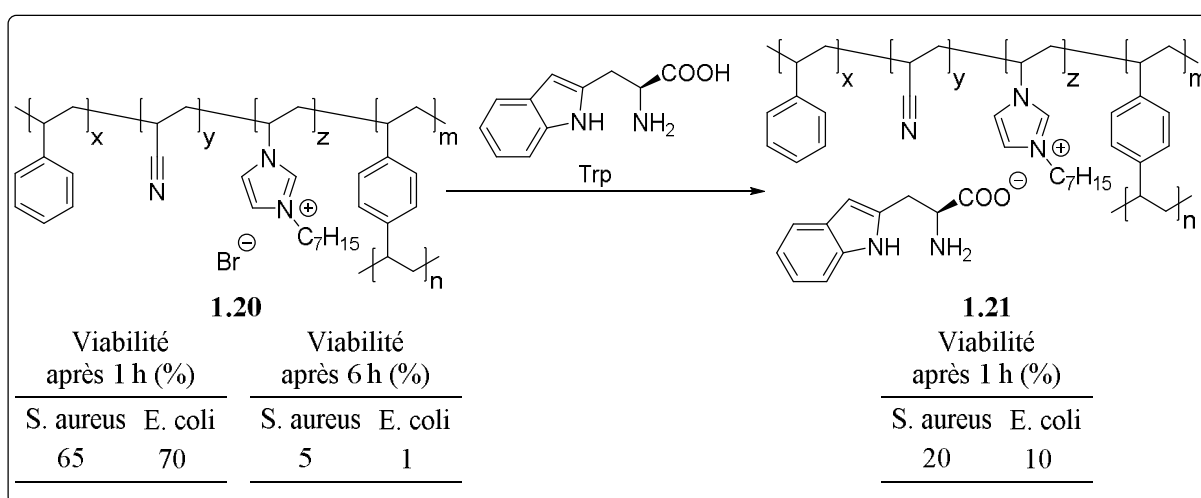


Figure 1.25 Matériaux polymères antibactériens à base de sels d'imidazolium et leurs activités antibactériennes.

De par leur structure, les sels d'imidazolium peuvent être utilisés pour fonctionnaliser des macrocycles afin d'en modifier les propriétés intrinsèques, comme leur caractère hydrophile. Ne cherchant pas un composé aux propriétés antibactériennes spécifiquement, Cohen et ses collègues ont récemment développé des macrocycles cationiques qui inhibent la formation de biofilms bactériens.¹⁰³ Les biofilms bactériens sont des agrégats de bactéries maintenus ensemble par une matrice extracellulaire (figure 1.26). Il est estimé que 80 % des infections bactériennes sont accompagnées de formation d'un biofilm conférant une plus grande résistance aux antibiotiques.¹⁰³

En effet, comparés aux bactéries libres en solution, les biofilms bactériens peuvent être jusqu'à trois ordres de grandeur moins susceptibles aux antibiotiques.¹⁰⁴ Ainsi, leur but était de développer des macrocycles amphiphiles cationiques inhibant la formation de biofilms sans, toutefois, nuire à la viabilité des cellules bactériennes ou mammifères, pour ne pas affecter le microbiote humain. Pour ce faire, ils ont synthétisé le pillararène **1.22** fonctionnalisé avec des sels de méthylimidazolium (figure 1.27).

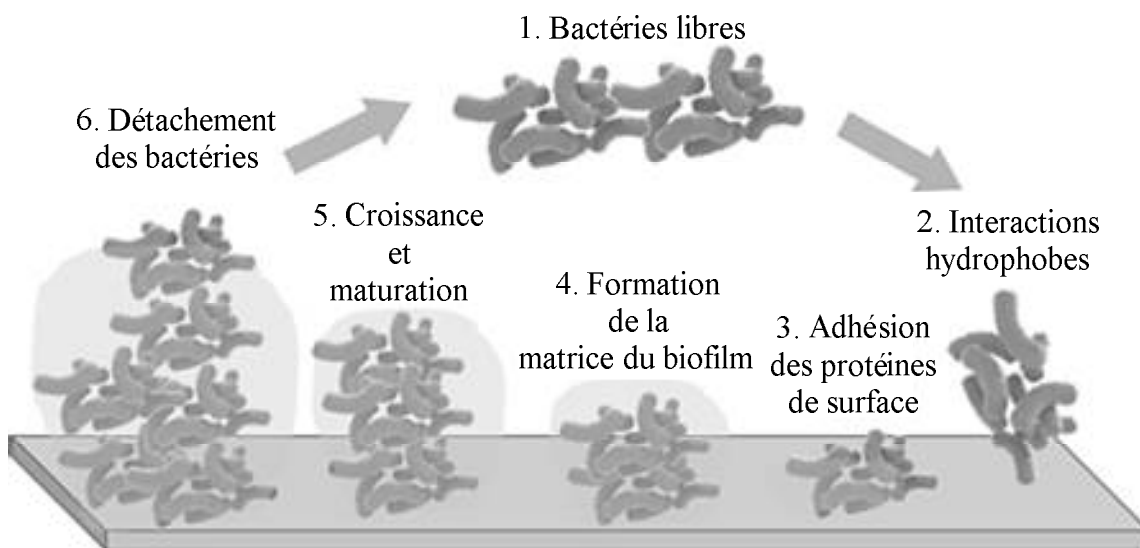


Figure 1.26 Représentation de la formation d'un biofilm bactérien. Adapté avec permissions de la réf. 86. Copyright 2017, The Royal Society of Chemistry.

La particularité du pillararène **1.22** est qu'il est hydrosoluble et hôte d'une variété de composés chimiques hydrophobes et déficients en électrons présents dans les matrices de biofilms bactériens. Il empêche donc la formation de la matrice du biofilm (étape 4 de la figure 1.26) et oblige les bactéries à rester libres en solution. Cette propriété a été évaluée à des concentrations minimales médianes inhibitrices de la formation d'un biofilm (CMIB₅₀) allant de 0,4 à 6,4 μM dans différentes souches de bactéries à Gram positif. Ainsi, il est facile de supposer que, combinés à de bons antibiotiques, ces pillararènes seraient appropriés dans le traitement d'infections bactériennes.

Il s'agit ici d'exemples décrivant parfaitement comment la facilité d'accès et la polyvalence dans la conception de différents sels d'imidazolium peuvent conduire à des composés ayant des propriétés biologiques intéressantes et puissantes. Le potentiel de cette famille de composés, mise en avant dans cette section, démontre l'origine de l'intérêt porté aux sels d'imidazolium comme perturbateurs de la membrane cellulaire et, plus précisément, comme transporteurs d'anions.

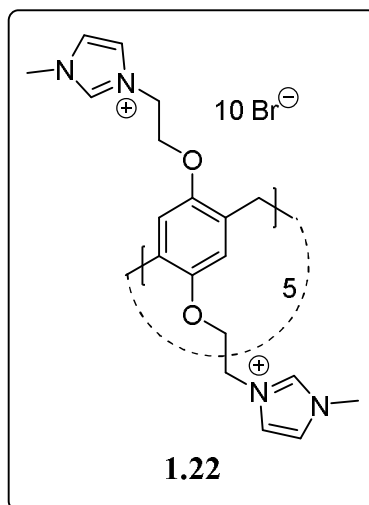


Figure 1.27 Structure du pillararène **1.22** aux propriétés inhibitrices de formation d'un biofilm.

1.4 Description du projet de recherche

Mes travaux de recherche ont eu comme but principal de démontrer qu'il était possible de perturber la membrane de phospholipides par des composés cationiques en faisant appel à nos connaissances et outils de chimie supramoléculaire. Inspirés des récepteurs d'anions à base de sels d'imidazolium que notre groupe de recherche avait développés comme transporteurs transmembranaires d'anions, mes travaux ont porté sur la synthèse et l'étude de composés pouvant pénétrer et se partitionner dans la membrane de phospholipides, tout en y jouant un rôle actif. Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés anionophores et biologiques de sels d'imidazolium à l'interface de différentes membranes (liposomes, cellules procaryotes ou eucaryotes). Ces sels d'imidazolium ont été conçus de manière à pouvoir former des complexes d'inclusion avec la β -CD dans le but de développer un élément de contrôle dans le processus de transport. Dans un second temps, nous nous sommes rendus compte qu'il n'y avait pas de méthode analytique simple pour étudier la capacité d'un composé à perméabiliser une membrane cellulaire bactérienne.¹⁰⁵ Nous avons donc mis au point une méthode analytique de choix pour quantifier la capacité de différents composés à perméabiliser les membranes bactériennes en temps réel.

1.4.1 Propriétés anionophores de sels d'imidazolium fonctionnalisés par des groupements adamantyles

Claude-Rosny Élie, Marc Vidal et Julie Kempf, du laboratoire Schmitzer, ont présenté les premiers exemples de transporteurs d'anions contenant les motifs imidazolium, benzimidazole ou benzimidazolium.¹⁰⁶⁻¹¹¹ Ces composés ont tous en commun la propriété de s'auto-associer dans la membrane phospholipidique pour former des canaux transmembranaires soit par des interactions π , comme dans le cas des transporteurs **1.23** et **1.25**, soit par complémentarité de la structure du transporteur aux phospholipides, comme c'est le cas du transporteur **1.24** (figure 1.28).

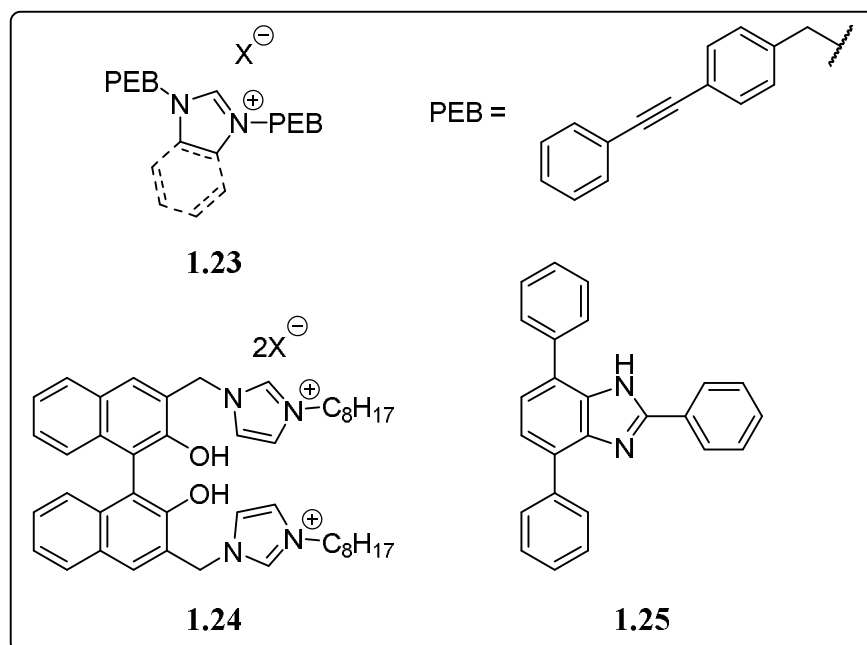


Figure 1.28 Structures des premiers transporteurs d'anions basés sur des sels d'imidazolium, de benzimidazolium ou de benzimidazole.

Ainsi, notre objectif premier était de synthétiser une série de composés ne possédant intrinsèquement aucune de ces propriétés d'auto-association, dans le but d'obtenir un transporteur mobile. Pour ce faire, nous nous sommes tournés vers des sels d'imidazolium fonctionnalisés par des groupements adamantyles. Ces composés possèdent l'amphiphilie nécessaire pour pénétrer la membrane de phospholipides et ont été étudiés pour leurs propriétés anionophores. Ensuite, le mécanisme de transport, ainsi que la sélectivité anionique ont été étudiés pour le composé le plus efficace de la série.

1.4.2 Formation du complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine et développement d'un système de transport transmembranaire réversible

La formation de complexes d'inclusion entre les sels d'imidazolium et des macrocycles a été étudiée de façon exhaustive, auparavant dans le groupe.¹¹²⁻¹¹⁵ Ceci a conduit à l'utilisation de la CD afin de réguler le transport d'anions.¹⁰⁶ Comme la β -CD forme des complexes

d'inclusion très stables avec les fonctions adamantyles,¹¹⁶ nous avons étudié de façon approfondie l'effet de la formation des complexes d'inclusion dans le processus de transport d'anions. Nous avons par ailleurs étudié la réversibilité de ce système supramoléculaire par l'ajout d'un invité compétitif.

1.4.3 Application biologique du système de transport transmembranaire anionique réversible

En théorie, les molécules capables de faciliter le transport transmembranaire des anions dans un liposome ont incidemment un effet sur l'homéostasie ionique d'une cellule. Comme il s'agit d'un paramètre essentiel à la survie de toutes les cellules vivantes, les anionophores peuvent afficher une activité biologique utile. En effet, certains membres de notre groupe ont démontré les propriétés biologiques des sels d'imidazolium dans des cellules procaryotes ou eucaryotes.^{108,110,117} Nous nous sommes alors intéressés à la possibilité d'utiliser ce système supramoléculaire réversible dans des systèmes plus complexes que les liposomes : les bactéries à Gram positif *Bacillus thuringiensis* et les érythrocytes humains. Nous avons donc étudié la toxicité du transporteur, en présence ou non, de β -CD dans ces deux types de cellules. La régulation de la toxicité dans ces cellules s'est démontrée réversible par l'incorporation de la β -CD, suivie de l'addition d'un invité compétitif.

1.4.4 Mise au point d'un essai quantitatif pour évaluer la perturbation de l'enveloppe bactérienne à Gram négatif

Les propriétés antimicrobiennes des sels d'imidazolium développés dans notre groupe ont été attribuées à la dépolarisation et la perméabilisation de la membrane bactérienne.¹¹⁷ La microscopie électronique à balayage (SEM) a été utilisée pour observer les dommages causés par le sel **1.26** sur la membrane bactérienne de *E. coli* (figure 1.29). En effet, suite à un traitement prolongé des bactéries avec le composé **1.26**, des pores se sont formés dans la membrane de la bactérie et le contenu s'en voyait vidé.

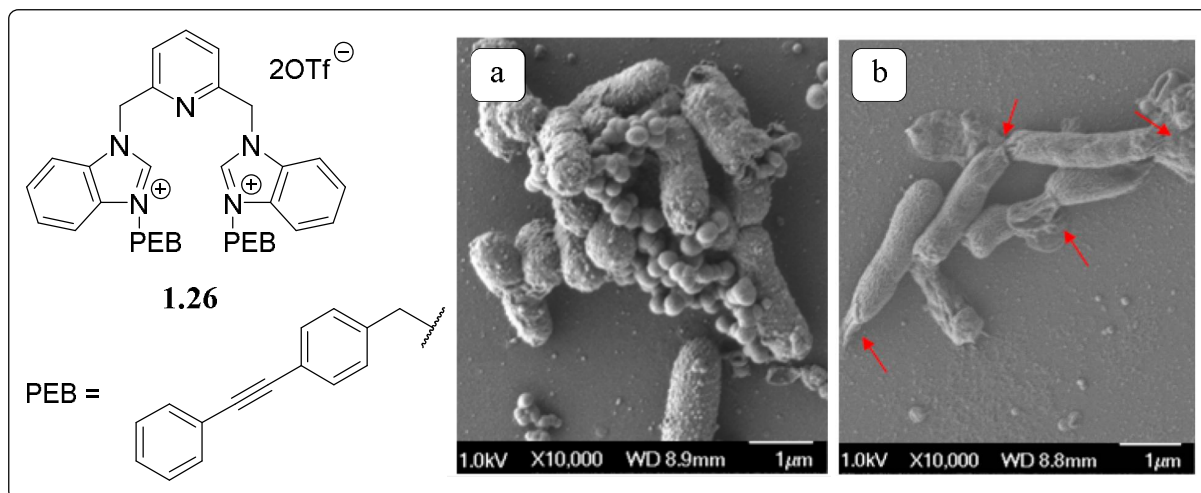


Figure 1.29 Images SEM de bactéries *E. coli* : a) après 24h d'incubation sans traitement (contrôle), b) après 24h d'incubation traitées avec le transporteur **1.26**. Adapté avec permissions de la réf. 117. Copyright 2015, American Chemical Society.

Suite à ces découvertes, nous avons voulu utiliser une méthode pour relier l'activité antibactérienne à la perméabilisation de la membrane et nous nous sommes rendus compte qu'il n'y avait pas d'outil nous permettant de quantifier aisément la perméabilisation de la membrane induite par les transporteurs développés dans notre groupe. Ainsi, nous avons retravaillé un essai spectroscopique développé dans les années 1980 par Lehrer et ses collègues.¹⁰⁵ Pour ce faire, nous avons observé le transport d'un marqueur, l'*ortho*-nitrophényl- β -galactoside (ONPG), induit par la perturbation des membranes bactériennes de cellules *E. coli* provoquée par le QAC le plus commun : le chlorure de benzalkonium. À l'aide de titrages précis, nous avons pu extraire des données quantitatives relatives à la perturbation de la membrane bactérienne. Nous avons aussi pu émettre l'hypothèse qu'à l'aide d'un traitement mathématique approprié, nous étions en mesure d'observer les concentrations nécessaires à la perturbation de la membrane externe et la membrane interne, respectivement.

À travers les chapitres suivants, je vais présenter la possibilité d'utiliser de nouveaux composés cationiques pour interagir avec les membranes de phospholipides et les membranes cellulaires. Je montrerai d'ailleurs comment contrôler et exploiter les interactions supramoléculaires de ces sels pour le développement d'éventuelles applications biologiques.

1.5 Références

- (1) Gokel, G. W.; Negin, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 784-796.
- (2) Gale, P. A.; Davis, J. T.; Quesada, R. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2497-2519.
- (3) Saha, T.; Dasari, S.; Tewari, D.; Prathap, A.; Sureshan, K. M.; Bera, A. K.; Mukherjee, A.; Talukdar, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14128-14135.
- (4) Rojko, N.; Anderluh, G. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 3073-3079.
- (5) Gilbert, P.; Moore, L. E. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 703-715.
- (6) Wang, T. Y.; Libardo, M. D. J.; Angeles-Boza, A. M.; Pellois, J. P. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1170-1182.
- (7) Lehn, J. *Science* **1993**, *260*, 1762-1763.
- (8) "The Nobel Prize in Chemistry 1987", *Nobelprize.org*, Nobel Media, AB 2014, Web, Accédé le 19 juin 2017, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/
- (9) "The Nobel Prize in Chemistry 2016", *Nobelprize.org*, Nobel Media, AB 2014, Web, Accédé le 19 juin 2017, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2016/
- (10) Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. J. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*; Wiley: Chichester, England, 2007, 17-26.
- (11) Politzer, P.; Lane, P.; Concha, M. C.; Ma, Y.; Murray, J. S. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 305-311.
- (12) Bagwill, C.; Anderson, C.; Sullivan, E.; Manohara, V.; Murthy, P.; Kirkpatrick, C. C.; Stalcup, A.; Lewis, M. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 9235-9243.
- (13) Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521-533.
- (14) Schottel, B. L.; Chifotides, H. T.; Dunbar, K. R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 68-83.
- (15) Garau, C.; Frontera, A.; Quiñonero, D.; Ballester, P.; Costa, A.; Deyà, P. M. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 9423-9427.
- (16) Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J. *J. Chem. Soc. Perk. T. 2* **2001**, 651-669.
- (17) Ma, J. C.; Dougherty, D. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303-1324.
- (18) Gorteau, V.; Bollot, G.; Mareda, J.; Perez-Velasco, A.; Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14788-14789.
- (19) Mishra, S. K.; Suryaprakash, N. *Molecules* **2017**, *22*, 423.
- (20) Bartolome, C.; Espinet, P.; Martin-Alvarez, J. M. *Chem. Commun.* **2007**, 4384-4386.
- (21) Metrangolo, P.; Resnati, G. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2511-2519.
- (22) Zapata, F.; Caballero, A.; Molina, P.; Alkorta, I.; Elguero, J. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6959-6969.

- (23) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books: Sausalito, USA, 2006, 162-168.
- (24) Browne, W. R.; Feringa, B. L. *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 25-35.
- (25) Kay, E. R.; Leigh, D. A.; Zerbetto, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 72-191.
- (26) You, L.; Zha, D.; Anslyn, E. V. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7840-7892.
- (27) Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 609-617.
- (28) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1754.
- (29) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325-1358.
- (30) Stella, V. J.; He, Q. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 30-42.
- (31) Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, E329-357.
- (32) Berglund, J.; Cedergren, L.; Börje Andersson, S. *Int. J. Pharm.* **1997**, *156*, 195-200.
- (33) Zhang, J.; Ma, P. X. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1215-1233.
- (34) Lu, B.; Li, L.; Wu, J.; Wei, L.; Hou, J.; Liu, Z.; Guo, X. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 8397-8407.
- (35) Yousef, T.; Hassan, N. *J. Inclus. Phenom. Macro.* **2017**, *87*, 105-115.
- (36) Singh, J.; Yadav, M.; Singh, A.; Singh, N. *Dalton T.* **2015**, *44*, 12589-12597.
- (37) Busschaert, N.; Caltagirone, C.; Van Rossom, W.; Gale, P. A. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8038-8155.
- (38) Goldman, S.; Bates, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1476-1484.
- (39) Morita, T.; Westh, P.; Nishikawa, K.; Koga, Y. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 8744-8749.
- (40) Langton, M. J.; Serpell, C. J.; Beer, P. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1974-1987.
- (41) Cai, J.; Hay, B. P.; Young, N. J.; Yang, X.; Sessler, J. L. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1560-1567.
- (42) Hua, Y.; Liu, Y.; Chen, C. H.; Flood, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14401-14412.
- (43) Jentzsch, A. V.; Matile, S. *Top. Curr. Chem.* **2015**, *358*, 205-239.
- (44) Guo, J. B.; Han, Y.; Cao, J.; Chen, C. F. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5688-5691.
- (45) Kubik, S.; Goddard, R.; Kirchner, R.; Nolting, D.; Seidel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2648-2651.
- (46) Stillwell, W. *An Introduction to Biological Membranes (Second Edition)*; Elsevier: London, UK, 2016, 3-15.
- (47) Yeagle, P. L. *The Membranes of Cells (Third Edition)*; Academic Press: Boston, USA, 2016, 1-25.
- (48) Deleu, M.; Crowet, J. M.; Nasir, M. N.; Lins, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 3171-3190.
- (49) Israelachvili, J. N.; Marčelja, S.; Horn, R. G. *Q. Rev. Biophys.* **1980**, *13*, 121-200.

- (50) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the cell*; Garland Science: New York, USA, 2002, accédé le 16 octobre 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26815/>.
- (51) Hauser, H.; Phillips, M. C.; Stubbs, M. *Nature* **1972**, *239*, 342-344.
- (52) Paula, S.; Volkov, A. G.; Van Hoek, A. N.; Haines, T. H.; Deamer, D. W. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 339-348.
- (53) Pattni, B. S.; Chupin, V. V.; Torchilin, V. P. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10938-10966.
- (54) Eytan, G. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *694*, 185-202.
- (55) Carruthers, A. *Physiol. Rev.* **1990**, *70*, 1135-1176.
- (56) Forrest, M. D. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 1-4.
- (57) Davis, A. P.; Sheppard, D. N.; Smith, B. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 348-357.
- (58) Reusch, C. F.; Cussler, E. L. *AIChE J.* **1973**, *19*, 736-741.
- (59) Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017-7036.
- (60) Tabushi, I.; Kuroda, Y.; Yokota, K. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4601-4604.
- (61) De Riccardis, F.; Izzo, I.; Montesarchio, D.; Tecilla, P. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2781-2790.
- (62) Reddy, G. L.; Iwamoto, T.; Tomich, J. M.; Montal, M. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14608-14615.
- (63) Broughman, J. R.; Shank, L. P.; Takeguchi, W.; Schultz, B. D.; Iwamoto, T.; Mitchell, K. E.; Tomich, J. M. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7350-7358.
- (64) Elborn, J. S. *Lancet* **2016**, *388*, 2519-2531.
- (65) Koulov, A. V.; Lambert, T. N.; Shukla, R.; Jain, M.; Boon, J. M.; Smith, B. D.; Li, H.; Sheppard, D. N.; Joos, J. B.; Clare, J. P.; Davis, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4931-4933.
- (66) McNally, B. A.; Koulov, A. V.; Smith, B. D.; Joos, J. B.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2005**, 1087-1089.
- (67) Cooper, J. A.; Street, S. T.; Davis, A. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5609-5613.
- (68) Busschaert, N.; Bradberry, S. J.; Wenzel, M.; Haynes, C. J. E.; Hiscock, J. R.; Kirby, I. L.; Karagiannidis, L. E.; Moore, S. J.; Wells, N. J.; Herniman, J.; Langley, G. J.; Horton, P. N.; Light, M. E.; Marques, I.; Costa, P. J.; Félix, V.; Frey, J. G.; Gale, P. A. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3036-3045.
- (69) Haynes, C. J.; Busschaert, N.; Kirby, I. L.; Herniman, J.; Light, M. E.; Wells, N. J.; Marques, I.; Felix, V.; Gale, P. A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 62-72.
- (70) Valkenier, H.; Haynes, C. J. E.; Herniman, J.; Gale, P. A.; Davis, A. P. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1128-1134.
- (71) Mareda, J.; Matile, S. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 28-37.

- (72) Dawson, R. E.; Hennig, A.; Weimann, D. P.; Emery, D.; Ravikumar, V.; Montenegro, J.; Takeuchi, T.; Gabutti, S.; Mayor, M.; Mareda, J.; Schalley, C. A.; Matile, S. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 533-538.
- (73) Vargas Jentzsch, A.; Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5302-5303.
- (74) Song, I. S.; Choi, M. K.; Shim, W. S.; Shim, C. K. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 142-154.
- (75) Carmona-Ribeiro, A. M.; de Melo Carrasco, L. D. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9906-9946.
- (76) Xue, Y.; Pan, Y.; Xiao, H.; Zhao, Y. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 46887-46895.
- (77) Wang, L.; Su, B.; Cheng, C.; Ma, L.; Li, S.; Nie, S.; Zhao, C. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 1391-1404.
- (78) Rahn, O.; Van Eseltine, W. P. *Annu. Rev. Microbiol.* **1947**, *1*, 173-192.
- (79) Behr, J. P.; Lehn, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6108-6110.
- (80) Tabushi, I.; Kobuke, Y.; Imuta, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1744-1745.
- (81) Moore, L. E.; Ledder, R. G.; Gilbert, P.; McBain, A. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4825-4834.
- (82) Gerba, C. P. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 464-469.
- (83) Heir, E.; Sundheim, G.; Holck, A. L. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 378-388.
- (84) Leclercq, L.; Dewilde, A.; Aubry, J. M.; Nardello-Rataj, V. *Int. J. Pharm.* **2016**, *512*, 273-281.
- (85) Anderson, E. B.; Long, T. E. *Polymer* **2010**, *51*, 2447-2454.
- (86) Gravel, J.; Schmitzer, A. R. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1051-1071.
- (87) Hayes, R.; Warr, G. G.; Atkin, R. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 6357-6426.
- (88) Amarasekara, A. S. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 6133-6183.
- (89) Gauchot, V.; Gravel, J.; Schmitzer, A. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 6280-6284.
- (90) Gauchot, V.; Schmitzer, A. R. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4917-4923.
- (91) Zhu, Z. Q.; Xiang, S.; Chen, Q. Y.; Chen, C.; Zeng, Z.; Cui, Y. P.; Xiao, J. C. *Chem. Commun.* **2008**, 5016-5018.
- (92) Dzyuba, S. V.; Kollar, K. D.; Sabnis, S. S. *J. Chem. Ed.* **2009**, *86*, 856-858.
- (93) Arduengo, A. J. (1991). United States Patent No. 5,077,414.
- (94) Arduengo, A. J.; Dias, H. V. R.; Harlow, R. L.; Kline, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5530-5534.
- (95) Arduengo, A. J.; Krafczyk, R.; Schmutzler, R.; Craig, H. A.; Goerlich, J. R.; Marshall, W. J.; Unverzagt, M. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 14523-14534.
- (96) Cassol, C. C.; Ebeling, G.; Ferrera, B.; Dupont, J. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 243-248.

- (97) Alcalde, E.; Ramos, S.; Pérez-García, L. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1035-1038.
- (98) Alcalde, E.; Mesquida, N.; Pérez-García, L.; Alvarez-Rúa, C.; García-Granda, S.; García-Rodríguez, E. *Chem. Commun.* **1999**, 295-296.
- (99) Kumar, R.; Sandhu, S.; Singh, P.; Kumar, S. *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 441-471.
- (100) Riduan, S. N.; Zhang, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9055-9070.
- (101) Xue, Y.; Xiao, H.; Zhang, Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 3626-3655.
- (102) Guo, J.; Xu, Q.; Zheng, Z.; Zhou, S.; Mao, H.; Wang, B.; Yan, F. *ACS Macro Letters* **2015**, *4*, 1094-1098.
- (103) Joseph, R.; Naugolny, A.; Feldman, M.; Herzog, I. M.; Fridman, M.; Cohen, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 754-757.
- (104) Mah, T. F.; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G. C.; Stewart, P. S.; O'Toole, G. A. *Nature* **2003**, *426*, 306-310.
- (105) Lehrer, R. I.; Barton, A.; Ganz, T. *J. Immunol. Methods* **1988**, *108*, 153-158.
- (106) Elie, C. R.; Noujeim, N.; Pardin, C.; Schmitzer, A. R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1788-1790.
- (107) Elie, C.-R.; Charbonneau, M.; Schmitzer, A. R. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1231-1234.
- (108) Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 923-928.
- (109) Kempf, J.; Noujeim, N.; Schmitzer, A. R. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 42293-42298.
- (110) Vidal, M.; Elie, C.-R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 436-440.
- (111) Vidal, M.; Schmitzer, A. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9998-10004.
- (112) Leclercq, L.; Noujeim, N.; S, H. S.; Schmitzer, A. R. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14176-14184.
- (113) Leclercq, L.; Schmitzer, A. R. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 11064-11070.
- (114) Noujeim, N.; Leclercq, L.; Schmitzer, A. R. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3784-3790.
- (115) Noujeim, N.; Jouvelet, B.; Schmitzer, A. R. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16159-16168.
- (116) Liu, B.-w.; Zhou, H.; Zhou, S.-t.; Yuan, J.-y. *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 63-81.
- (117) Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2358-2366.

Chapitre 2 : Transport transmembranaire d'anions dans des liposomes par des sels d'imidazolium fonctionnalisés par des groupements adamantyles

2.1 Préface

Au moment où nous avons démarré ce projet, seuls des transporteurs de type canaux transmembranaires avaient été synthétisés et étudiés dans notre groupe. En tenant compte de la facilité de synthèse des sels d'imidazolium, nous avons voulu démontrer qu'il était possible de prédire et contrôler le mécanisme de transport selon la structure du transporteur. En effet, en fonctionnalisant des cations imidazolium par des groupements adamantyles, ne pouvant pas former d'interactions π comme les groupes phényléthynylbenzyles, nous avons voulu empêcher leur auto-association en canaux dans la bicouche de phospholipides. Ce chapitre présente donc la synthèse et l'étude des propriétés anionophoriques des différents sels d'imidazolium fonctionnalisés par des groupements adamantyles. Le mécanisme de transport, ainsi que la sélectivité envers différents anions seront discutés.

Ma contribution à cet article présenté au chapitre 2 a été l'élaboration du projet et des procédures, la totalité du travail expérimental ainsi que la rédaction de la première version du manuscrit.

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

Les informations supplémentaires de cet article se trouvent en annexe aux pages 136 – 162 de cette thèse.

2.1.1 Concepts et méthodes utilisées

2.1.1.1 Méthodes analytiques pour déterminer le transport anionique

L'approche utilisée pour étudier le transport ionique dans cet article s'est fait en utilisant le modèle le plus simple d'une membrane de phospholipides : le liposome unilamellaire. Pour mesurer le transport d'ions, nous avons utilisé des sondes fluorescentes encapsulées dans les liposomes : la lucigénine et le 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate de trisodium (HPTS) (figure 2.1).^{1,2} Cette méthode est une des plus utilisées dans la communauté scientifique qui étudie le transport transmembranaire car c'est une méthode fiable, qui ne nécessite pas d'équipement sophistiqué et qui permet l'obtention de données relatives à la fois à l'efficacité et au mécanisme d'action du transporteur.³

La lucigénine est un fluorophore dont la fluorescence est éteinte en présence d'halogénures, plus particulièrement le chlorure.⁴ Le mécanisme d'extinction de la fluorescence est induit par des transferts non radiatifs d'électrons. Ceci fait donc de la lucigénine la sonde idéale pour suivre les changements de concentration en chlorures à l'intérieur des liposomes. Plus un transporteur est efficace et plus rapidement il induit une augmentation de la fluorescence de la lucigénine.

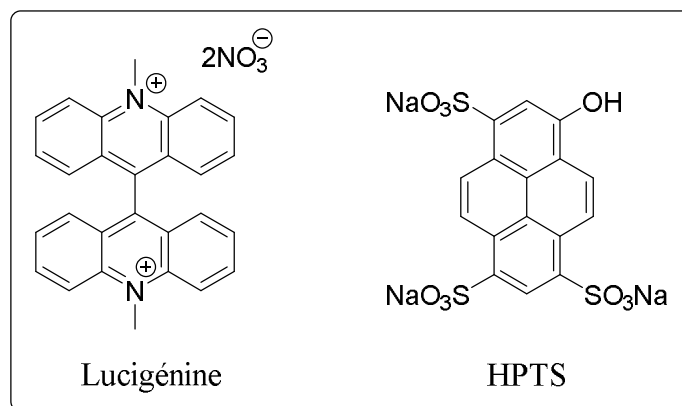


Figure 2.1 Structure de sondes fluorescentes utilisées en transport ionique : la lucigénine et le 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonate de trisodium (HPTS).

Le HPTS est un fluorophore dont la fluorescence est dépendante du pH du milieu. Les formes protonnées et déprotonnées du HPTS possèdent chacune des longueurs d'ondes d'excitation différentes pour une même longueur d'onde d'émission. Ainsi, la variation du pH à l'intérieur des liposomes contenant du HPTS peut être étudiée en suivant le rapport des intensités de fluorescence aux deux longueurs d'ondes d'excitation.

2.1.1.2 Méthode de détermination du mécanisme de transport

Trois techniques différentes ont été utilisées pour confirmer le mécanisme de transport des transporteurs étudiés, deux dans des liposomes et l'autre dans une membrane de liquide organique à l'aide d'un tube en forme de U.

Tout d'abord, des liposomes formés à partir d'un mélange de phosphatidylcholine provenant de jaunes d'œuf (EYPC) ont été dopés par du cholestérol. Le cholestérol a pour effet de rigidifier les membranes de phospholipides.⁵ Le taux de transport d'anions, dans des membranes de phospholipides rigides, ne devrait pas être altéré si celui-ci est effectué par un canal transmembranaire. Toutefois, s'il s'agit d'un transporteur mobile, la diffusion du complexe transporteur:anion s'en voit ralenti, ce qui se traduit par une grande différence entre les taux de transport dans une membrane fluide (en absence de cholestérol) et dans la membrane rigide (avec du cholestérol). En suivant le même raisonnement, une expérience supplémentaire a été effectuée dans des liposomes de 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) pur. Les membranes de DPPC possèdent une température de transition à 41 °C.⁶ En dessous de cette température, la membrane se retrouve alors dans son état gel et, au-dessus de cette température, dans son état fluide, ce qui joue sur la rigidité de la membrane du liposome. À l'état de gel, l'efficacité d'un transporteur mobile s'en voit grandement altérée, tandis que peu ou pas de changement n'est observé dans le cas d'un canal transmembranaire.

Une dernière expérience a été réalisée pour confirmer le mécanisme de transport. Une expérience de transport d'anions dans une « membrane » de liquide organique a été effectuée dans un tube en forme de U (figure 2.2). Le raisonnement derrière cette expérience est qu'un transporteur qui s'assemble pour former un canal transmembranaire ne peut virtuellement pas transporter les anions d'un côté à l'autre de la « membrane » organique liquide formée par le

chloroforme.⁷ Si un transporteur est capable de transporter les anions NO_3^- couplés à la lucigénine au travers de la « membrane » organique liquide, il s'agit d'un transport mobile qui se traduit par une augmentation de la fluorescence de la phase aqueuse receveuse.

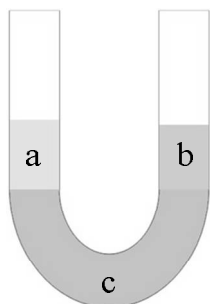


Figure 2.2 Schéma du tube en U : a) phase aqueuse contenant de la lucigénine, b) phase aqueuse receveuse, c) phase organique (CHCl_3) contenant le transporteur.

2.1.1.3 Méthode de détermination d'une constante d'association par titrage RMN ^1H

Lors de ces études, il nous semblait important de déterminer la contribution des ponts hydrogène non conventionnels de type $\text{C-H}\cdots\text{Cl}^-$ dans le processus de transport anionique. Ainsi, nous avons effectué des titrages par RMN afin de déterminer l'affinité entre les différents transporteurs d'anions et le chlorure.

Tout d'abord, les stœchiométries de complexations furent déterminées par la méthode de Job. Cette méthode consiste à faire varier la fraction molaire de chacun des composés formant le complexe supramoléculaire, tout en conservant leur concentration totale constante. Ainsi, une propriété physique propre à la formation du complexe supramoléculaire (le déplacement chimique δ observé en RMN ^1H dans les cas présentés) est tracée dans un graphique en fonction de la fraction molaire d'un des deux composés. La fraction molaire obtenue au maximum (ou au minimum) correspond alors à la stœchiométrie des deux composés dans le complexe.⁸

Dans le cas d'un équilibre 1:1 entre le transporteur (l'hôte, H) et le chlorure (l'invité, I), la constante d'association K_a s'obtient selon l'équation (2.1) :

$$K_a = \frac{[H \cdot I]}{[H] \times [I]} \quad (2.1)$$

Dans le cas d'un équilibre 1:2 (ou 2:1), nous avons une seconde constante d'association à déterminer, qui prend en considération la formation du premier complexe $H \cdot I$ tel que décrit par l'équation (2.2).

$$K_{a2} = \frac{[H \cdot I_2]}{[H \cdot I] \times [I]} \quad (2.2)$$

Comme il nous est impossible de déterminer directement les concentrations $[H \cdot I_2]$, $[H \cdot I]$, $[H]$ ou $[I]$, nous devons procéder à un titrage supplémentaire qui consiste à fixer la concentration d'une composante, généralement $[H_0]$, et en variant la concentration de l'autre composante, $[I_0]$. Lors du titrage, le déplacement chimique δ d'un signal caractéristique est suivi et est ensuite tracé en graphique en fonction du nombre d'équivalents de l'invité. Il s'agit d'une technique pour déterminer indirectement les concentrations nécessaires au calcul de K_a . Ensuite, les valeurs des K_a sont obtenues en effectuant un ajustement à la courbe expérimentale par régression non-linéaire théorique, selon un modèle mathématique dérivé de la stœchiométrie déterminée.⁹ En RMN ^1H , dans le cas d'un équilibre 1:1, par exemple, la constante d'association K_a s'obtient par l'ajustement à la courbe selon l'équation (2.3).

Pour chaque expérience de titrage, nous connaissons les concentrations initiales $[H_0]$ et $[I_0]$. La composante $\Delta\delta$ est déterminée expérimentalement. Elle correspond à la différence du déplacement chimique d'un signal caractéristique de l'hôte en présence d'une concentration connue de l'invité, $[I_0]$, et le déplacement chimique du même signal en l'absence de l'invité. La composante $\delta_{\Delta HI}$ correspond au déplacement chimique de l'entité supramoléculaire. Elle est déterminée lors de l'ajustement à la courbe, mais doit être estimée à l'aide du déplacement chimique maximum après l'ajout sur-stœchiométrique de l'invité. Finalement, K_a peut ensuite être estimée lors de l'ajustement à la courbe, grâce à un algorithme respectant le modèle de l'équation (2.3).

$$\Delta\delta = \delta_{\Delta HI} \left(\frac{\frac{1}{2} \left([I_0] - [H_0] + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left([I_0] + [H_0] + \frac{1}{K_a} \right)^2 + 4[H_0][I_0]}}{[H_0]} \right) \quad (2.3)$$

La détermination des constantes d'associations K_{a1} et K_{a2} dans un équilibre 1:2 (ou 2:1) s'effectue exactement de la même façon, mais avec un modèle mathématique un peu plus complexe. Toutefois, il y a deux valeurs supplémentaires à estimer par régression non-linéaire. Il faut encore une fois déterminer K_{a1} , mais aussi la seconde constante d'association, K_{a2} . Il y a aussi $\delta_{\Delta HI}$ et $\delta_{\Delta HI2}$ qui correspondent aux déplacements chimiques des entités supramoléculaires $H \cdot I$ et $H \cdot I_2$, respectivement.

Article 1 : Transmembrane anion transport mediated by adamantyl-functionalised imidazolium salts

Julien Gravel and Andreea R. Schmitzer*

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

Supramolecular Chemistry, **2014**, *27*, 364-371

Adapted with minor corrections, with permission, from *Supramolecular Chemistry*, Julien Gravel and Andreea R. Schmitzer, “Transmembrane anion transport mediated by adamantyl-functionalised imidazolium salts”, **2014**, *27*, 364-371.

2.2 Abstract

We present the design, synthesis and transmembrane anion transport properties of a new class of mobile organic transporters, possessing a central imidazolium cation and two external adamantyl units. We demonstrate herein that the imidazolium cation can be incorporated in the structure of active mobile anion transporters. Depending on the nature of the counter-anion of the salt, as well as the extraventricular anions, different anion selectivities were obtained. We show the importance of the H2 proton of the imidazolium cation in order to obtain a higher binding constant of the chloride anion. Furthermore, we demonstrate the importance of the flexibility of the spacers between the adamantyl groups and the imidazolium cation in the transport process.

2.3 Introduction

Anion transport across cell membrane is an important biological process that is regulated by transmembrane ion channels.¹⁰ The malfunction of chloride channels generally results in a multitude of diseases, such as osteoporosis or formation of kidney stones.¹¹ Cystic fibrosis represents the most common disease involving anion transport in the human body.¹² This disease is the result of an altered chloride ion diffusion caused by a mutation of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) protein.^{11,12} Interest regarding the design and development of artificial anion transporters as possible solutions to cure such malfunctions has increased significantly over the past decades.¹³ Therefore, supramolecular chemists focused their attention on the use of small molecules that possess the capacity to act as anion transporters, both to regulate these ion gradient disorders and to better understand the importance of such processes in biological systems. In terms of mechanisms, synthetic transporters can operate via two distinct mechanisms. The first one involves the formation of a transmembrane channel, which can be formed by a single molecule, or by a supramolecular assembly of several molecules, depending on the size of the monomer. On the other hand, the second mechanism of anion transport involves small molecules acting as mobile carriers. They can cross the cell membrane as an anion–transporter complex, allowing ionic exchange between the extra- and intravesicular

media.¹⁴ The activity of ion transporters is generally based on the exploitation of weak interactions between ions and the transporter, such as hydrogen bonds,¹⁵ anion- π ¹⁶ or cation- π .¹⁷ Our group recently reported the preparation of imidazolium, benzimidazole and benzimidazolium-based anion transporters that can self-assemble into ion channels via π -stacking intermolecular interactions to allow anion diffusion.¹⁸⁻²² Mechanistic studies revealed that the transport of chloride across the membrane was possible through anion- π interactions with the aromatic units of the transporter.¹⁸ In order to get a better understanding of the role of the imidazolium cation in the transport process, as well as the influence of the structure of the transporter in terms of self-aggregation capacity in the bilayer, we designed a new family of imidazolium salts bearing adamantyl moieties (figure 2.3).

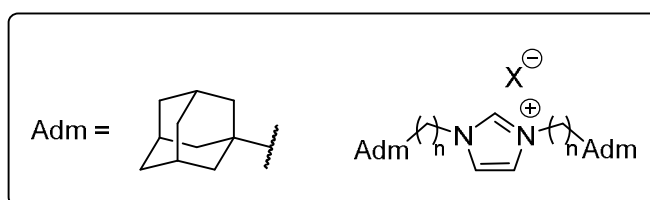


Figure 2.3 Adamantyl-imidazolium salts ($n = 0 - 2$).

We first hypothesised that the presence of adamantyl groups on the imidazolium central cation still confers the transporter the required lipophilicity to penetrate and diffuse through a phospholipid membrane,²³ but the presence of the two adamantyl groups prevents their self-aggregation and formation of transmembrane channels. Herein, we present the transmembrane transport properties of adamantyl-functionalised imidazolium carriers, demonstrating the importance of the nature of their counter-anion and its impact on the anion transport process. Finally, kinetic studies allow us to demonstrate the mobile anion transport mechanism.

2.4 Results and discussion

2.4.1 Synthesis

Synthesis of imidazolium salt **2.1·Br** was adapted from an existing procedure.^{24,25} The symmetric imidazolium salt was obtained through the condensation of formaldehyde, adamantylamine and glyoxal, in the presence of HBr (figure 2.4).

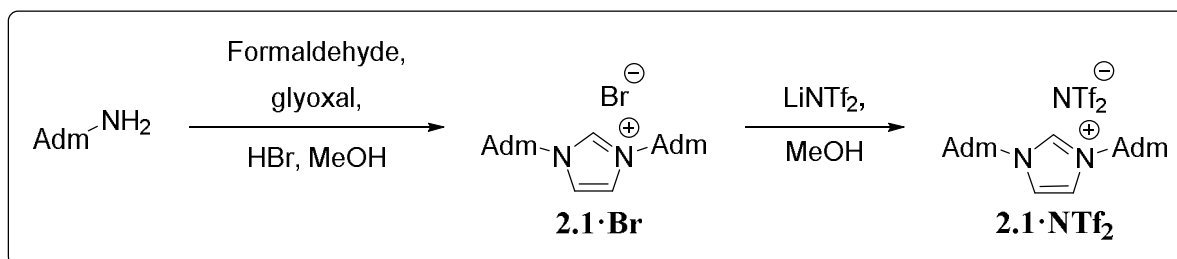


Figure 2.4 Synthesis of imidazolium salts **2.1·Br** and **2.1·NTf₂**.

All other imidazolium bromide salts were prepared following a general procedure. First, the corresponding adamantane alcohol was converted to the corresponding bromide.^{26,27} Then, two successive nucleophilic substitutions were performed using the corresponding imidazole in order to generate the bromide salts **2.2·Br**, **2.3·Br**, **2.4·Br** and **2.5·Br** (figure 2.5).

Finally, the anion metathesis yielded compounds **2.1·NTf₂**, **2.2·NTf₂**, **2.3·BF₄**, **2.3·PF₆**, **2.3·NTf₂**, **2.4·NTf₂** and **2.5·NTf₂** as air-stable salts (figures 2.4 and 2.6).

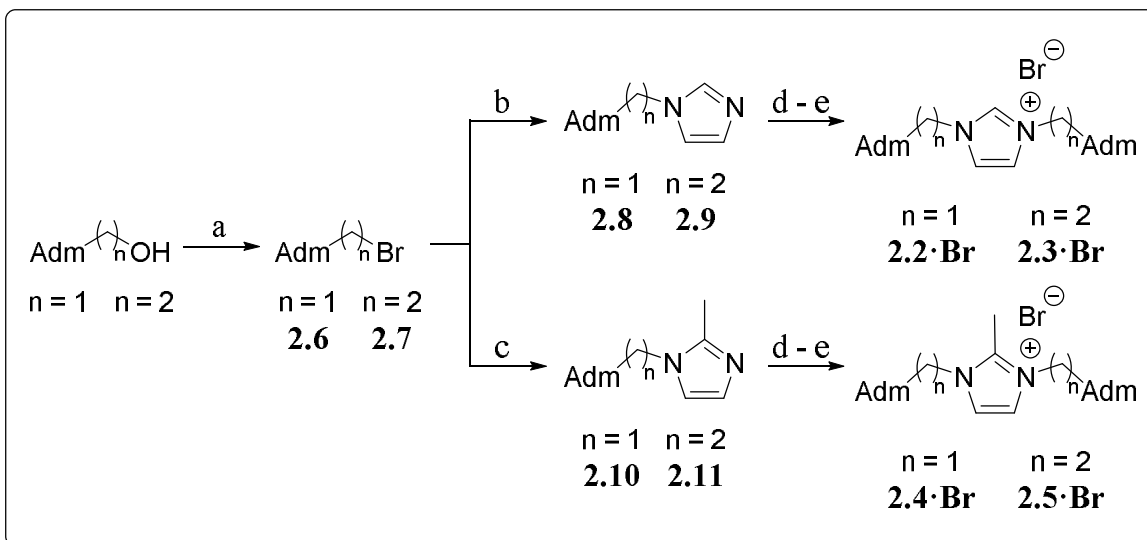


Figure 2.5 Synthesis of imidazolium salts **2.2·Br**, **2.3·Br**, **2.4·Br** and **2.5·Br**. Reagents and conditions: a) Conc. HBr, b) imidazole, NaH, DMF, c) 2-methylimidazole, NaH, DMF, d) ($n = 1$), **2.6**, DMF, microwave, e) ($n = 2$), **2.7**, DMF.

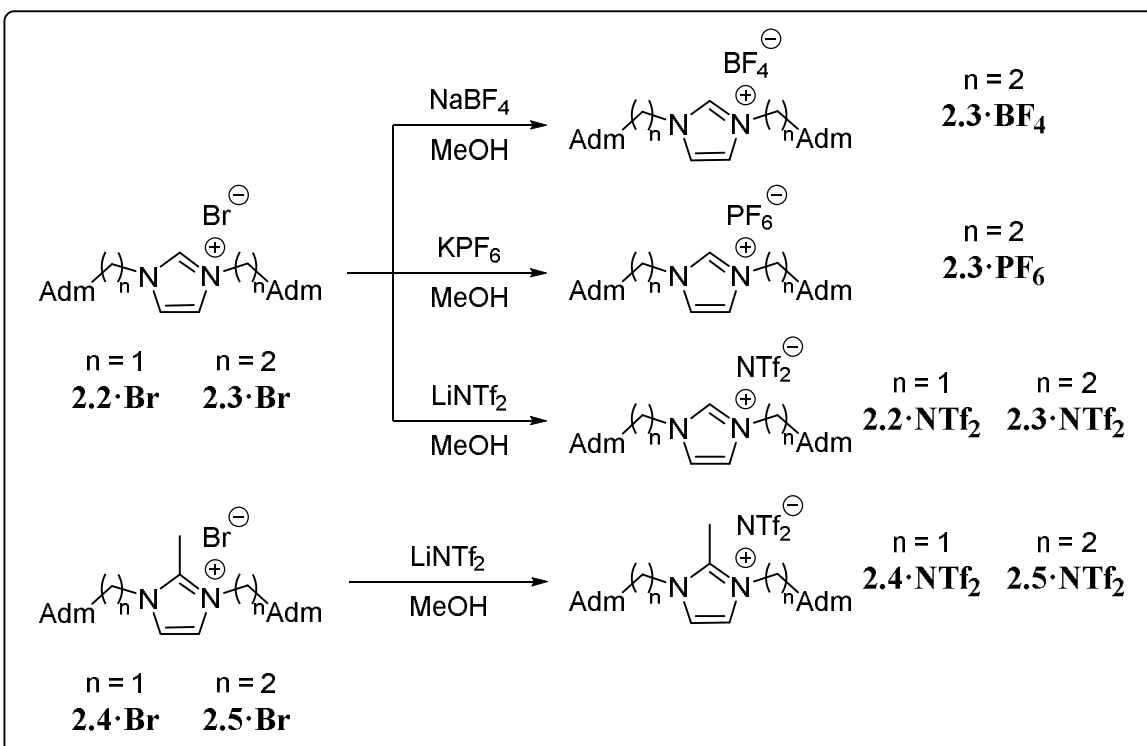


Figure 2.6 Synthesis of imidazolium salts **2.2·NTf₂**, **2.3·BF₄**, **2.3·PF₆**, **2.3·NTf₂**, **2.4·NTf₂** and **2.5·NTf₂**.

2.4.2 Transmembrane anion transport activity and mechanism

We first studied the influence of the nature of the cationic unit regarding the chloride transport properties. Our assays were conducted using standard Egg Yolk Phosphatidyl Choline (EYPC) liposomes containing a 100 mM NaCl and 2 mM lucigenin solution. Lucigenin is a fluorescent probe that possesses the particularity to have its fluorescence quenched in the presence of chloride anions. Thus, an increase in fluorescence while the transporter is injected indicates a transport of Cl^- outside of the liposomes.¹ At the end of each fluorescence experiment, Triton-X was added in order to lyse the liposomes and observe full lucigenin fluorescence (figure 2.7).

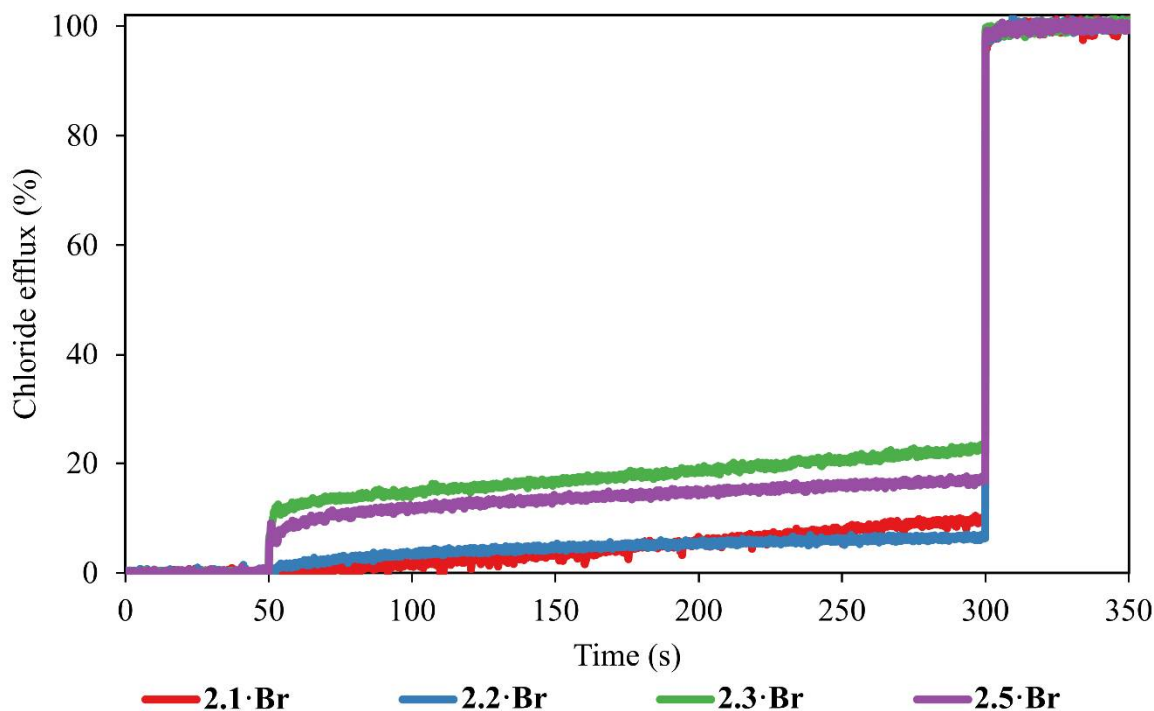


Figure 2.7 Relative chloride transport activity of different bromide imidazolium salts at 15 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 2mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO_3 , 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2).

As shown in figure 2.7, increasing flexibility between the adamantyl groups and the imidazolium cation tends to raise the transport efficiency, the most efficient transporter being **2.3·Br**. In addition, transporter **2.5·Br** was designed to investigate the contribution of the most acidic proton of the imidazolium ring H2. This proton is known to be involved in hydrogen-bond formation with anions.²⁸

Replacing this H2 proton by a methyl group prevents the hydrogen-bond formation, resulting in a less efficient transporter. One main advantage of using imidazolium salts as synthetic anion transporters is that it is easily possible to replace their counter-anion. As compound **2.3·Br** showed the best transport efficiency, we decided to use it as scaffold and study the influence of the nature of different counter-anions with compounds **2.3·BF₄**, **2.3·PF₆** and **2.3·NTf₂** (figure 2.8).

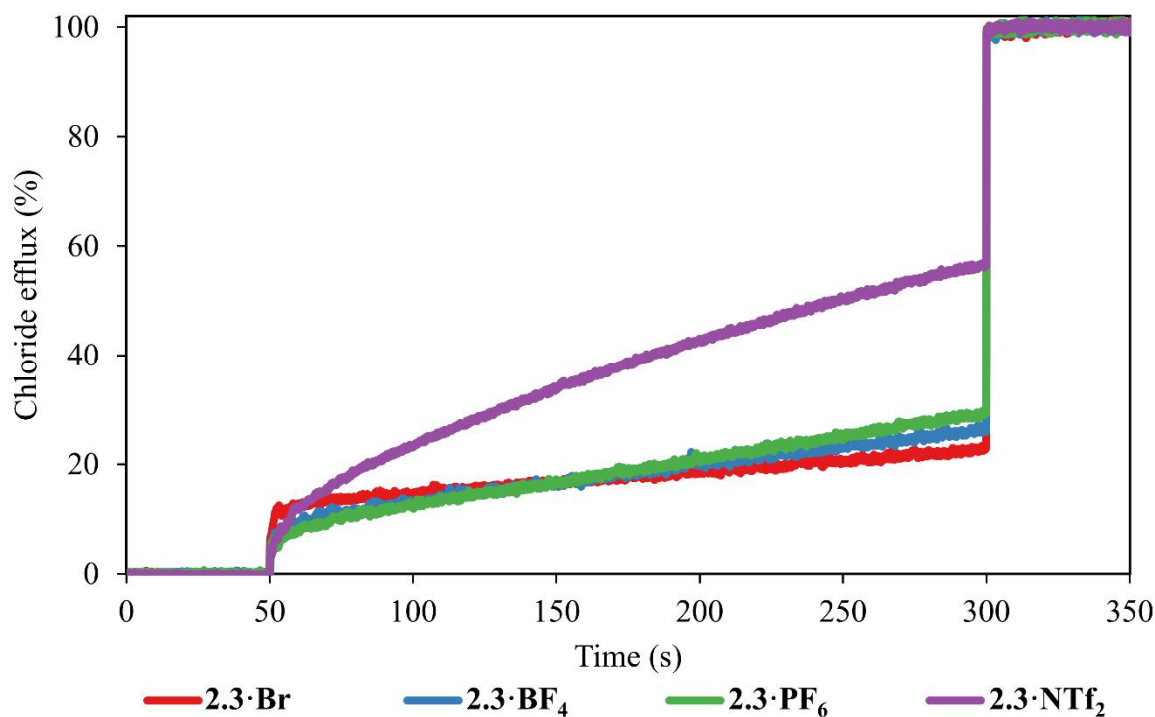


Figure 2.8 Relative chloride transport activity of imidazolium salt **2.3** bearing different counter-anion at 15 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 2mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2).

The transport assays were performed with transporters possessing the same cation, but different counter-anions and showed that the most efficient transporter bears the more lipophilic anion (figure 2.8). The chloride transport activity of these salts follows the Hofmeister sequence, as we previously reported,¹⁸ following the order: $\text{Br}^- < \text{BF}_4^- < \text{PF}_6^- \ll \text{NTf}_2^-$. This result is directly correlated to the capacity of these molecules to partition and insert into the phospholipid bilayer.

In order to confirm our initial hypothesis on the capacity of these molecules to act as mobile ionic transporters, we performed chloride transport studies in hybrid EYPC:cholesterol liposomes (7:3) (figure 2.9).

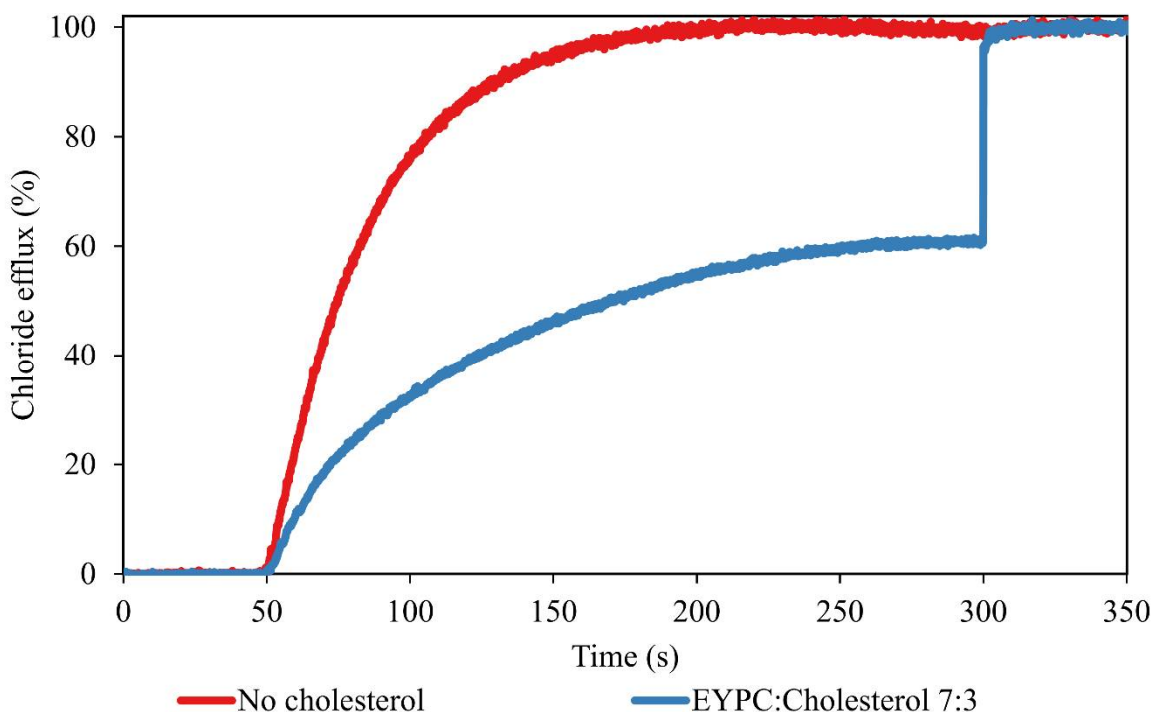


Figure 2.9 Relative chloride transport activity of imidazolium salt **2.3**· NTf_2 at 20 mol% relative to EYPC or EYPC:cholesterol (7:3). Intravesicular: 2mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO_3 , 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2).

Cholesterol has the property to rigidify the liposomal membrane by increasing the energy barrier of normal phospholipids movements inside the membrane (phospholipids rotations, lateral diffusion or phospholipid flip–flop).⁵ In the case of a transmembrane ion channel, the chloride transport is independent of the nature of the phospholipid used, but the transport rate in the case of mobile carriers is slowed down by a lower diffusion in a rigidified membrane, which is translated by a large difference between the normal and the rigidified liposomes.

As shown in figure 2.9, the chloride efflux is slower in cholesterol-doped EYPC liposomes, which is a characteristic of a mobile ion carrier. Similar results were obtained for transporters **2.3·Br** and **2.5·NTf₂** (in annex, figures A1.1 and A1.2, p. 149).

Kinetic parameters of the transport process were determined by varying the concentrations of the carrier in both types of liposomes (figure 2.10).

For each transport experiment, an initial rate (V_0) was measured after the injection of the transporter at less than 10 % of the maximum transport process and the results were transposed on a graph for a Hill analysis (figure 2.11).

Figures 2.10 and 2.11 clearly show that transporter **2.3·NTf₂** becomes slower and less efficient in rigidified liposomes, at high concentrations. Table 2.1 shows that Hill coefficients and EC_{50} values are different depending on the composition of the liposomes. Originally, the Hill coefficient described the number of monomers needed to aggregate into an active assembly in the chloride transport process. However, obtaining Hill coefficient values superior to 1 is quite characteristic for synthetic transporters forming unstable supramolecular structures.²⁹

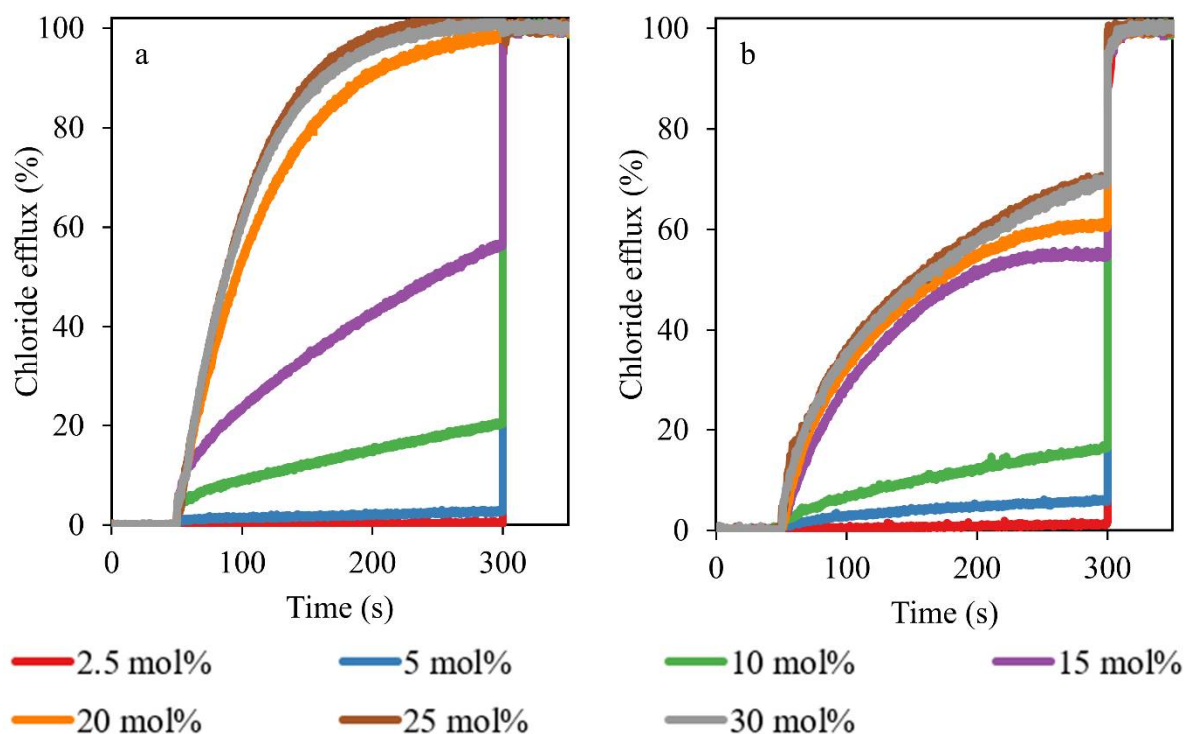


Figure 2.10 Relative chloride transport activity of transporter **2.3·NTf₂** at different concentrations: a) EYPC liposomes, b) EYPC:cholesterol 7:3 liposomes. Intravesicular: 2mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2).

The trend observed in these experiments is that the Hill coefficient is higher in a more rigidified membrane. Our hypothesis is that there is an equilibrium between the complexed monomer with a chloride and the free monomer inside the bilayer, and the transport process occurs via a cooperative interaction between the monomers, but not by a channel-forming mechanism. In the case of the rigidified liposomes, where the diffusion of the transporter inside the membrane is decreased, the transport essentially requires a larger number of mobile monomers in order to perform the transport. The property of these adamantyl-functionalised salts to act as mobile transporters is also supported by the transport assays performed in dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposomes (in annex, figure A1.3, p 150). Because the transport in rigidified membrane may be influenced by a different partition of the transporter,¹⁵ classical U-tube experiments were performed with compound **2.3·NTf₂** and confirmed the proposed carrier mechanism (in annex, figure A1.17, p. 161).

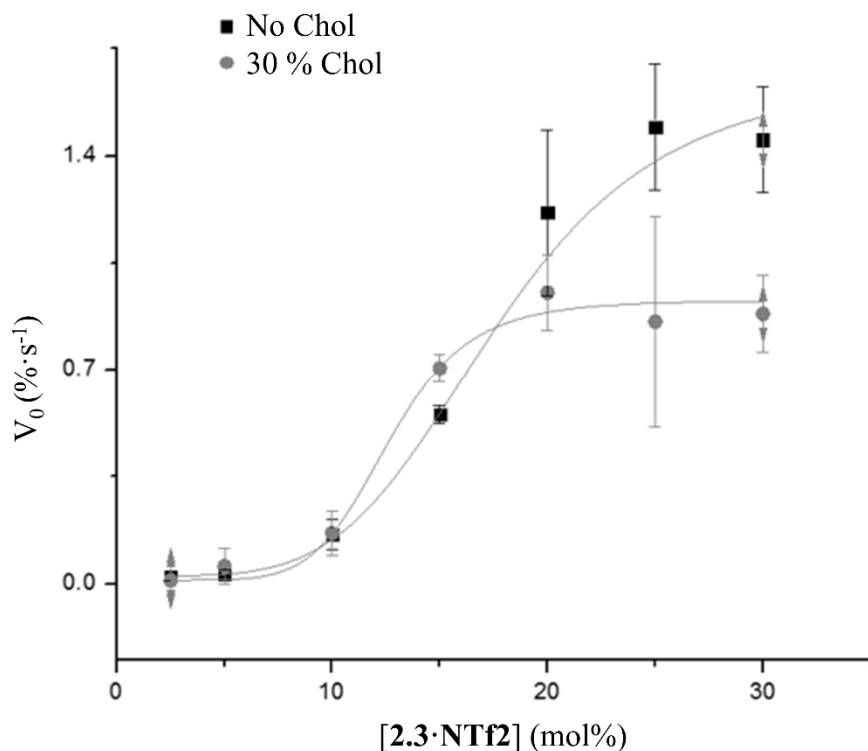


Figure 2.11 Hill plot analysis obtained from data shown in figure 2.10 in EYPC liposomes (■ squares) and EYPC:cholesterol 7:3 liposomes (● circles). The concentration of the transporter is reported relative to the lipid concentration.

Table 2.1 Kinetic parameters of molecule **2.3·NTf₂**

Liposome composition	Hill coefficient	EC ₅₀ (mol%) ^a
EYPC	4.5 ± 0.6	17.7 ± 0.9
EYPC:cholesterol 7:3	7 ± 1	12.5 ± 0.5

^a Relative to the lipid concentration.

For a mobile ion carrier, the binding efficiency of the chloride anion is crucial for the transport process. This mechanism implies that the carrier binds the anion in the intravesicular solution, penetrates and diffuses through the phospholipid bilayer as a complex and releases it in the extravesicular solution. We determined the chloride binding association constant of different transporters, possessing different cationic structures (table 2.2).³⁰

Table 2.2 Binding constants of chloride^a with transporters **2.1·NTf₂**, **2.2·NTf₂**, **2.3·Br**, **2.3·NTf₂**, **2.4·NTf₂** and **2.5·NTf₂**

Compound	K_a (M ⁻¹)
2.1·NTf₂	1224
2.2·NTf₂	1578
2.3·Br	- ^b
2.3·NTf₂	1356
2.4·NTf₂	172
2.5·NTf₂	191

^a Added as TBAC salt, fitting a 1:1 model.

^b Data could not be fitted into a 1:1 model (ESI).

The results shown in table 2.2 suggest that the H2 proton on the imidazolium cation is very important for the binding of the chloride. As previously shown, a better chloride association increases the transport efficiency, but this is not the only parameter that governs the transport process. Indeed, the flexibility of the cation also plays an important role in the transport process. Even though molecule **2.3·Br** seems to strongly bind chloride anions, data could not be fitted into a 1:1 model and its association constant could not be calculated (in annex, figure A1.12, p. 156). However, as we previously showed, transporter **2.3·Br** bearing a bromide counterion is less efficient than its analogue **2.3·NTf₂** bearing an NTf₂ counterion.

As the difference in their transport activity cannot be explained by the binding of the chloride during the transport process, we decided to perform an anion selectivity assay. The principle is the same as in the lucigenin-based fluorescence assays, but the extravesicular free anions are varied (figures 2.12 and 2.13).

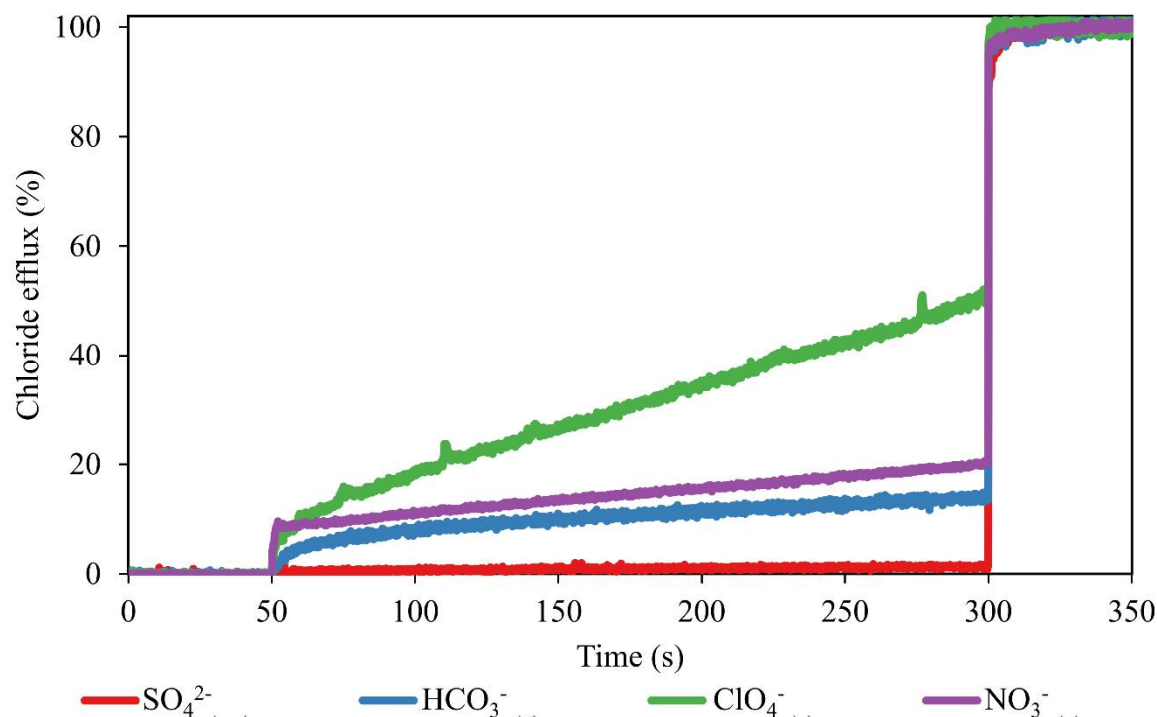


Figure 2.12 Relative chloride transport activity of imidazolium salt **2.3·Br** at 15 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 2mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaX or Na₂X, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2 or 7.4 for NaHCO₃).

The results shown in figures 2.12 and 2.13 demonstrate completely different behaviours of transporters **2.3·Br** and **2.3·NTf₂⁻** in the presence of different extravesicular anions. Transporter **2.3·Br** shows an anion selectivity following the order of the hydration energy of each extravesicular free anion: SO₄²⁻ (-1080 kJ/mol) < HCO₃⁻ (-360 kJ/mol) < NO₃⁻ (-320 kJ/mol) < ClO₄⁻ (-260 kJ/mol) (figure 2.12).³¹ The anion selectivity in these experiments still follows the Hofmeister sequence. Bromide being more labile than the NTf₂⁻, a quick anion exchange can take place with the excess of anions of the extravesicular solution, before undergoing the anion transport process. In other words, these results suggest that the actual salt involved in the chloride transport is the one bearing the extravesicular anion (figure 2.14). In the case of the sulfate anion, the most hydrated anion, the newly formed sulfate salt is completely solvated and cannot penetrate into the bilayer anymore, explaining the lack of chloride transport.

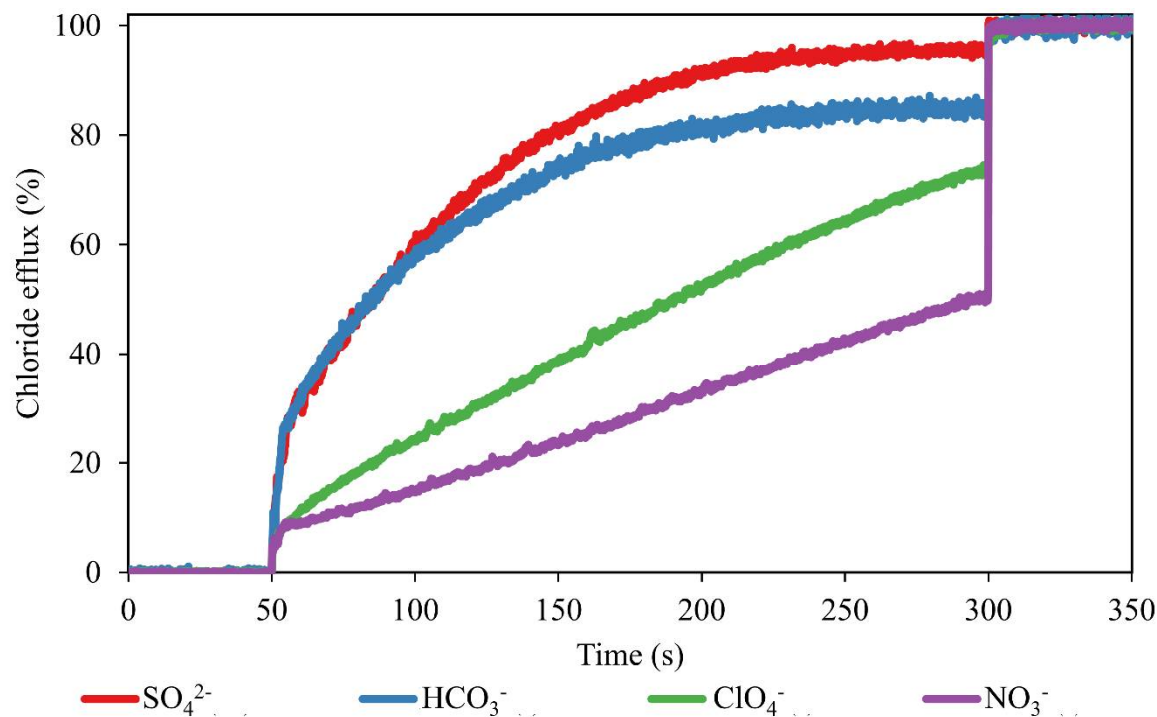


Figure 2.13 Relative chloride transport activity of imidazolium salt **2.3·NTf₂** at 15 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 2mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaX or Na₂X, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2 or 7.4 for NaHCO₃).

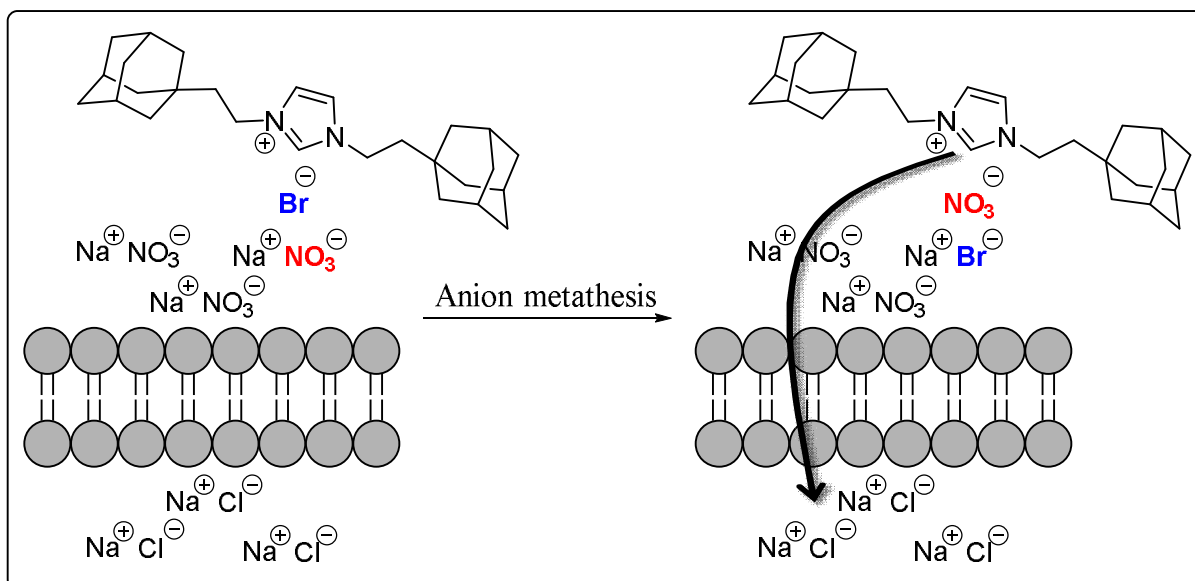


Figure 2.14 Anion metathesis between transporter molecule **2.3·Br** and extravesicular anion before undergoing chloride transport process.

Transporter **2.3·NTf₂** (figure 2.13) shows a completely different anion selectivity: $\text{NO}_3^- < \text{ClO}_4^- < \text{HCO}_3^- < \text{SO}_4^{2-}$, where sulfates as extravesicular anions increase the chloride transport efficiency. This result not only confirms the anion transport selectivity of transporter **2.3·NTf₂**, but also, shows an odd anion selectivity, not related to the hydration energy of extravesicular anions. In order to get a better understanding of the selectivity observed for transporter **2.3·NTf₂**, transport studies using the 8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate (HPTS) were performed (figure 2.15). HPTS is a pH-sensitive probe that possesses a protonated and a deprotonated ($\text{p}K_a \approx 7.4$)³² form with different excitation wavelengths, respectively, 403 and 460 nm, and the same emission wavelength at 510 nm. The ratio of emission between the deprotonated (I_0) and the protonated (I_1) form is directly related to the pH of the solution containing the probe, hence to the transport of protons across the phospholipid bilayer.³³

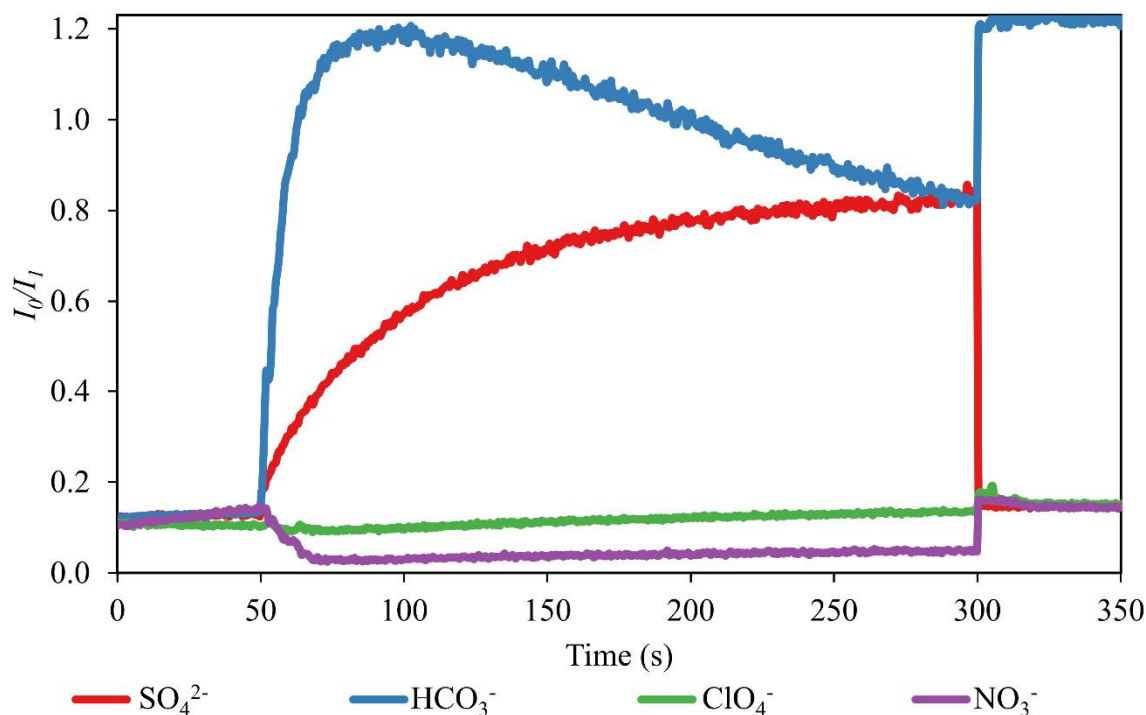


Figure 2.15 HPTS-based transport assay of imidazolium salt **2.3·NTf₂** at 15 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 2mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaX or Na₂X, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2 or 7.4 for NaHCO₃).

The anion selectivity observed in the HPTS assays follows almost the same order as the one observed in the lucigenin-based transport assays (figure 2.15), although in this case a greater alkalinisation of the liposomes for the bicarbonate anion ($pK_a = 6.4$)³⁴ can be observed. This is probably simply due to the bicarbonate, acting as a base, and alkalinisation is not only indicative of proton efflux, but also related to an acid–base reaction between the bicarbonate anion and the intravesicular solution, i.e. the bicarbonate influx. In the case of the sulfate ($pK_a = 1.9$),³⁴ nitrate ($pK_a = -1.64$)³⁵ and perchlorate ($pK_a = -8$)³⁵ anions, they follow exactly the same order as in the lucigenin-based transport assays (figure 12). The pK_a of their acid–base couples are too low to deprotonate the HPTS probe. In these experiments, the pH changes can only be related to OH^- or H^+ flux. After addition of the transporter **2.3·NTf₂** to the external solution containing the sulfate anions, an alkalinisation of the liposomes occurs. The sulfate is poorly membrane permeable, hence the alkalinisation process is likely caused by H^+ diffusion.³³ This means that the $\text{SO}_4^{2-}/\text{Cl}^-$ or OH^-/Cl^- antiport and Cl^-/H^+ symport processes are greatly favoured, compared with the other anions used. In the case of the perchlorate anion, the pH variation is not the same, only a light acidification of the interior of the liposomes being observed. This result is more consistent with a $\text{Cl}^-/\text{ClO}_4^-$ antiport process. Finally, in the case of the nitrate anion, faster NO_3^-/H^+ symport or $\text{OH}^-/\text{NO}_3^-$ antiport processes than the $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ antiport process can be observed.

The correlation of these results with those obtained from the lucigenin-based transport assays (figure 2.13) shows that it is possible to tune the chloride transport process of molecule **2.3·NTf₂** by favouring its Cl^-/H^+ symport, OH^-/Cl^- antiport and X^-/Cl^- antiport processes while preventing the X^-/H^+ symport and OH^-/X^- antiport. This hypothesis is also supported by the results obtained when perchlorate was used as an internal anion (in annex, figure A1.16, p. 160).

2.5 Conclusion

In conclusion, we successfully designed a new class of mobile anion transporters, possessing a central imidazolium cation and two external adamantyl units. These salts possess the capacity to transport chloride outside liposomes, acting as mobile transmembrane carriers. We demonstrated herein that the imidazolium cation can also be incorporated in the structure of

mobile transporters. Depending on the nature of the counteranion of the salt, as well as the extravesicular anions, different anion selectivities were obtained. We confirmed the importance of the H2 proton of the imidazolium cation in order to obtain a higher binding constant between the chloride anion and the imidazolium salt. We also demonstrated the importance of the flexibility of the spacers between the adamantyl groups and the imidazolium cation in the transport process. This is not surprising as the transport process is a complex one, where multiple equilibria are involved and where media with different polarities have to be crossed from one side of the membrane to the other one. The mobile transporter needs a good complexation of the anion during the transport process, but has to be able to release it on the other side of the membrane. A greater flexibility in the transporter's structure may benefit to a conformational change depending on the polarity of the media, resulting in more efficient anion transport across the bilayer.

2.6 Acknowledgements

The authors 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 Université de Montréal for the financial support. The authors also thank Le Centre Régional de RMN and Le Centre Régional de Spectrométrie de Masse for their assistance in this research.

2.7 References

- (1) McNally, B. A.; Koulov, A. V.; Smith, B. D.; Joos, J. B.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2005**, 1087-1089.
- (2) Sakai, N.; Matile, S. *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19*, 452-460.
- (3) Davis, A. P.; Sheppard, D. N.; Smith, B. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 348-357.
- (4) Legg, K. D.; Hercules, D. M. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 2114-2118.
- (5) Bennett, W. F.; MacCallum, J. L.; Tieleman, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1972-1978.
- (6) Davis, J. T.; Okunola, O.; Quesada, R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3843-3862.

- (7) Gokel, G. W.; Daschbach, M. M. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 886-902.
- (8) Renny, J. S.; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11998-12013.
- (9) Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.
- (10) Saier, M. H., Jr. *J. Membr. Biol.* **2000**, *175*, 165-180.
- (11) Jentsch, T. J.; Maritzen, T.; Zdebik, A. A. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2039-2046.
- (12) Higgins, C. *Nature* **1992**, *358*, 356.
- (13) Busschaert, N.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1374-1382.
- (14) Busschaert, N.; Kirby, I. L.; Young, S.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Light, M. E.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4426-4430.
- (15) Cranwell, P. B.; Hiscock, J. R.; Haynes, C. J.; Light, M. E.; Wells, N. J.; Gale, P. A. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 874-876.
- (16) Vargas Jentsch, A.; Emery, D.; Mareda, J.; Mentrangolo, P.; Resnati, G.; Matile, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11675-11678.
- (17) Michau, M.; Caraballo, R.; Arnal-Hérault, C.; Barboiu, M. *J. Membr. Sci.* **2008**, *321*, 22-30.
- (18) Elie, C. R.; Noujeim, N.; Pardin, C.; Schmitzer, A. R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1788-1790.
- (19) Elie, C.-R.; Charbonneau, M.; Schmitzer, A. R. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1231-1234.
- (20) Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 923-928.
- (21) Kempf, J.; Noujeim, N.; Schmitzer, A. R. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 42293-42298.
- (22) Vidal, M.; Elie, C.-R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 436-440.
- (23) Sekutor, M.; Stimac, A.; Mlinaric-Majerski, K.; Frkanec, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6005-6013.
- (24) Arduengo, A. J. (1991). United States Patent No. 5,077,414.
- (25) Archer, R. H.; Zones, S. I.; Davis, M. E. *Micropor. Mesopor. Mat.* **2010**, *130*, 255-265.
- (26) Belser, T.; Stöhr, M.; Pfaltz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8720-8731.
- (27) Shahane, S.; Toupet, L.; Fischmeister, C.; Bruneau, C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *2013*, 54-60.
- (28) Tsuzuki, S.; Tokuda, H.; Mikami, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 4780-4784.
- (29) Jentsch, A. V.; Hennig, A.; Mareda, J.; Matile, S. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2791-2800.
- (30) Cabrer, P. R.; A.-Parilla, E.; Meijide, F.; Seijas, J. A.; Nunez, E. R.; Tato, J. V. *Langmuir* **1999**, *15*, 5489-5495.

- (31) Smith, D. W. *J. Chem. Ed.* **1977**, *54*, 540-542.
- (32) Wolfbeis, O. S.; Fuerlinger, E.; Kroneis, H.; Marsoner, H. *Fresen. Z. Anal. Chem.* **1983**, *314*, 119-124.
- (33) Berezin, S. K.; Davis, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2458-2459.
- (34) *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th Edition*; Taylor & Francis, 2014.
- (35) Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. In *Inorganic chemistry*; Hall, H. P., Ed. 2008, p 181-211.

Chapitre 3 : Transport anionique réversible dans des liposomes par l'utilisation d'un système supramoléculaire compétitif

3.1 Préface

La conception des transporteurs contenant des cations imidazolium fonctionnalisés avec des groupements adamantyles n'avait pas uniquement comme but d'obtenir des transporteurs mobiles, mais aussi de les utiliser pour former des complexes supramoléculaires avec la β -CD. Lors de la rédaction de l'article présenté dans ce chapitre, il n'y avait que très peu d'exemples de transport anionique utilisant des macrocycles supramoléculaires comme interrupteurs moléculaires.^{1,2} À vrai dire, un seul exemple de transport réversible était présenté dans la littérature.² Ce transport d'ions réversible nécessite l'incorporation des transporteurs dans la bicouche phospholipidique lors de la préparation des liposomes. Le processus de transport est activé par l'ajout d'un ligand, la 2-phényléthylamine, et désactivé en présence de la β -CD, due à la forte association entre le ligand et la β -CD (figure 3.1).

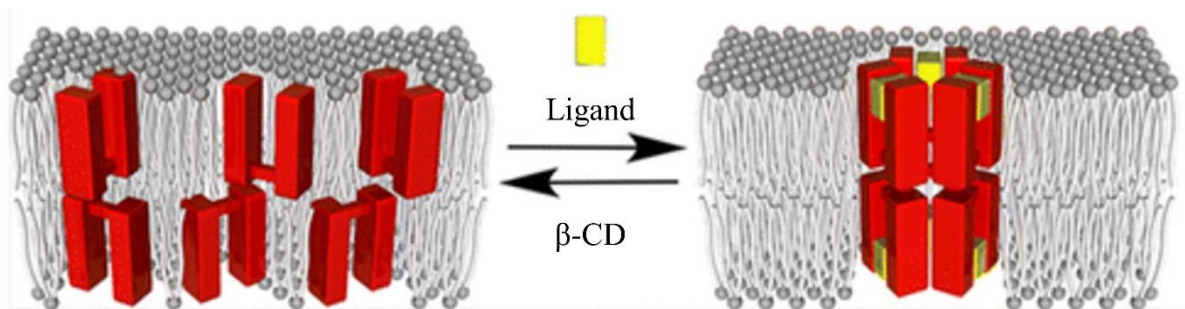


Figure 3.1 Représentation schématique du transport réversible activé par un ligand et désactivé par la β -CD. Adapté avec permissions de la réf. 2. Copyright 2014, American Chemical Society.

C'est d'ailleurs cet exemple qui nous a inspiré à étudier la possibilité d'obtenir un processus de transport transmembranaire réversible, sans toutefois avoir besoin d'incorporer le transporteur dans la bicouche phospholipidique.

Ma contribution à l'article présenté dans ce chapitre a été l'élaboration du projet et des expériences, j'ai réalisé la synthèse et la caractérisation du transporteur et du complexe supramoléculaire avec la β -CD, j'ai préparé les cristaux pour l'analyse par rayons X, réalisé les analyses physico-chimiques, ainsi que les études de transport d'anions. J'ai aussi préparé la première version du manuscrit.

Julie Kempf a résolu les structures du transporteur et du complexe supramoléculaire par diffraction des rayons X et a participé à la révision de la première version de l'article.

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

Les informations supplémentaires de cet article se trouvent en annexe aux pages 163 – 181 de cette thèse.

3.1.1 Concept et méthodes utilisées

La plupart des concepts et méthodes utilisées dans cet article ont été déjà présentés à la préface du chapitre 2, section 2.1.1. Seule l'expérience de conductance sur une bicouche planaire de phospholipides (ou BLM), comme méthode d'analyse de transport d'anions, est présentée ci-dessous.

3.1.1.1 Méthode de la conductance sur une bicouche planaire de phospholipides

L'expérience de conductance sur une bicouche planaire de phospholipides, ou BLM, est normalement utilisée pour étudier le fonctionnement des canaux ioniques. Elle peut être toutefois utilisée pour confirmer le mécanisme de transport, car les signaux sont complètement différents pour un transport de type canal ou mobile. Cette expérience implique deux chambres remplies de solutions contenant des chlorures dans lesquelles une électrode Ag/AgCl y est

trempée. Ces chambres sont reliées par une micro-ouverture recouverte d'une bicouche de phospholipides qui empêche le courant de passer lorsqu'un potentiel électrique est appliqué entre les deux électrodes (figure 3.2). Cependant, si l'ajout d'un transporteur favorise le passage des ions chlorures d'une chambre à l'autre, un courant électrique est mesuré.

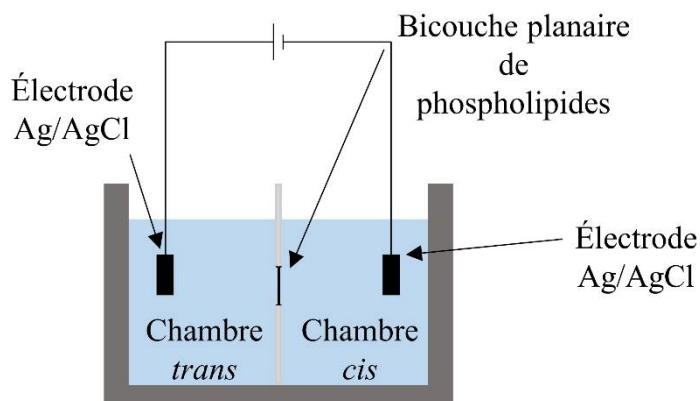


Figure 3.2 Représentation schématique du montage expérimentale de la BLM.

Nous avons choisi cette méthode car elle nous permettait d'avoir physiquement accès aux deux côtés de la membrane, soit le côté externe (chambre *cis*) et le côté interne (chambre *trans*). Ceci nous a permis d'investiguer la réversibilité du système supramoléculaire en étudiant l'ajout du transporteur, de la β -CD et du ligand compétiteur de chaque côté de la membrane.

Article 2 : Host-guest strategy to reversibly control a chloride carrier process with cyclodextrins

Julien Gravel, Julie Kempf and Andreea R. Schmitzer*

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

Chemistry, A European Journal, **2015**, *21*, 18642-18648

Adapted with minor corrections, with permission, from *Chemistry, A European Journal*, Julien Gravel, Julie Kempf and Andreea R. Schmitzer, “Host-guest strategy to reversibly control a chloride carrier process with cyclodextrins”, **2015**, *27*, 364-371.

3.2 Abstract

Herein, we report a reversible modular chloride transport process based on host–guest competitive interactions between an imidazolium-based chloride carrier and β -CD. We report evidence for the formation of the supramolecular complex between 1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide with two β -CDs. Through fluorescence assays in liposomes and black lipid membrane experiments, we demonstrate that the formation of the supramolecular complex results in the inhibition of the chloride transport. We show that the chloride transport process can be entirely restored in the presence of competitive adamantyl-functionalized guests. This is the first example of an entirely reversible modular chloride transport process in phospholipid bilayers involving a mobile carrier transporter and cyclodextrin supramolecular complex.

3.3 Introduction

In the most common forms of life, the cellular membranes, composed mainly of phospholipids, create appropriate isolated structures, where different mechanisms for the selective transfer of ions and molecules into and out of a cell or organelle are required.³ The regulation of intra- and extracellular ion concentrations is paramount to the maintenance of a fully functional cell.⁴ Undesired disruption of this regulation can cause programmed cell death or immediate cell death. This latter event can occur from disruption of osmotic balance and cytolysis, or rupturing of the cell membrane, as water can move freely through the phospholipid bilayer.⁵ Along with endo- and exocytosis, the transport of ions across a phospholipid membrane is probably one of the first processes developed in the evolution of life.

All cell types have chloride channels and carriers in their plasma membranes as well as in each of the subcellular membrane, including the nuclear membrane, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes, endosomes, and mitochondria. Chloride (Cl^-) is the most abundant anion in the extracellular environment of different organisms.⁴⁻⁸ Its transport across cellular membranes contributes to diverse physiological processes. For example, patients suffering from cystic fibrosis illustrate dramatically the chronic consequences of too few open chloride

channels, while individuals afflicted with diarrhea demonstrate the acute effects of too many open chloride channels.⁹ Hence, a controllable chloride transmembrane transport has potential therapeutic applications.¹⁰ We present here a reversible modular chloride transport process based on host–guest competitive interactions between an imidazolium-based chloride carrier and β -cyclodextrins (**β CD**).

Different families of small natural or synthetic molecules have been identified to selectively transport Cl^- ions, acting as active chloride carriers and chloride channels.¹¹⁻¹⁷ We previously reported the control of equilibria of different imidazolium complexes in aqueous solution in the presence of CDs,¹⁸ and we demonstrated that the inclusion complexes with CDs can be used to irreversibly disassemble the transmembrane channel formed by imidazolium salts.¹ Kinbara and coworkers very recently showed that a reversible ion transport process can be established using a ligand-gated synthetic supramolecular channel formed through the assembly with 2-phenethylamine. This supramolecular channel can be scavenged by addition of **β CD**, which leads to its disassembly.²

Pursuing the development of novel imidazolium and benzimidazolium- based systems to assist anion transport,¹⁹⁻²¹ we developed a new family of adamantyl-functionalized imidazolium salts that act as anion carriers.²² In stark contrast to the modulation of the activity of anion channels, nature has provided few examples of processes that modulate chloride carriers. Perhaps also for historical reasons anion channels have commanded greater attention than have chloride carriers. We describe herein our efforts to integrate and utilize synthetic chloride carriers and the inclusion complexes they form with **β CD** to modulate their transport properties and the chemical appraisal of competitive ligands toward the development of controllable, reversible chloride carrier processes. The discovery and development of drugs and principles that affect specific anion carriers may set a clear precedent for the successful development of chloride carrier modulators. When we realized the design of these chloride carriers, we decided to introduce the adamantyl groups on the imidazolium cation for several reasons. First, to increase the relative lipophilicity of the compound to facilitate its lipid membrane partitioning.²³ Secondly, to prevent the self-assembly of the imidazolium cations into channels in the phospholipid bilayer, contrary to the behavior of all our previously reported phenylethynylbenzyl transporters. Thirdly, we had in mind the possibility to exploit the

host–guest interactions between the adamantyl moieties and β CDs. With these chloride carriers in hand, we developed a modulable chloride carrier system, where the chloride transport process is inhibited by the formation of the inclusion complex with β CDs (figure 3.3) and can be restored in the presence of a competitive ligand.

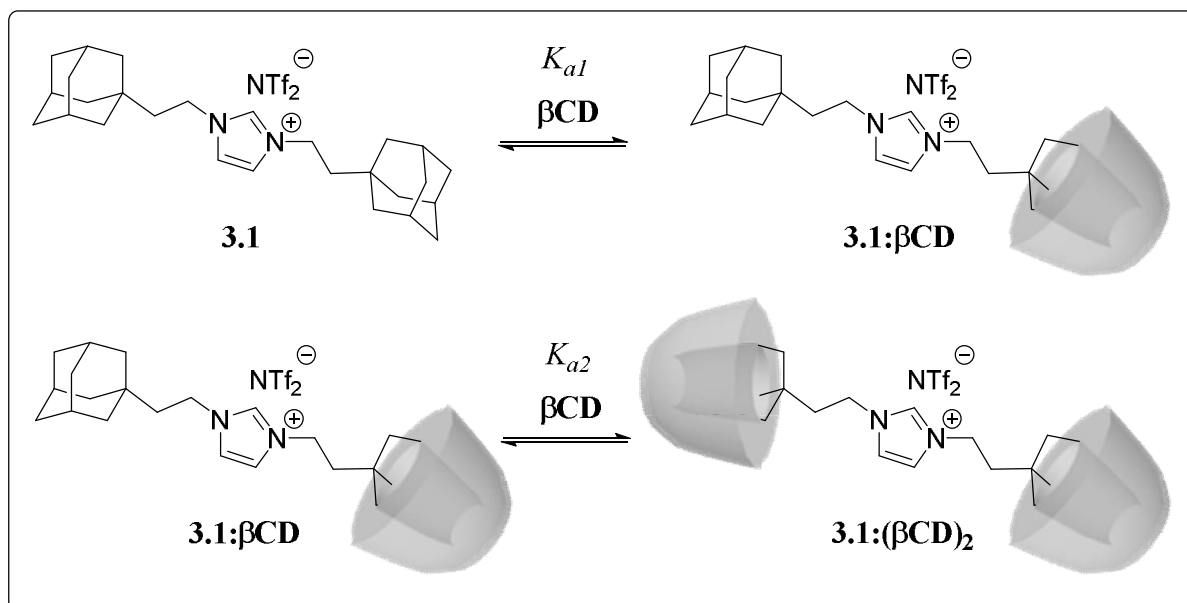


Figure 3.3 Formation of the **3.1:(βCD)₂** complex.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Supramolecular complex characterization

Our first objective was to demonstrate the formation of the inclusion complex **3.1:(βCD)₂**. The formation of the complex was first investigated by ^1H NMR. We confirmed the stoichiometry of the complex by performing a ^1H NMR Job plot (figure 3.4).

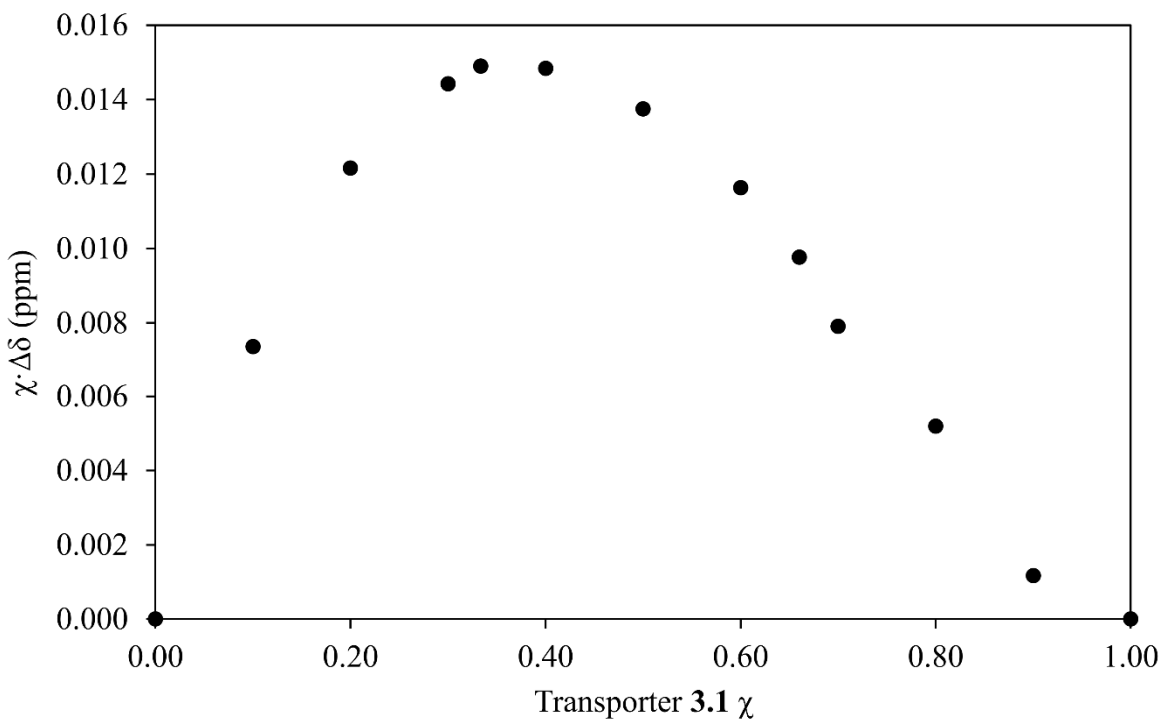


Figure 3.4 ^1H NMR Job plot of carrier **3.1** with βCD .

Different molar ratios of **3.1** with βCD were solubilized in $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ 1:1 at a total concentration of 2.0 mM. Maximal chemical shift displacement was obtained at a molar ratio of $\chi = 0.33$ of **3.1**. The values of the association constants K_{a1} (400 M^{-1}) and K_{a2} (1800 M^{-1}) were extracted from the ^1H NMR titration, using the two sites model in the WinEQNMR2 software.²⁴ If the two adamantyl units are identical in terms of binding sites, equation (3.1) is applicable.²⁵

$$K_{a1} = 4K_{a2} \quad (3.1)$$

The cooperativity parameter [equation (3.2)] can be calculated from equation (3.1). If $\alpha = 1$, there is no cooperativity in the second binding process, the two binding sites being identical. If $\alpha > 1$, a positive cooperativity is present in the system and the formation of the 1:2 complex is favored, compared to the 1:1 complex. If $\alpha < 1$, negative cooperativity is observed and the 1:1 complex formation is favored compared to the 1:2 complex.

$$\alpha = \frac{4K_{a2}}{K_{a1}} \quad (3.2)$$

In our case, K_{a2} being higher than K_{a1} is indicative of a positive cooperativity in the formation of the inclusion complex, the 1:2 complex **3.1:(β CD)₂** being favored compared to the 1:1 complex. This observation is also consistent with the stoichiometry of the system determined by the Job's method. When multiple complexes can be formed, the Job's method is often unreliable.²⁶ However, in this case the value of K_{a2} being more than four times higher than K_{a1} , we can affirm that the 1:1 complex **3.1: β CD** is almost non-existent.^{25,26}

The formation of the supramolecular complex **3.1:(β CD)₂** was also investigated by mass spectrometry. Accurate masses were obtained for different species: the **3.1: β CD** (1:1) complex, the protonated, and the ammonium and sodium adducts of the **3.1:(β CD)₂** (1:2) complexes. We also note that the 1:2 complex (**3.1:(β CD)₂**) was the major species observed (in annex, table A2.1, p. 174).

The supramolecular association of **3.1** with two β CDs was also confirmed by X-ray diffraction analysis. Crystals of **3.1** and the **3.1:(β CD)₂** complex were grown by slow evaporation of a MeOH solution and of a 1:1 H₂O:MeOH mixture, respectively (figure 3.5). Figure 3.5a shows a crystal packing of the close ion pair between the imidazolium cation and the bis(trifluoromethylsulfonyl)amide (NTf₂) anion. Figure 3.5b shows a different organization in the solid state, where the NTf₂ anion is no longer close to the imidazolium cation, but completely embedded in between two β CDs. The NTf₂ anion acts as hydrogen-bond acceptor and the hydroxyl groups of β CDs lower rim as hydrogen-bond donors. The inclusion of the NTf₂ anion is responsible for the formation of the long-range supramolecular network (figure 3.5c). The two adamantyl groups are included in the cavities of the β CDs by the superior faces of the β CDs, in a head-to-head supramolecular complex.

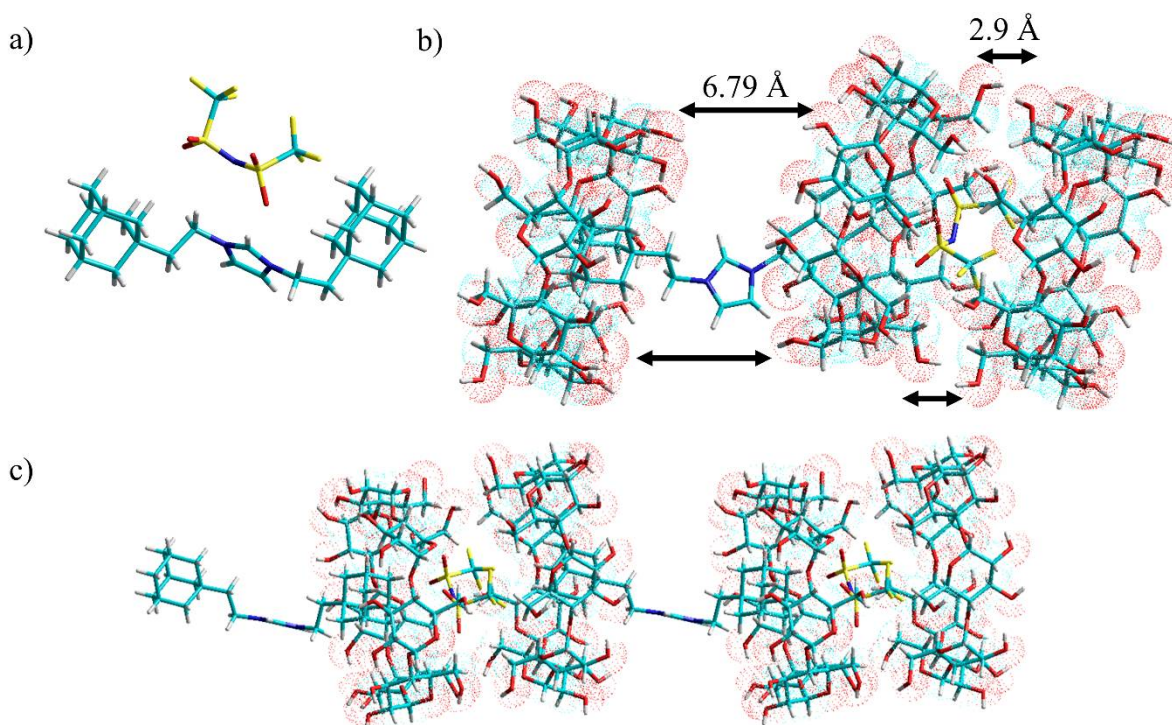


Figure 3.5 Packing motif of **3.1** and **3.1:(βCD)₂** showing their self-assembly in the solid state: a) side-view showing the conformation of **1**, b) side-view showing the **βCD** distance and conformations of **3.1:(βCD)₂**, c) supramolecular network of **3.1:(βCD)₂**. For clarity reasons, solvent molecules are not shown.

3.4.2 Lucigenin-based ion transport studies

Having fully characterized and evidenced the prevalence of the **3.1:(βCD)₂** complex, we turned our attention to the transport properties of this entity. Chloride transport assays were conducted in standard egg yolk phosphatidyl choline (EYPC) large unilamellar vesicles (LUVs) containing a 100 mM NaCl, 2 mM lucigenin, and 10 mM phosphate buffer solution (pH 6.2) bathing in an extravesicular 100 mM NaNO₃ and 10 mM phosphate buffer solution (pH 6.2) at 25 °C. Lucigenin is a well-known fluorescent probe where the fluorescence is quenched by halides, and particularly chlorides.²⁷ Indeed, following the addition of an anion transporter, chloride efflux out of the LUVs can be followed by the increase of the lucigenin fluorescence. To standardize each transport experiment, a lysis of the LUVs was performed by adding Triton-X to obtain maximum lucigenin fluorescence. As we already reported the transport

efficiency of **3.1**,²² our first objective was to assess chloride transport properties of **3.1:(β CD)₂** complex. The anion transport assays were performed with solutions of **3.1** containing different concentrations of β CD in a 1:1 H₂O:MeOH mixture (figure 3.6).

Knowing that the β CDs are not promoting chloride efflux even at 100 mol% relative to EYPC (in annex, figure A2.14, p. 175), these results clearly show an inhibition of the chloride transport by the formation of the **3.1:(β CD)₂** complex. The transport process is almost completely inhibited in the presence of 4 eq. of β CD. As control experiments, we also investigated the possibility to induce the transport inhibition using α and γ -cyclodextrins (in annex, figures A2.15 and A2.16, pp. 175 – 176). Adamantyl groups present steric complementarity with the β CD cavity yielding high association constants, but possess less affinity for the other sized dextrin macrocycles.^{28,29} While α -CD has almost no impact on the anion transport up to 10 eq., γ -CD is able to partially inhibit the transport process (up to 30% of inhibition with 10 eq.).

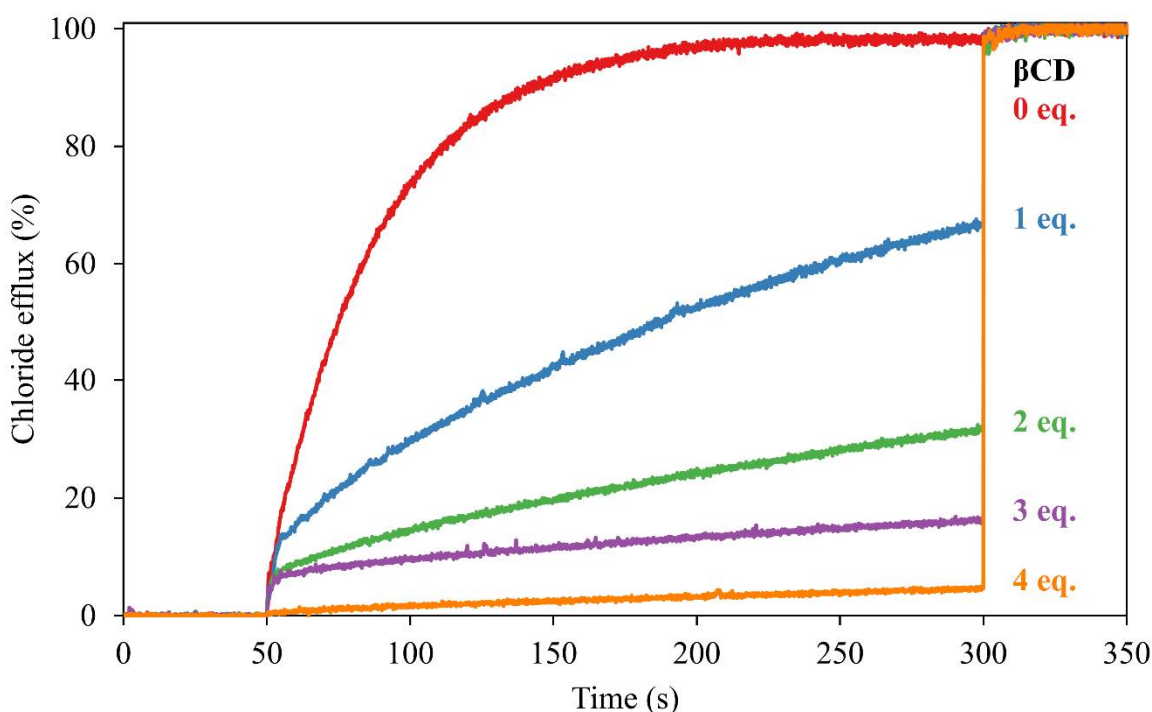


Figure 3.6 Relative chloride transport activity of **3.1** at 20 mol% relative to EYPC added at 50 s with 0 eq. (red), 1 eq. (blue), 2 eq. (green), 3 eq. (purple) or 4 eq. (orange) of β CD.

This is not surprising as γ -CD is known to complex adamantyl groups with weak association constants and α -CD being known to be unable to include adamantyl groups inside its cavity.²⁹

Transport inhibition was observed with up to 5 eq. of β CD (data not shown), where the transport curve overlapped with the 4 eq. curve. Adding more than 4 eq. of β CD caused the precipitation of the complex in the fluorescence cell. The $3.1:(\beta\text{CD})_2$ complex is partially soluble in a 1:1 MeOH:H₂O mixture, while **3.1** is insoluble in H₂O and β CD in MeOH. This may explain why we did not observe the complete inhibition of the chloride transport process.

Having demonstrated that the $3.1:(\beta\text{CD})_2$ preformed complex prevents the penetration of **3.1** into the phospholipid bilayer and inhibits its chloride transport properties, we studied the chloride transport process induced by carrier **3.1** by adding a solution of β CD during the transport process. For this experiment, solutions of different concentrations of β CD were added 50 s after the initiation of the chloride transport induced by **3.1** (figure 3.7).

Whereas the addition of 1 eq. of β CD (Figure 3.7, red) results in only a slight inhibition of the chloride transport process, the addition of 2 eq. or more of β CD (Figure 4, blue, green, and purple) completely stops the transport process. These results clearly indicate that the formation of the $3.1:(\beta\text{CD})_2$ inclusion complex is very fast when at least 2 eq. of β CD were added.

An important aspect of the formation of the inclusion complex that needs consideration is the energetic favorability of β CD and **3.1** to assemble in solution. The formation of the inclusion complex in polar protic solvents is driven by the same forces that drive membrane insertion. Formation of the inclusion complex is favored in this case and circumvents the insertion of the carrier into the membrane.

As we aimed to develop a reversible chloride process by exploiting the host–guest interactions, we pursued the study of the transport process of the $3.1:(\beta\text{CD})_2$ complex in the presence of a competitive guest, also able to form strong inclusion complexes with β CDs. The formation of the new inclusion complex with this guest can compete with the formation of the $3.1:(\beta\text{CD})_2$ complex and can release the carrier, resuming the chloride transport, resulting in a reversible anion transport process (figure 3.8).

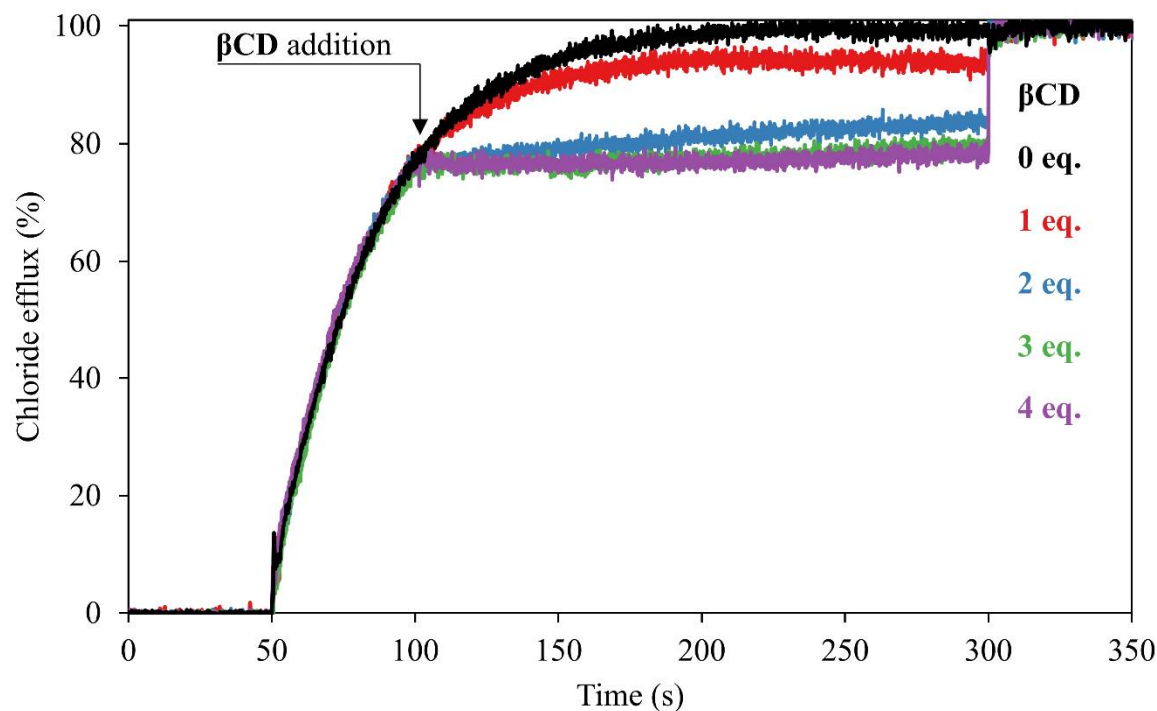


Figure 3.7 Relative chloride transport activity of **3.1** at 20 mol% relative to EYPC added at 50 s and β CD was added at 100 s in different concentrations: 0 eq. (black), 1 eq. (red), 2 eq. (blue), 3 eq. (green) and 4 eq. (purple).

We selected several adamantane guests and assessed their potential to restore the chloride transport using the lucigenin-based fluorescence assay described above (figure 3.9). In addition to adamantane, the analogs tested as competitive guests were: 1-adamantanol (AdmOH), 1-adamantanemethanol (AdmMeOH), 1-adamantaneethanol (AdmEtOH), 1-adamantylamine (AdmNH₂), 1-adamantanemethylamine (AdmMeNH₂) and 1-adamantane carboxylic acid (AdmCOOH), compounds that do not possess any chloride transport properties (in annex, figure A2.14, p. 175).

Adamantane (figure 3.9, grey) seems not to be an appropriate guest because of its high lipophilicity, which allows it to penetrate very rapidly the lipid bilayer preventing the formation of an inclusion complex in the aqueous phase.

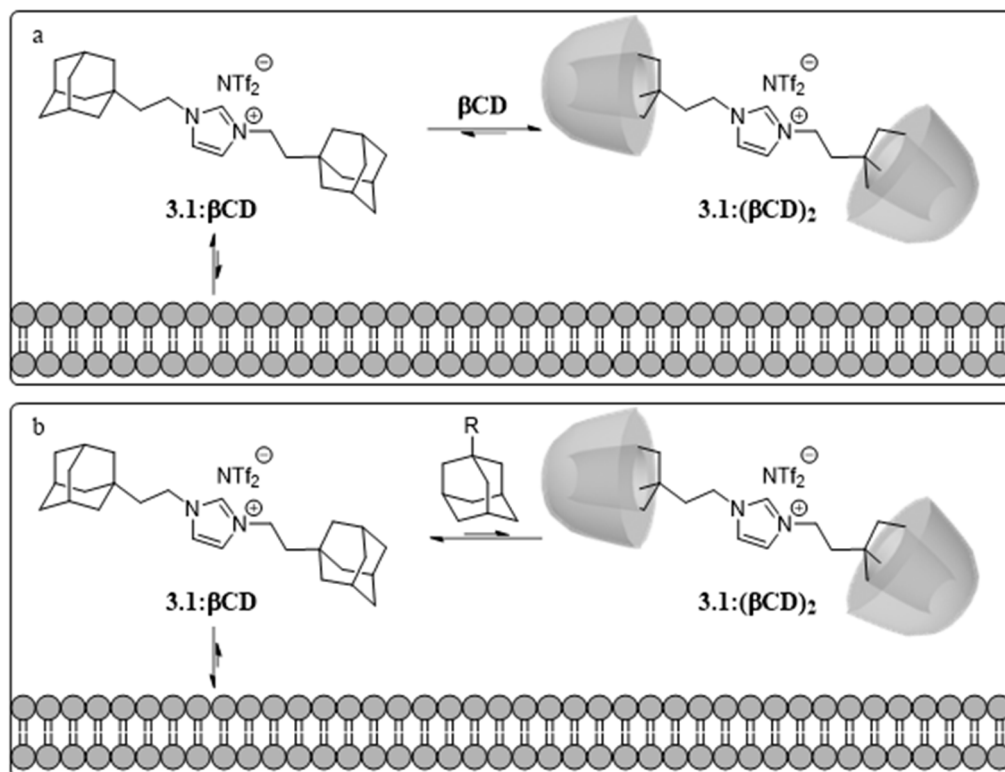


Figure 3.8 Reversible transport process: a) inhibited anion transport by the formation of **3.1:(βCD)₂** complex, b) reactivation of anion transport by addition of a competitive guest.

The best results in terms of restoring the chloride transport process were obtained with the guests containing an alcohol group (figure 3.9, red, blue, and purple), which are neutral in the anion transport conditions. Amines and carboxylic acid analogs are ionized in these conditions (pH 6.2), present as ammoniums (figure 3.9, orange and brown) and carboxylate (figure 3.9, green) respectively. Taking into account the complexity of the media in which the transport assays are carried out, charged guests do not seem efficient to restore the chloride transport process, even if they possess strong association constants with **βCD** (obtained from ¹H NMR titrations, listed in table 3.1). Additional methylene groups between the functional group and the adamantyl group increase the affinity with the **βCD** and AdmEtOH results in a complete restoration of the chloride transport.

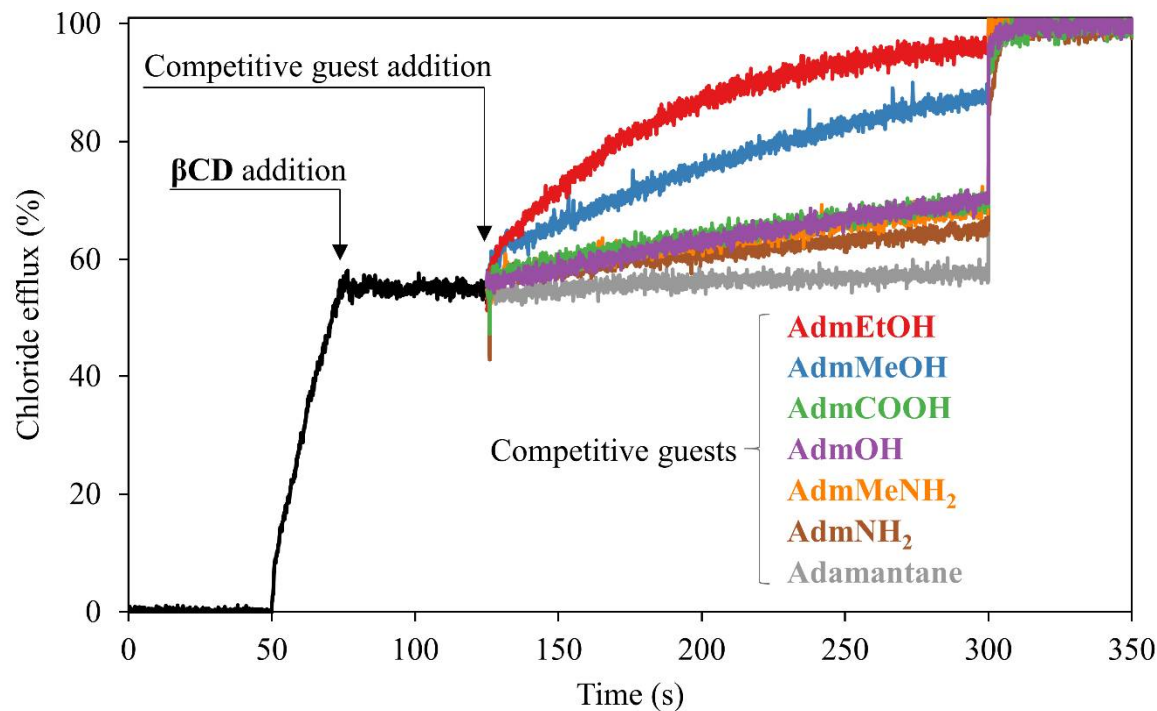


Figure 3.9 Reversible chloride transport activity of **3.1** at 20 mol% relative to EYPC added at 50 s. The chloride transport is inhibited by the addition of 4 eq. of β CD at 75 s. Excess of a competitive guest (5 eq.) is added at 125 s: AdmEtOH (red), AdmMeOH (blue), AdmCOOH (green), AdmOH (purple), AdmMeNH₂ (orange), AdmNH₂ (brown) or Adamantane (grey).

Table 3.1 Association constants^a for adamantane guests.

Entry	Guest	K_a (M ⁻¹)
1	Adamantane	N.A. ^b
2	AdmOH	800 ± 200
3	AdmMeOH	2300 ± 400
4	AdmEtOH	3000 ± 100
5	AdmNH ₂	1800 ± 200
6	AdmMeNH ₂	2300 ± 100
7	AdmCOOH	10200 ± 200

^a The association constants were calculated using WinEQNMR2 software.²⁴

^b N.A. = not applicable.

3.4.3 Planar lipid bilayer experiments

The reversibility of the chloride transport process was also studied using another lipid bilayer model. Black lipid membrane bilayer experiment (BLM) was chosen because it gives access to both sides of the bilayer, that is, the “outer” side (*cis* chamber) and the “inner” side (*trans* chamber).

Though BLM is often used to monitor ion channels’ behavior in artificial membranes,³⁰ it can also be used to investigate mobile anion carriers.³¹ This experiment involves two chambers filled with KCl solutions connected by a small aperture (from 50–250 μm in diameter) with Ag/AgCl electrodes positioned in each chamber. Under an applied potential, a lipid membrane composed of 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) deposited across the aperture prevents current flow. However, if the introduction of an external compound promotes chloride transport across the bilayer, a current flow is measured. BLM experiments were thus carried out using carrier **3.1**, in the absence and presence of βCD and AdmEtOH (figure 3.10).

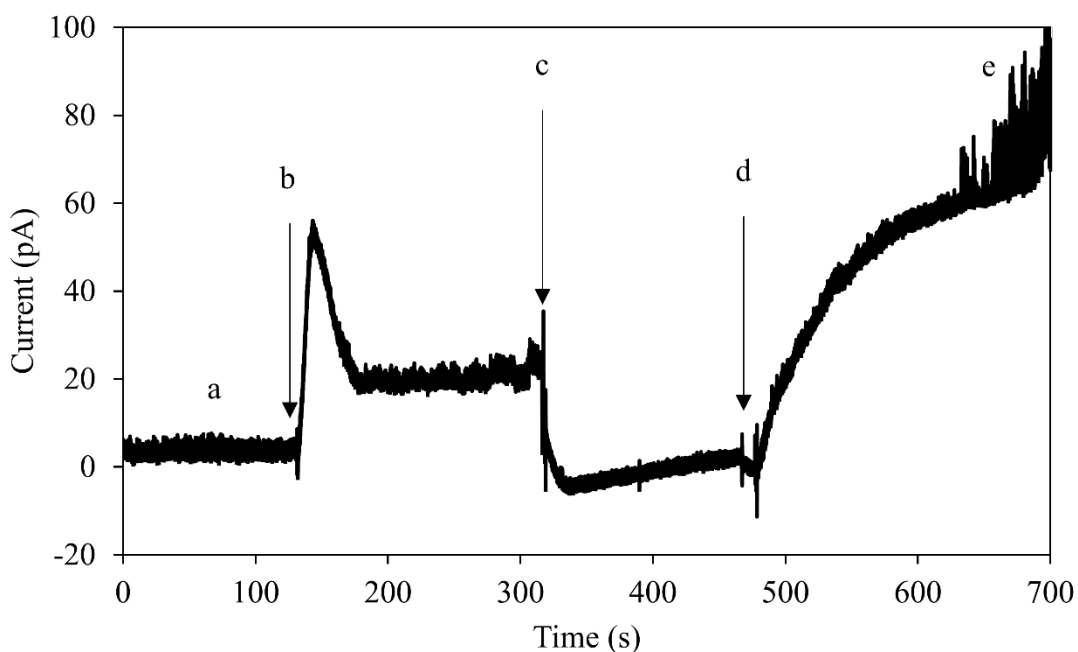


Figure 3.10 Reversible anion transport process in BLM bilayer experiment: a) conductance recording for the DPhPC membrane, b) addition of **3.1**, c) addition of βCD , d) addition of AdmEtOH, e) membrane disruption.

The results shown in figure 3.10 demonstrate again the reversibility of the anion transport process, confirming the previous fluorescence results. The gradual increase of the current over time after the addition of **3.1** (figure 3.10b) is characteristic of a mobile process. A very fast transport inhibition was obtained after the addition of β CD (figure 3.10c) and was finally restored after the addition of the competitive guest AdmEtOH (figure 3.10d). Supplemented with the lucigenin-based fluorescence assays, these results are strong evidence of the reversibility of this chloride transport across bilayers involving a carrier mechanism. This experiment was also reproduced on a longer timescale (in annex, figure A2.23, p. 180).

The mobility of **3.1** in the lipid bilayer and its capacity to transport chloride anions back and forth across the bilayer was also assessed by BLM. In this case, **3.1** was added in the *cis* chamber and β CD in the *trans* chamber, similar to the “inner” side of the membrane (figure 3.11).

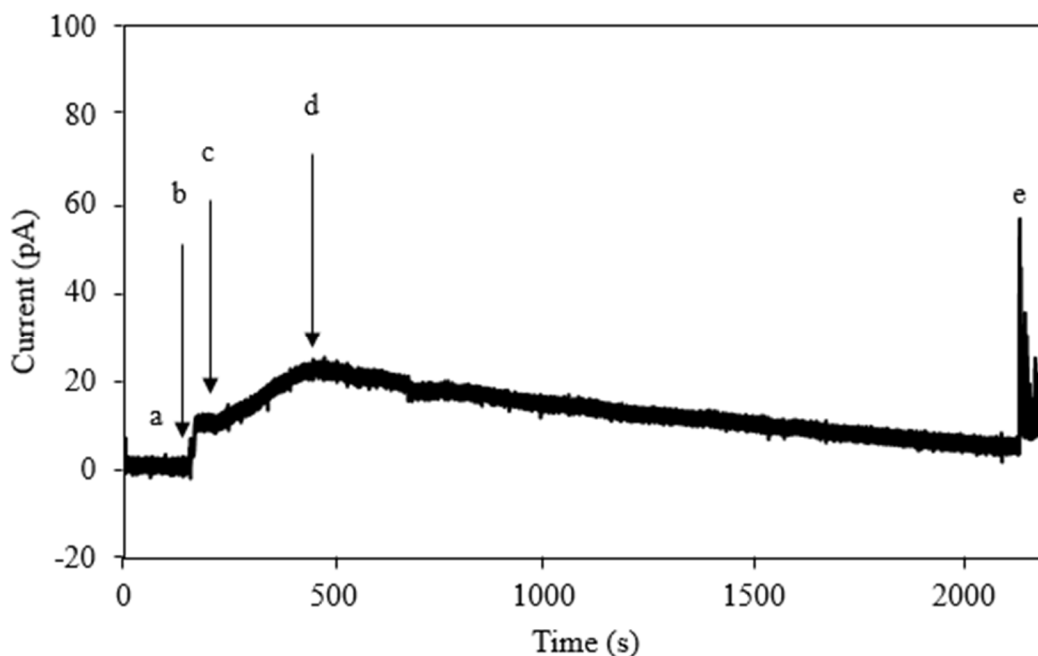


Figure 3.11 Inhibition of the anion transport process by addition of β CD in the *trans* chamber: a) conductance recording for the DPhPC membrane, b) addition of **3.1**, c) first addition of β CD, d) second addition of β CD, e) membrane disruption.

Contrary to what we had observed when β CD was added in the same chamber (figure 3.10), inhibition of the chloride transport is still observed, but the inhibition process is significantly slower (figure 3.11d). This result is not surprising, as the carrier needs to penetrate the bilayer, cross the entire bilayer from one side to the other and contact the β CD, which extracts it from the bilayer. To the best of our knowledge, it is the first time that a carrier is shown to travel across a lipid membrane in this way.

3.5 Conclusion

In conclusion, we report here a reversible modular chloride transport process based on host–guest competitive interactions. The complete characterization of a new supramolecular complex between imidazolium salt **3.1** that acts as a chloride carrier and β CD allowed us to develop a total inhibition of the chloride transport induced by **3.1**. The transport process can be entirely restored in the presence of competitive adamantylfunctionalized guests. The transmembrane translocation of carrier **3.1**, in the absence and in the presence of β CD and a competitive guest was successfully evidenced by BLM studies. Potential therapeutic applications of this strategy to reversibly modulate chloride transmembrane transport are therefore expected to be numerous, as all the components of this system are non-toxic to human cells. Moreover, the possibility to reversibly modulate the activity of the synthetic chloride carrier **3.1** to elicit antimicrobial activity in biological systems by forming inclusion complexes is underway in our group. Using the inclusion complex to deliver a toxic carrier into a cell may open a new way to hijack the defensive walls of living organisms.

3.6 Experimental section

Materials: Phospholipids were purchased from Avanti Polar Lipids and were used without further purification. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and were used without further purification. D₂O and CD₃CN were purchased from CDN Isotopes.

Instrumentation: NMR experiments were recorded on 400 MHz Brüker Avance III 400 spectrometer at 298K where chemical shifts are reported in ppm relative to residual non-deuterated water signal ($\delta_{\text{H}} = 4.79$ ppm). All spectra were taken with water signal pre-saturation. Mass spectral data were obtained by the Université de Montréal Mass Spectrometry Facility and were recorded on a LC-TOF 6224 instrument equipped with an electrospray ion source from Agilent Technologies. Single-crystal XRD data was collected using a Brüker Venture Metaljet diffractometer equipped with a Photon 100 CMOS Detector, a Helios MX optics and a Kappa goniometer. The sample was mounted on a loop fiber and a gallium source was used. The crystal was kept at 100 K during data collection. Using Olex2, the structure was solved with the XT structure solution program using Direct Methods and refined with the XL refinement package using Least Squares minimisation. Fluorescence measurements were performed on a Varian Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer equipped with a temperature controller. BLM experiments were recorded on a Warner Instruments Planar Lipid Bilayer Workstation with electrochemical bilayer clamp amplifier BC-525D.

Preparation of EYPC liposomes for lucigenin-based fluorescence assays: A lipid film was formed by evaporating a chloroform solution containing 25 mg of egg yolk phosphatidyl choline lipids (EYPC) under reduced pressure at 25 °C for at least 2 h. The lipid film was then hydrated with 500 μL of a 2 mM lucigenin solution containing 100 mM NaCl and 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 6.2). The resulting suspension was then subjected to at least ten freeze/thaw cycles (1 min at -78 °C followed by 1 min at 35 °C) and vortexed for 30 s between each cycle until the mixture appeared homogeneous. The suspension was then extruded through a 100 nm polycarbonate membrane 21 times. The liposomes were purified through a Sephadex G-25 column to remove the extravesicular lucigenin dye using a 100 mM NaCl and 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 6.2) eluent. The isolated liposomes were diluted to 10 mM relative to the lipid, assuming all EYPC was conserved through manipulations.

Lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes: A 100 μL aliquot of liposomes solution (5 mM EYPC liposomes stock solution) was added to a 2.5 mL solution containing 100 mM NaNO_3 and 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 6.2). 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 μL of a tested compound solution in MeOH or MeOH:H₂O 1:1 (for the CD containing solutions) at different concentrations were added and, at $t = 300$ s, 100 μL of a Triton-X 5% (v/v) solution were added to lyse the liposomes and observe the maximal fluorescence of lucigenin in solution. The temperature was set to 25 °C. Experiments were repeated in triplicate and all traces reported are the average of the three trials.

Formation of planar lipid bilayers: 2 mL of 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) solutions in CHCl_3 are separated in 10 aliquots of 200 μL and are stored at -20 °C. Prior to an experiment, solvent of an aliquot of lipids was removed under vacuum at room temperature for 2 h. The lipid was then dissolved in 67 μL of decane to yield a 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution. A small portion of the lipid solution was pre-painted on the 200 μm aperture of a Teflon cuvette and dried with a delicate nitrogen flux twice. Then 1.2 mL of 1M KCl was added to each chamber. The formation of a DPhPC bilayer membrane was detected with a capacitance between 100 to 130 pF. Membrane stability was observed upon the application of a potential of 50 mV for several minutes.

Anion transport experiments: With a stable membrane, 20 μL of a 20 mM solution of a tested compound in DMSO (or 20 μL of a mixture of 2.5 mM of **3.1** and different concentration of βCD in DMSO:H₂O 4:1) was added to the *cis* chamber and manually agitated (slightly). Transport experiments were observed upon the application of a potential of 50 mV and were reproduced at least three times.

3.7 Acknowledgements

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 Université de Montréal for the financial support. We also thank Le Centre Régional de RMN and Le Centre Régional de Spectrométrie de Masse and especially Dr. Alexandra Furtos and Sylvie Bilodeau for their assistance in this research. We also thank Pr. Louis Cuccia for use of the planar bilayer workstation.

3.8 References

- (1) Elie, C. R.; Noujeim, N.; Pardin, C.; Schmitzer, A. R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1788-1790.
- (2) Muraoka, T.; Endo, T.; Tabata, K. V.; Noji, H.; Nagatoishi, S.; Tsumoto, K.; Li, R.; Kinbara, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15584-15595.
- (3) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- (4) Planells-Cases, R.; Jentsch, T. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1792*, 173-189.
- (5) O'Rourke, B. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 19-49.
- (6) Nilius, B.; Droogmans, G. *Acta Physiol. Scand.* **2003**, *177*, 119-147.
- (7) Miller, C. *Nature* **2006**, *440*, 484-489.
- (8) Shen, B.; Li, X.; Wang, F.; Yao, X.; Yang, D. *PLoS One* **2012**, *7*, e34694.
- (9) Singh, A. K.; Venglarik, C. J.; Bridges, R. J. *Kidney Int.* **1995**, *48*, 985-993.
- (10) Verkman, A. S.; Galletta, L. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 153-171.
- (11) Fyles, T. M.; James, T. D.; Kaye, K. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12315-12321.
- (12) Matile, S.; Som, A.; Sordé, N. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6405-6435.
- (13) Sisson, A. L.; Shah, M. R.; Bhosale, S.; Matile, S. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1269-1286.
- (14) Fyles, T. M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 335-347.
- (15) Gokel, G. W.; Carasel, I. A. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 378-389.
- (16) Chui, J. K.; Fyles, T. M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 148-175.
- (17) Saha, T.; Dasari, S.; Tewari, D.; Prathap, A.; Sureshan, K. M.; Bera, A. K.; Mukherjee, A.; Talukdar, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14128-14135.
- (18) Leclercq, L.; Schmitzer, A. R. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 91-95.

- (19) Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 923-928.
- (20) Kempf, J.; Noujeim, N.; Schmitzer, A. R. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 42293-42298.
- (21) Vidal, M.; Elie, C.-R.; Campbell, S.; Claing, A.; Schmitzer, A. R. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 436-440.
- (22) Gravel, J.; Schmitzer, A. R. *Supramol. Chem.* **2015**, *27*, 364-371.
- (23) Wanka, L.; Iqbal, K.; Schreiner, P. R. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3516-3604.
- (24) Hynes, M. J. *J. Chem. Soc. Dalton* **1993**, 311-312.
- (25) Hunter, C. A.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488-7499.
- (26) Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.
- (27) McNally, B. A.; Koulov, A. V.; Smith, B. D.; Joos, J. B.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2005**, 1087-1089.
- (28) Granadero, D.; Bordello, J.; Perez-Alvite, M. J.; Novo, M.; Al-Soufi, W. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 173-188.
- (29) Lis-Cieplak, A.; Sitkowski, J.; Kolodziejewski, W. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 274-282.
- (30) Zakharian, E. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *998*, 109-118.
- (31) Shatursky, O. Y.; Kasatkina, L. A.; Rodik, R. V.; Cherenok, S. O.; Shkrabak, A. A.; Veklich, T. O.; Borisova, T. A.; Kosterin, S. O.; Kalchenko, V. I. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9811-9821.

Chapitre 4 : Étude d'un système supramoléculaire réversible dans des membranes complexes

4.1 Préface

Ayant démontré la possibilité de contrôler le processus de transport transmembranaire à l'aide des complexes d'inclusion dans des modèles simplifiés de membranes, nous nous sommes proposé d'étudier ce système réversible dans des cellules vivantes. Mes collègues et moi avons l'expérience nécessaire pour effectuer les tests dans des bactéries et des globules rouges humains. Un seul exemple de ce type de système avait été rapporté dans la littérature à ce moment. Wang et ses collègues ont démontré que l'activité antibactérienne d'un polymère pouvait être régulée par l'utilisation de macrocycles hôtes pour former des complexes d'inclusion et restaurée par un stimulus chimique : l'ajout d'un invité compétitif (figure 4.1).¹

Dans l'exemple présenté à la figure 4.1, le polymère cationique possédant une activité antibactérienne provoque la formation d'espèces réactive de l'oxygène (ROS). Lorsque le polymère forme un complexe d'inclusion avec des cucurbit[7]uriles (CB[7]), les ROS ne sont plus formés et l'activité antibactérienne du polymère est camouflée. L'activité antibactérienne du polymère est complètement restaurée par l'ajout d'un invité compétitif, l'amantadine qui possède une très grande affinité avec le CB[7]. C'est donc un exemple, très similaire à notre système présenté au chapitre 3, qui nous a encouragé sur la possibilité de démontrer le mécanisme d'action de ces transporteurs dans la membrane bactérienne et celle des globules rouges.

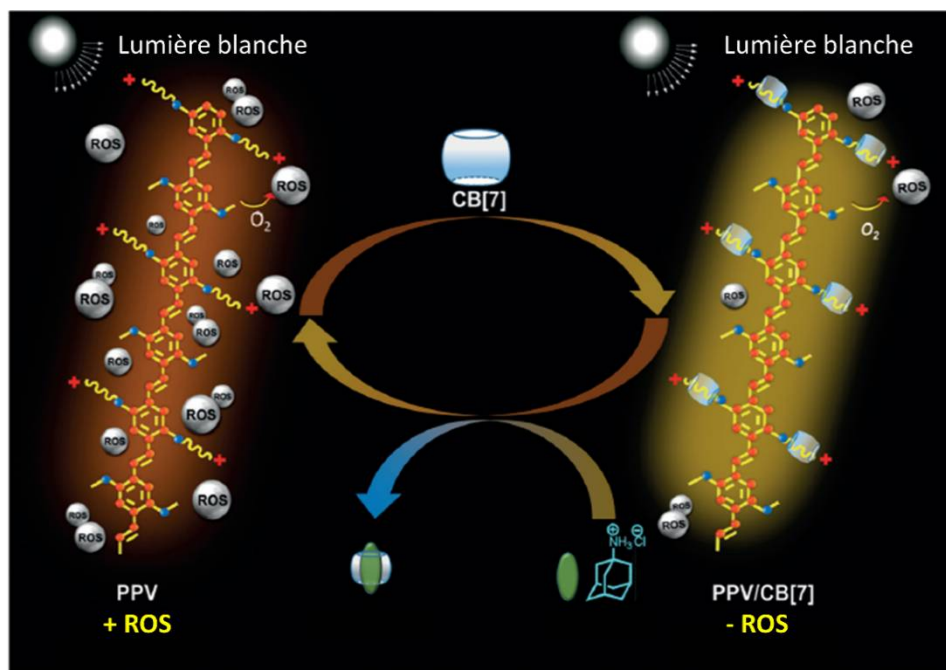


Figure 4.1 Assemblage supramoléculaire d'un polymère antibactérien et son désassemblage pour le contrôle réversible de la génération de ROS. Adapté avec permissions de la réf. 1. Copyright 2015, Wiley.

Ma contribution à l'article présenté au chapitre 4 a été l'élaboration du projet et des procédures, la synthèse du transporteur, la préparation des formulations à tester, les analyses LIVE/DEAD™ *BacLight*™ en spectroscopie et microscopie de fluorescence et la réalisation de la première version du manuscrit.

Claude-Rosny Élie en compagnie de sa stagiaire Michèle Khayat ont effectué les expériences de concentrations minimales inhibitrices sur les bactéries et ont déterminé l'activité hémolytique sur les globules rouges. Claude-Rosny Élie a aussi participé à la révision de la première version de l'article.

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

Les informations supplémentaires de cet article se trouvent en annexe aux pages 182 – 197 de cette thèse.

4.1.1 Concepts et méthodes utilisées

4.1.1.1 Expériences microbiologiques : détermination de la concentration minimale inhibitrice, de l'activité hémolytique et essai LIVE/DEAD™ BacLight™

Trois expériences typiques de microbiologie ont été utilisées dans ce chapitre. Tout d'abord, nous avons investigué la toxicité relative des composés étudiés dans les chapitres précédents, en déterminant la concentration minimale inhibitrice (MIC, de l'anglais : minimal inhibitory concentration) de la croissance d'une colonie de bactéries. La MIC correspond à la concentration la plus faible d'un composé qui empêche la croissance de bactéries dans un milieu de culture riche en nutriments. Ainsi, plus la MIC d'un composé est faible, meilleure est son activité antibactérienne.

La seconde expérience utilisée est la détermination de l'activité hémolytique des composés. Cette expérience, qui permet de mesurer la quantité d'hémoglobine libérée suite à la perméabilisation des membranes des globules rouges, donne une idée de la toxicité qu'aurait un composé sur ce type de cellules.

La troisième expérience, soit l'essai LIVE/DEAD™ BacLight™, sert à déterminer la perturbation de la membrane bactérienne induite par un composé. L'essai consiste à utiliser deux marqueurs d'acides nucléiques fluorescents (figure 4.2).

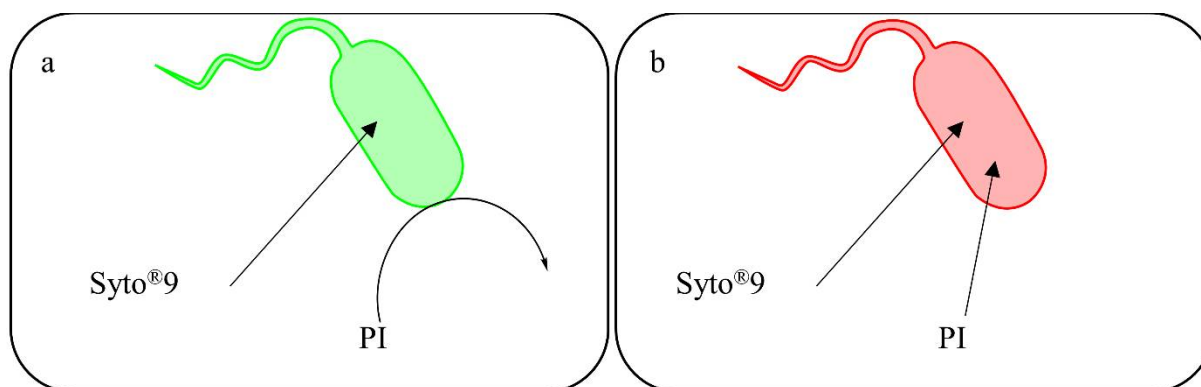


Figure 4.2 Fonctionnement de l'essai LIVE/DEAD™ BacLight™ : a) fluorescence verte induite par le marqueur Syto®9 sur une bactérie intacte, b) fluorescence rouge induite par l'iodure de propidium (PI) sur une bactérie à la membrane perturbée.

Tel que montré à la figure 4.2, Syto[®]9 est un marqueur d'acides nucléiques fluorescent qui pénètre la totalité des bactéries en solution, tandis que l'iodure de propidium ne peut pénétrer et marquer les acides nucléiques que des bactéries dont les membranes sont endommagées. Ainsi, l'intégrité de la membrane bactérienne, suite à l'incubation avec un composé la perturbant, peut être quantifiée en suivant le rapport bactérie vertes/rouges.

Article 3 : Host–guest strategy to potently camouflage and restore the activity and toxicity of drugs affecting bacterial growth and viability

Julien Gravel, Claude-Rosny Élie, Michèle Khayat and Andreea R. Schmitzer*

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

MedChemComm, **2016**, 7, 1128-1131

Adapted with minor corrections, with permission, from *MedChemComm*, Julien Gravel, Claude-Rosny Élie, Michèle Khayat and Andreea R. Schmitzer, “Host–guest strategy to potently camouflage and restore the activity and toxicity of drugs affecting bacterial growth and viability”, **2016**, 7, 1128-1131.

4.2 Abstract

We demonstrate the application of a controllable drug delivery system, where an active and toxic imidazolium salt can be camouflaged when assembled as an inclusion complex with cyclodextrins. The toxicity can be completely restored in the presence of a competitive non-toxic guest. The reversibility of this system is demonstrated both in living bacteria and human red blood cells.

4.3 Introduction

The strategies of drug delivery have changed dramatically in the last few decades and even greater changes are anticipated in the near future. Biomedical advances have not only substantially contributed to our understanding of the physiological barriers to efficiently deliver drugs – such as transport and drug movement through cells and tissues – they have also contributed to the development of a number of new modes of drug delivery that have entered clinical practice.^{2,3}

However, even with all of these advances, many potent medications have unacceptable side effects due to the drug interacting with parts of the body that are not the target of the drug. Side effects limit our ability to design optimal medications for many diseases such as cancer, neurodegenerative diseases, and infectious diseases.⁴⁻⁶ An important approach in this regard is the use of a combination of cyclodextrins as a delivery system. The utility of cyclodextrin-based carriers like liposomes,^{7,8} niosomes,^{9,10} nanoparticles,¹¹ micelles¹² and millirods^{13,14} has been demonstrated many times. These systems are based on cyclodextrin complexation to camouflage the undesirable properties of the drugs and usually lead to a synergistic or additive effect. Moreover, cyclodextrins and their derivatives can be used as carriers of antibacterial drugs because of their ability to recognize specific cellular receptors such as lectins located at the bacterial cell surface.^{15,16}

Once accumulated at the surface of the bacteria, an important aspect of triggering the antibacterial properties is the possibility of quickly displacing the drug from the cyclodextrin complex. We demonstrate here a controllable drug delivery system that can be obtained between

an antibacterial imidazolium salt, β -cyclodextrin and a competitive non-toxic guest. Delivered as an inclusion complex with the cyclodextrin, the drug is completely non-toxic to human cells or to bacteria, but once the competitive guest is added, its antibacterial properties are entirely restored.

Wang and coworkers recently demonstrated the supramolecular assembly and disassembly of a cationic poly(phenylenevinylene) derivative (PPV) with cucurbit[7]uril to regulate its different interactions with bacteria.¹ We previously demonstrated the ability to modulate the activity of synthetic ion transporters in the presence of macrocycles such as cyclodextrin or cucurbituril.^{17,18} We reported the possibility of blocking the penetration of 1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide (**4.1**) in the phospholipid membranes of liposomes by the formation of an inclusion complex with β -cyclodextrin (β CD). Anion transport assays and black lipid membrane experiments showed the inhibition of the activity of the chloride transporter **4.1** when combined with β CD.¹⁸ The displacement of **4.1** from the **4.1**:(β CD)₂ complex in the presence of 1-adamantaneethanol as the competitive guest (CG) resulted in the entirely restored ion transport activity of **4.1**. Developing this rationale further, we demonstrate here the possibility of using such a reversible system in living organisms, and show its application in a biological environment. Herein we present the antibacterial properties of **4.1**, its inactivation when complexed with β CD and the reactivation of its antibacterial properties by the addition of a CG (figure 4.3).

4.4 Results and discussion

The fight against antibiotic-resistant bacteria is one of the most worrying threats of the 21st century. According to a recent government report by the Centers for Disease Control and Prevention, each year more than 2 million Americans are infected with antibiotic-resistant strains and 23 000 people die as a consequence.¹⁹ Whereas resistant Gram-negative bacteria were a major concern in previous years, over the last few years a dramatic increase in the resistance of Gram-positive bacteria has occurred.²⁰ In this respect, we started by investigating the capacity of **4.1** to inhibit the bacterial growth of a Gram-positive *Bacillus thuringiensis* strain.

Firstly, a suspension of *B. thuringiensis* was incubated with different concentrations of **4.1** in a 96-well plate. The minimal inhibitory concentration (MIC) of **4.1** for *B. thuringiensis* was established at 4 μM (in annex, figure A3.1, p. 184). At this concentration, the bacterial growth (followed by optical density ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) measurements at 600 nm) was inhibited and a slight decrease was even observed, possibly due to the bactericidal effect of **4.1** on the initial inoculate. Secondly, *B. thuringiensis* was incubated with a mixture of **4.1** and βCD as the **4.1:(βCD)₂** preformed complex and $\text{OD}_{600\text{nm}}$ measurements were performed to determine the MIC value. A drastic alteration of the antibacterial activity of the **4.1:(βCD)₂** complex was observed, as the MIC increased to 32 μM , eight times higher than the MIC of **4.1** alone (in annex, figure A3.6, p. 186). Thirdly, *B. thuringiensis* was incubated with the **4.1:(βCD)₂** pre-formed complex to which the **CG** was added. The MIC value of this mixture was established in this case at 8 μM , only two times higher than the MIC of **4.1** alone (the antibacterial activity of the imidazolium salt **4.1** is not entirely restored when the competitive guest is added as a certain amount of **4.1** remains complexed with the cyclodextrin).

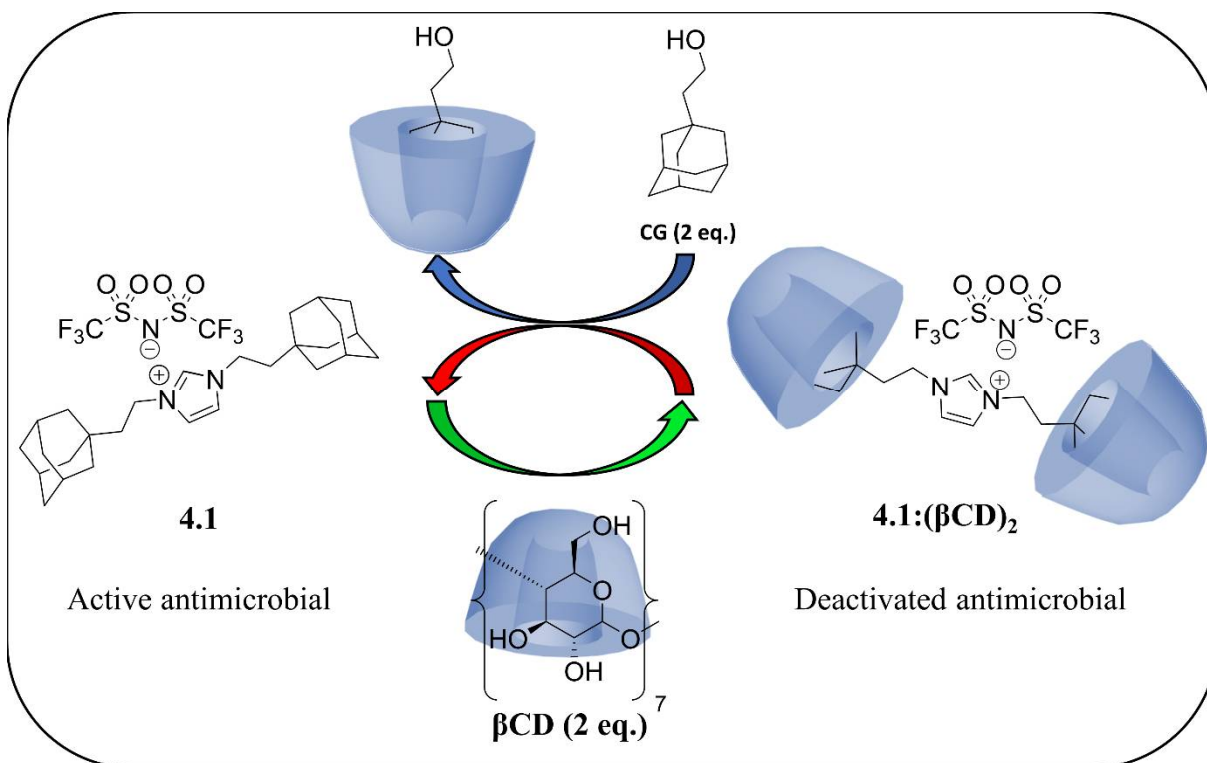


Figure 4.3 Deactivation of the antibacterial properties of **4.1** by the formation of **4.1:(βCD)₂** inclusion complex and reactivation of its biological activity by the addition of a competitive guest.

A different way to monitor the antibacterial properties of **4.1**, **4.1:(β CD)₂** and **4.1:(β CD)₂:CG** is to monitor the bacterial growth at a constant concentration (8 μ M), superior to the MIC of **4.1** alone (figure 4.4). At this concentration, **4.1** completely stops bacterial growth, whereas the **4.1:(β CD)₂** complex does not affect at all the bacterial proliferation. However, the addition of the **CG** to the preformed **4.1:(β CD)₂** complex results in the entire inhibition of the antibacterial growth.

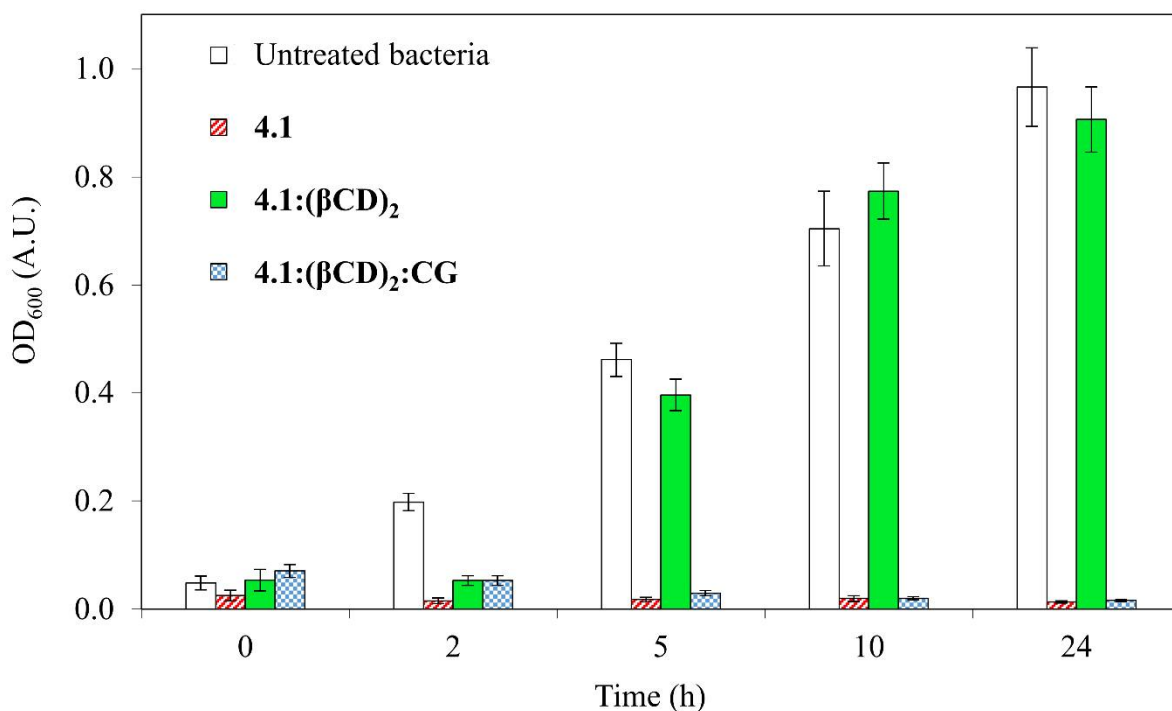


Figure 4.4 Bacterial growth for *B. thuringiensis* treated with **4.1**, **4.1:(β CD)₂** and **4.1:(β CD)₂:CG**. Concentrations of **4.1** are fixed at 8 μ M. Error bars show standard deviation.

Having shown that the bactericidal activity of **4.1** can be reversibly deactivated when the **4.1:(β CD)₂** inclusion complex is formed, we investigated the mechanism of action of the whole system on *B. thuringiensis*. We previously demonstrated that the bactericidal activity of benzimidazolium salts was due to the permeabilization of *E. coli* bacterial membranes, leading to the leakage of the cellular content and bacterial death.²¹ We assessed the membrane integrity of *B. thuringiensis*, using the LIVE/DEAD *BacLight*TM bacterial viability assays. The

fluorescent LIVE/DEAD *BacLight*TM bacterial viability assay (Molecular Probes, Inc.) consists of using two distinct dyes: the green fluorescent nucleic acid stain Syto[®]9, which stains the nucleic acids of both living and dead bacteria, and the traditional red fluorescent nucleic acid stain propidium iodide (PI), which does not enter bacteria that have intact cell membranes and thus only stains bacteria that have damaged and leaky membranes. When properly mixed into a bacterial suspension, live bacteria fluoresce in green whereas dead bacteria fluoresce in red. Therefore, the green to red fluorescence ratio is indicative of the integrity of the bacterial membrane in a bacterial population.

The integrity of the membrane of *B. thuringiensis* after incubation for 2 hours with **4.1**, **4.1:(β CD)₂** and **4.1:(β CD)₂:CG** was monitored by fluorescence spectroscopy (figure 4.5) and microscopy (figure 4.6). Calibration and control experiments for the membrane integrity assays are described in the annex (figures A3.8 – A3.16, pp. 189 – 194).

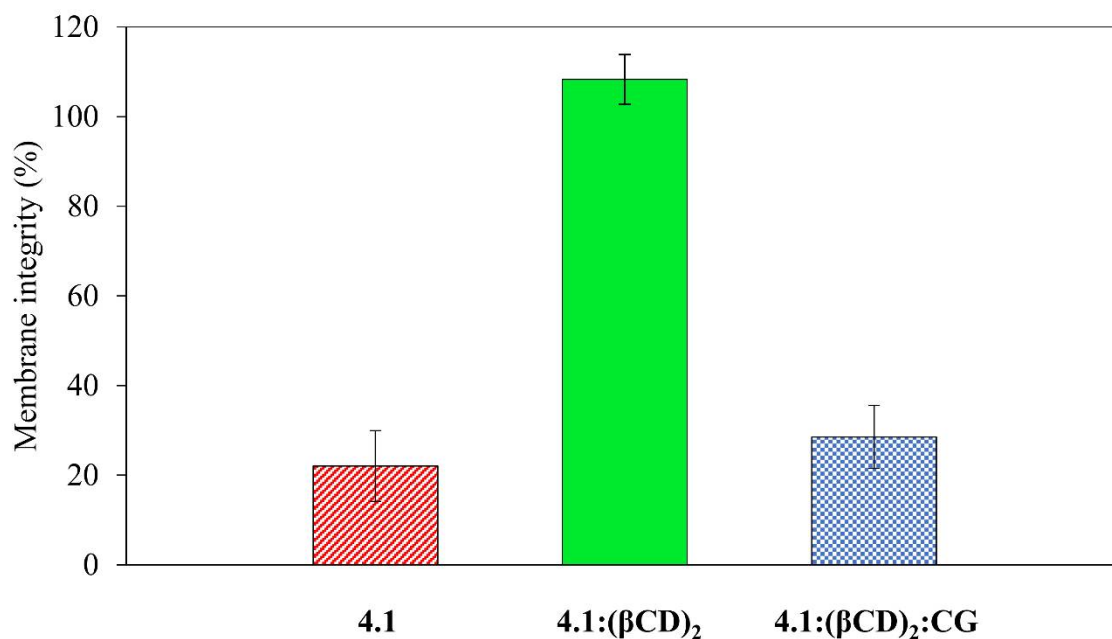


Figure 4.5 Membrane integrity assays of *B. thuringiensis* treated with **4.1**, **4.1:(β CD)₂** and **4.1:(β CD)₂:CG**. Concentrations of **4.1** are fixed at 20 μ M. Error bars show standard deviation.

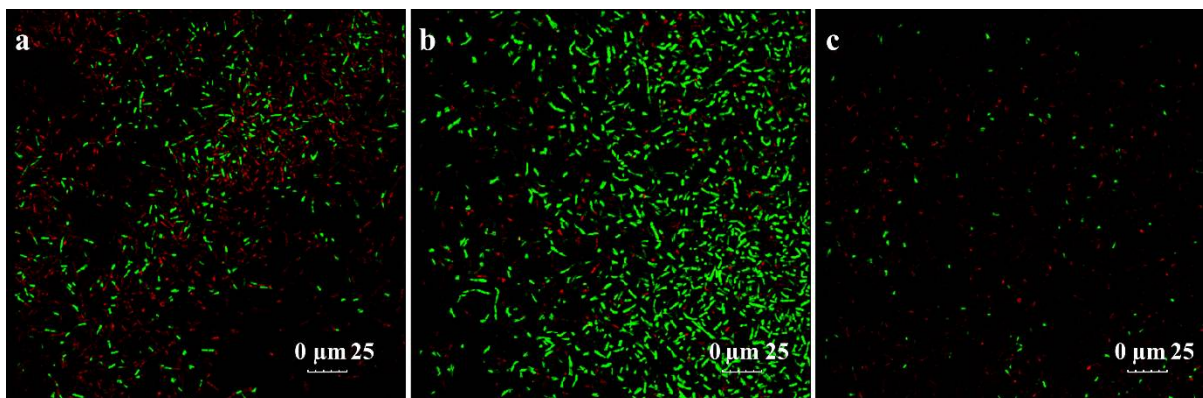


Figure 4.6 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* using the BacLight™ stains after incubation for 3 hours with: a) **4.1**, b) **4.1:(β CD)₂**, c) **4.1:(β CD)₂:CG**. Concentrations of **4.1** are fixed at 20 μ M for each assay.

While β CD or CG alone do not affect the integrity of *B. thuringiensis*, **4.1** obviously weakens it. After a 2 hour incubation with 4 μ M of **4.1** (which corresponds to the MIC value), only 54 % of *B. thuringiensis* still present cellular membrane integrity. By increasing the concentration of **4.1** to 20 μ M, the observed permeabilization is more pronounced; the bacterial population possessing a non-damaged membrane decreases to 22 %, demonstrating that the disruption of the cellular membrane is responsible for the inhibition of bacterial growth. The **4.1:(β CD)₂** complex shows absolutely no alteration of the bacterial membrane. Finally, the release of **4.1** from the **4.1:(β CD)₂** complex by adding the CG results in membrane permeabilization, as the membrane integrity drops back to 28 %. We demonstrated here that the membrane integrity of *B. thuringiensis* can be controlled by regulating the release of the antibacterial **4.1** from the inactive **4.1:(β CD)₂** complex using host–guest competitive interactions.

As mentioned in the introduction section, one of the exquisite properties of cyclodextrins is their ability to camouflage certain properties of a guest molecule while an inclusion complex is formed. We show here that this supramolecular approach can also be used to modulate the transient toxicity of **4.1** to human red blood cells (HRBCs) (figure 4.7).

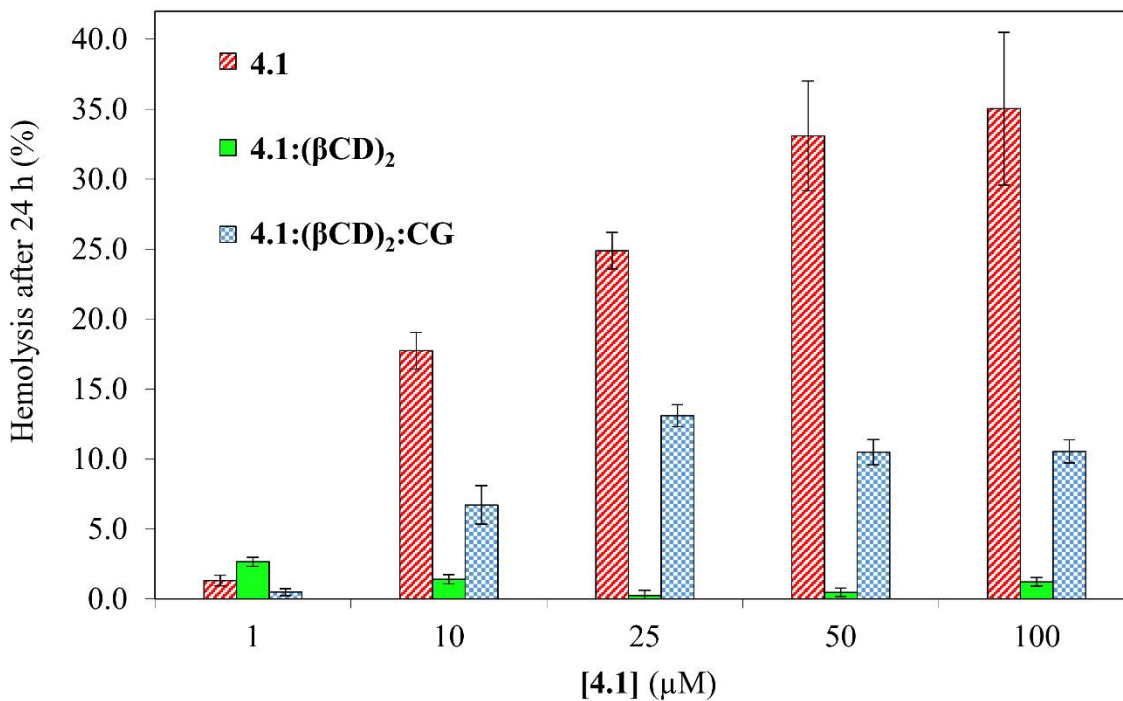


Figure 4.7 Hemolytic activities of **4.1**, **4.1:(βCD)₂** and **4.1:(βCD)₂:CG** after 24 hours. Concentrations are shown with respect to **4.1**. Error bars show standard deviations.

An important property of antibacterials is not just their antibacterial activity, but also their lack of toxicity to human cells (i.e., selectivity). As previously mentioned, a lot of highly active drugs have unacceptable side effects due to their interactions with parts of the body that are not the target of the drug. If a toxic antibacterial can be transported to its target site as an inactive supramolecular complex and specifically released in the presence of a competitive guest only at a specific location, a switchable selectivity can be envisaged to be obtained.

At concentrations ranging from 10 to 100 μM, **4.1** induces between 15 and 35% hemolysis of HRBCs after 24 hours. The toxicity of the **4.1:(βCD)₂** complex towards HRBCs is absolutely negligible, demonstrating the ability of the cyclodextrin to mask the toxicity of **4.1**. When the competitive guest (**CG**) is added to the supramolecular complex, the hemolytic rate increases to about 10%, demonstrating the release of the toxic compound **4.1**. Control experiments for the hemolytic activities are described in the annex (figures. A3.17 and A3.18, pp. 195 – 196).

4.5 Conclusion

In conclusion, we have successfully demonstrated the application of a supramolecular approach to competitively displace an antibacterial compound from its inactive form as an inclusion complex with β -CD in Gram-positive *B. thuringiensis*. Antimicrobial assays and membrane integrity studies performed with **4.1**, **4.1:(β CD)₂** and **4.1:(β CD)₂:CG** allow us to demonstrate the capacity of this system to properly modulate the antibacterial activity of a compound using supramolecular approaches. Toxicity tests on human red blood cells were performed to assess the impact of the antimicrobial supramolecular switch on healthy mammalian cells. The supramolecular complex as the deactivated form of the antibacterial salt is nonhemolytic to human red blood cells.²² This model opens the door to a new strategy for controlling the active and inactive forms of powerful antibiotics whose side effects could be reduced. Their antibacterial activity can be activated specifically at the site of infection by addition of the competitive guest that triggers the antibacterial activity.

4.6 Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Université de Montréal for the financial support (JG, CRE and MK were NSERC scholars and ARS was the PI for grant 262970). We thank professors J. N. Pelletier and K. J. Wilkinson for the bacterial strains and access to their instruments. We also thank Le Centre Régional de RMN and Le Centre Régional de Spectrométrie de masse of the Université de Montréal.

4.7 References

- (1) Bai, H.; Yuan, H.; Nie, C.; Wang, B.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13208-13213.
- (2) Langer, R.; Peppas, N. A. *AIChE J.* **2003**, *49*, 2990-3006.
- (3) Park, K. *J. Control. Release* **2016**, *240*, 2-8.

- (4) Carr, A.; Cooper, D. A. *Lancet* **2000**, *356*, 1423-1430.
- (5) Youdim, M. B.; Buccafusco, J. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 27-35.
- (6) Florea, A. M.; Busselberg, D. *Cancers* **2011**, *3*, 1351-1371.
- (7) McCormack, B.; Gregoriadis, G. *Int. J. Pharm.* **1994**, *112*, 249-258.
- (8) McCormack, B.; Gregoriadis, G. *J. Drug Target* **1994**, *2*, 449-454.
- (9) D'Souza, S. A.; Ray, J.; Pandey, S.; Udupa, N. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 145-149.
- (10) Oommen, E.; Tiwari, S. B.; Udupa, N.; Kamath, R.; Uma Devi, P. *Indian J. Pharmacol.* **1999**, *31*, 279-284.
- (11) Memişoğlu, E.; Bochot, A.; Şen, M.; Duchêne, D.; Hıncal, A. A. *Int. J. Pharm.* **2003**, *251*, 143-153.
- (12) Zheng, S.; Xie, Y.; Li, Y.; Li, L.; Tian, N.; Zhu, W.; Yan, G.; Wu, C.; Hu, H. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 55-66.
- (13) Wang, F.; Blanco, E.; Ai, H.; Boothman, D. A.; Gao, J. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 2309-2319.
- (14) Wang, F.; Saidel, G. M.; Gao, J. *J. Control. Release* **2007**, *119*, 111-120.
- (15) Attioui, F.; Al-Omar, A.; Leray, E.; Parrot-Lopez, H.; Finance, C.; Bonaly, R. *Biol. Cell* **1994**, *82*, 161-167.
- (16) Kassab, R.; Felix, C.; Parrot-Lopez, H.; Bonaly, R. *Tet. Lett.* **1997**, *38*, 7555-7558.
- (17) Elie, C. R.; Noujeim, N.; Pardin, C.; Schmitzer, A. R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1788-1790.
- (18) Gravel, J.; Kempf, J.; Schmitzer, A. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 18642-18648.
- (19) Lepri, S.; Buonerba, F.; Goracci, L.; Velilla, I.; Ruzziconi, R.; Schindler, B. D.; Seo, S. M.; Kaatz, G. W.; Cruciani, G. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 867-891.
- (20) Liapikou, A.; Cilloniz, C.; Mensa, J.; Torres, A. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2015**, *32*, 137-143.
- (21) Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2358-2366.
- (22) Amin, K.; Dannenfelser, R. M. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1173-1176.

Chapitre 5 : Mise au point d'un essai pour quantifier la perméabilisation de l'enveloppe bactérienne à Gram négatif

5.1 Préface

Pendant les études présentées dans le chapitre précédent, nous nous sommes rendus compte que nous avons besoin d'une méthode pour quantifier en temps réel et aisément la perméabilisation des membranes bactériennes induite par les transporteurs développés dans notre groupe. Contrairement à l'essai LIVE/DEAD™ *BacLight*™, qui demande une période d'incubation des composés altérant la membrane bactérienne avant de pouvoir faire une lecture et la comparer à une courbe d'étalonnage, nous nous sommes intéressés à l'essai développé par Lehrer *et al.* dans les années 1980, qui nous semblait la méthode de choix pour le suivi en temps réel de la perméabilisation de la membrane bactérienne. Cet essai est une méthode spectroscopique qui permet de suivre l'activité enzymatique d'une enzyme cytosolique, la β -galactosidase, surexprimée dans des bactéries *E. coli*. En suivant l'hydrolyse du marqueur *ortho*-nitrophényl- β -galactoside (ONPG), la cinétique enzymatique est reliée à la perméabilisation de la membrane interne des bactéries à Gram négatif.¹ Comme il s'agit d'une enzyme cytosolique, cet essai était considéré comme étant spécifique à la membrane interne des bactéries à Gram négatif et était toujours concurremment effectué avec une expérience spécifique à la membrane externe. Pendant l'utilisation de cet essai pour quantifier la perturbation des membranes bactériennes, nous nous sommes rendu compte que des informations supplémentaires, qui n'avaient jamais été extraites de cet essai, pouvaient être obtenues. Ce chapitre présente donc comment nous avons adapté cet essai, à l'aide de procédures expérimentales précises et d'un nouveau traitement mathématique des données, en utilisant le benzalkonium chloride, le QAC le plus largement utilisé dans la vie de tous les jours, comme agent perturbateur de la membrane.

Ma contribution à cet article présenté au chapitre 5 a été l'élaboration du projet et des procédures expérimentales, la totalité du travail expérimental ainsi que la rédaction de la première version du manuscrit.

Prof. Catherine Paradis-Bleau m'a accueilli dans son laboratoire pour les manipulations de microbiologie et a participé à la révision du manuscrit.

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

Les informations supplémentaires de cet article se trouvent en annexe aux pages 198 – 215 de cette thèse.

5.1.1 Concepts et méthodes utilisées

5.1.1.1 Méthodes pour déterminer la perméabilisation des membranes bactériennes

Deux méthodes ont été utilisées dans ce chapitre pour déterminer la perméabilisation de la membrane bactérienne. Le premier est considéré comme spécifique à la membrane interne de la bactérie et relie l'activité de la β -galactosidase cytosolique à l'hydrolyse de l'ONPG en *ortho*-nitrophénol (ONP), à la perméabilisation de la membrane induite par un agent perturbateur (figure 5.1).

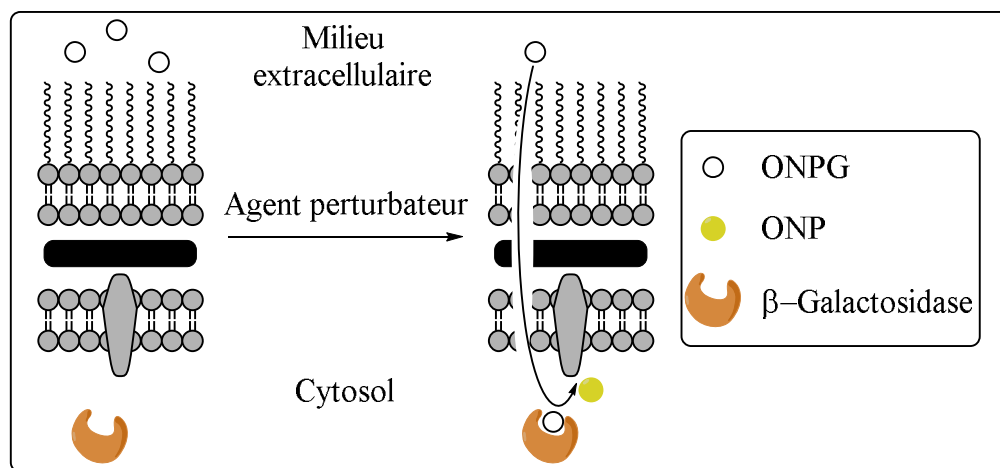


Figure 5.1 Perméabilisation de la membrane bactérienne : hydrolyse de l'ONPG en ONP en présence d'un perturbateur membranaire.

La figure 5.1 montre un des scénarios possibles pour que l'hydrolyse de l'ONPG en ONP ait lieu. L'agent perturbateur doit perméabiliser les deux membranes, externe et interne, pour permettre le passage d'une molécule d'ONPG dans le cytosol, qui est ensuite hydrolysé en ONP et galactose. Un second scénario possible est la perturbation des membranes à un point tel que l'enzyme, la β -galactosidase, est relarguée à l'extérieur de la bactérie et réagit avec l'ONPG dans l'environnement extracellulaire. Avec ces deux scénarios en tête, nous avons émis l'hypothèse de pouvoir exploiter les données différemment, en utilisant un traitement mathématique adapté, pour observer la perméabilisation de chacune des membranes de la bactérie à Gram négatif.

Ainsi, pour vérifier cette hypothèse, nous avons conjointement effectué une expérience spécifique à la membrane externe : l'essai à la *N*-phényl-1-naphtylamine (NPN) (figure 5.2). La NPN est une sonde fluorescente possédant un rendement quantique élevé lorsqu'elle se trouve dans un milieu hydrophobe, mais est très peu fluorescente dans un milieu aqueux. Comme montré dans la figure 5.2, la NPN est largement exclue des membranes des bactéries à Gram négatif car elle est repoussée par les lipopolysaccharides. Toutefois, son insertion dans la membrane peut avoir lieu si un agent perturbateur de la membrane est utilisé et peut être suivie par fluorescence.

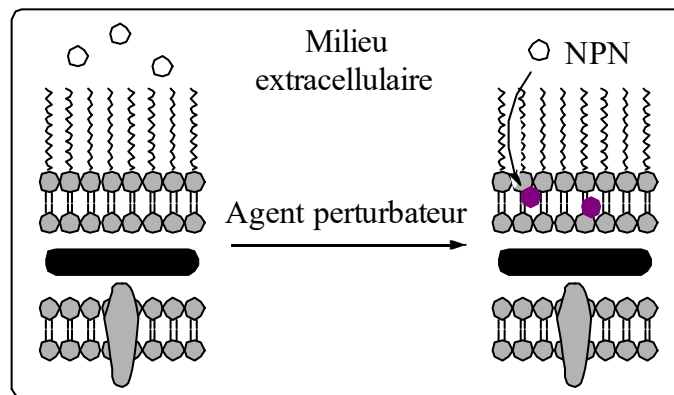


Figure 5.2 Détermination de la perméabilisation de la membrane externe d'une bactérie par l'observation de l'insertion de la *N*-phényl-1-naphtylamine (NPN).

Article 4 : Adaptation of a bacterial membrane permeabilization assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride as a membrane-disrupting agent

Julien Gravel, Catherine Paradis-Bleau and Andreea R. Schmitzer*

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

MedChemComm, **2017**, 8, 1408-1413

Adapted with minor corrections, with permission, from *MedChemComm*, Julien Gravel, Catherine Paradis-Bleau and Andreea R. Schmitzer, “Adaptation of a bacterial membrane permeabilization assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride as a membrane-disrupting agent”, **2017**, 8, 1408-1413.

5.2 Abstract

We describe the use of the *ortho*-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) assay developed by Lehrer *et al.* to which a new mathematical data treatment was applied. In this simplified assay, only one enzymatic assay is needed to provide direct evidence of the kinetics of *Escherichia coli* membrane permeabilization induced by different concentrations of benzalkonium chloride (BAC). Analysis of the data obtained from the revised ONPG assay with our adapted mathematical formula indicates that BAC induces permeabilization of the bacterial outer and inner membranes in a two-step process. The two effective concentration (EC_{50}) values obtained in this study, combined with the results from an outer membrane permeabilization assay, suggest that the two steps observed in the permeabilization process are related to the two different bacterial membranes. We show that membrane permeabilization occurs very fast upon the addition of bacterial cells to the BAC solutions and demonstrate that sub-lethal concentrations of BAC disturb the integrity of the Gram-negative bacterial membranes. Overall, our work broadens our knowledge on the mode of action of BAC on bacterial cells and emphasizes that BAC, and quaternary ammonium compounds in general, should not be used at sub-lethal concentrations in order to lower the risk of bacterial tolerance and resistance to antibiotics.

5.3 Introduction

The emergence of antibiotic resistance is a serious worldwide threat, primarily due to the widespread use of antibiotics.² Quaternary ammonium compounds (QACs) are topical antibacterial compounds that permeabilize bacterial membranes.³ QACs are active both on Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens.⁴ While Gram-positive bacterial cells are surrounded by an inner membrane and a thick layer of cell wall, Gram-negative bacterial cells are protected by a more complex and impermeable envelope. This envelope contains an inner membrane made of a phospholipid bilayer with incorporated and associated proteins, a thin layer of cell wall mainly constituted of a network of polysaccharides and peptides called peptidoglycan, and an asymmetric outer membrane containing phospholipids in its inner leaflet, lipopolysaccharides in its outer leaflet and also harboring proteins such as porins.⁵ This multi-

layered structure forms a physical barrier that renders Gram-negative bacterial cells naturally resistant to many antibacterial agents.^{6,7}

QACs have been actively deployed since the 1930s and are now widely used in hospitals, industry and cosmetics.⁸ They have played a major role in reducing the number of bacterial infections through effective hygiene. However, the widespread and inappropriate use of QACs could compromise their effectiveness.^{9,10} This is a general concern based on the association between the use of low doses of antimicrobial agents and their potential to select for less sensitive bacteria that can eventually also become resistant to other antibiotics.^{8,11,12} Most QAC formulations do not require rinsing with water after application. Bacterial cells thus remain exposed to small concentrations of QACs over long periods of time. Long-term exposure to a QAC selects for the survival of bacterial clones that are more resistant and that could only be treated effectively with higher doses of the antimicrobial agent.¹³ Several studies have shown that exposure to sub-inhibitory concentrations of biocides can change the antimicrobial susceptibility of bacterial cultures.¹⁰ Changes in the minimum inhibitory concentrations (MICs) of QACs have often been associated with the acquisition or hyperexpression of plasmid-encoded multi-drug efflux pumps (i.e. QAC genes).¹⁴ Such efflux pumps can actively secrete QACs through the bacterial envelope and release them into the extracellular environment, thereby reducing their effectiveness. These multi-drug efflux pumps have also been associated with changes in the MIC of therapeutically important third-party antibiotics that are substrates of the pumps.¹⁵ Long-term exposure to sub-MICs of QACs could thus be the preoccupying selective pressure that drives the emergence of multi-resistant bacterial clones.¹⁵

The most common QAC is benzalkonium chloride (**BAC**), a mixture of alkyl-benzyl-dimethyl-ammonium chlorides with various alkyl chains, typically ranging from 8 to 18 carbons (figure 5.3).¹⁶

The antibacterial effect of **BAC** was proposed to be based on the association between the positively charged quaternary nitrogen and the negatively charged polar groups of acidic phospholipids in bacterial membranes.¹⁷ This association would drive the integration of the hydrophobic tail of **BAC** into the bacterial membrane, at the level of the hydrophobic fatty acids of phospholipids. At high concentrations, **BAC** solubilizes hydrophobic membrane components

by forming micellar aggregates.⁴ The antibacterial activity of **BAC** may also involve the disruption and denaturation of structural membrane proteins.¹⁸

The outer membrane of Gram-negative bacterial cells constitutes a semi-permeable barrier that prevents many otherwise effective antibacterial agents from reaching their molecular targets in bacteria.^{6,7} The action of QACs on bacterial cells alters the permeability of the outer membrane and thus affects their antibiotic susceptibility. Restricted outer membrane permeability works in synergy with co-determinant resistance mechanisms, such as active efflux mechanisms, bringing about antibiotic resistance.¹⁹ QACs also permeabilize the bacterial inner membrane, and the overall effect generated by sub-lethal concentrations of QACs on the bacterial envelope contributes to broad-spectrum antibiotic resistance.¹⁵ The most influential factors that impact the emergence of resistance to QACs, and especially to **BAC**, are the kinetics of the treatment, the time of exposure to the drug, the quantity of bacterial cells, and their growth conditions. Although *in vitro* assays with phospholipids and artificial membranes provide valuable information on the antibacterial activity of QACs,³ studying the effects of QACs on bacterial cells is necessary to get a better understanding of their impact on bacterial membranes and their contribution to the development of antibiotic resistance. To reach this goal, we quantitatively evaluated the effect of **BAC** on bacterial membranes at sub-lethal concentrations or around its MIC over time.

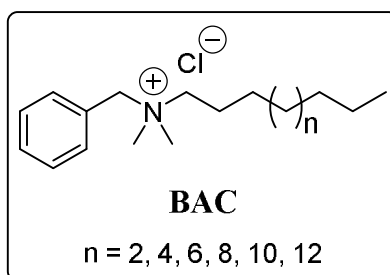


Figure 5.3 Chemical structure of benzalkonium chloride (**BAC**).

Lehrer *et al.* developed a dual spectrophotometric assay to measure the permeabilization of bacterial membranes. They studied the permeabilization of the Gram-negative outer membrane according to the activity of a constitutively expressed β -lactamase enzyme present in the periplasmic space, sandwiched between the outer and inner membranes. This assay is based upon a β -lactamase substrate that is impermeable to the other membrane.¹ They simultaneously monitored the permeabilization of the bacterial inner membrane as the chromogenic substrate *ortho*-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) diffuses through the phospholipid barrier in the absence of the galactoside permease LacY and is hydrolyzed to *ortho*-nitrophenol (ONP) by the constitutively expressed cytoplasmic β -galactosidase enzyme LacZ.¹ In this assay, ONPG has to cross first the outer membrane through non-specific porins before passing through the inner membrane to access cytoplasmic LacZ.

Here, we hypothesized that Lehrer's assay can be adapted for the study of both outer and inner membrane permeabilization kinetics using an appropriate protocol and mathematical data treatment to analyse ONPG hydrolysis data. We developed this optimized assay in a wild-type strain of the bacterium *Escherichia coli*, a recognized model system to study the Gram-negative bacterial envelope. The wild-type strain *E. coli* MG1655 contains the native lactose operon, including the gene coding for the inner membrane galactoside permease LacY.

The mathematical treatment we propose here is based on the standardization of each kinetic experiment using a maximal and minimal enzymatic reaction rate of ONPG hydrolysis. Lehrer *et al.* demonstrated that bacterial cell lysis by sonication is the most efficient way to measure the total activity of the β -galactosidase LacZ.²⁰ We thus used this method to lyse bacterial cells and release the entire pool of cytoplasmic β -galactosidase into the extracellular medium in order to obtain the maximal enzymatic rate of ONPG hydrolysis. Each experiment was standardized using equation (5.1). This ensures that native levels of passive diffusion and potential active transport of ONPG through the bacterial membranes are not taken into account. Reaction rates were determined as the slope of the curve for the first 360 s of ONPG hydrolysis. It should be noted that, in our assay, bacterial cells were added to the ONPG-containing buffer immediately prior to data acquisition. Under these conditions, the concentration of ONPG in the periplasmic space can be considered as null and ONPG must pass through both the outer and inner membranes to be in contact with the cytoplasmic β -galactosidase enzyme for hydrolysis

to occur. Each curve presented in this article thus represents the kinetics of the enzymatic hydrolysis of ONPG in ONP induced by the presence of a membrane-permeabilizing agent.

$$RRr (\%) = \frac{RR_x - RR_0}{RR_{max} - RR_0} \quad (5.1)$$

Where: RR_x is the reaction rate of ONPG hydrolysis at [permeabilizing agent] = x; RR_0 is the reaction rate of ONPG in the absence of a permeabilizing agent; RR_{max} is the reaction rate of ONPG hydrolysis in the cellular lysate; and RRr is the reaction rate ratio.

5.4 Results and discussion

Our adapted membrane permeabilization assay was first tested by monitoring the enzymatic hydrolysis of ONPG at different concentrations of polymyxin B (in annex, figure A4.6, p. 205). Polymyxin B is a cationic nonapeptide known to increase the permeability of the bacterial outer membrane by interacting with the lipopolysaccharide components.²¹ The MIC value of polymyxin B has been previously reported to be $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the strain *E. coli* IH3080 (EM40),²² but it was shown that polymyxin B permeabilizes the bacterial outer membrane at concentrations from 0.3 to $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.²¹ To measure the MIC of polymyxin B for the wild-type strain *E. coli* MG1655, bacterial cells were incubated with different concentrations of polymyxin B and the MIC was determined as the lowest concentration that inhibited bacterial growth at 37 °C. The MIC of polymyxin B for *E. coli* MG1655 was established to be $5 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Lehrer *et al.* demonstrated that polymyxin B treatment leads to a maximal readout for β -lactamase activity, whereas it did not have a significant effect on β -galactosidase activity in their assay.¹ Studying the dose–response relationship of polymyxin B with our adapted assay and mathematical data treatment showed a concentration-dependent rate of ONPG hydrolysis that does not exceed 40%, even at 60-fold its MIC (figure 5.4).

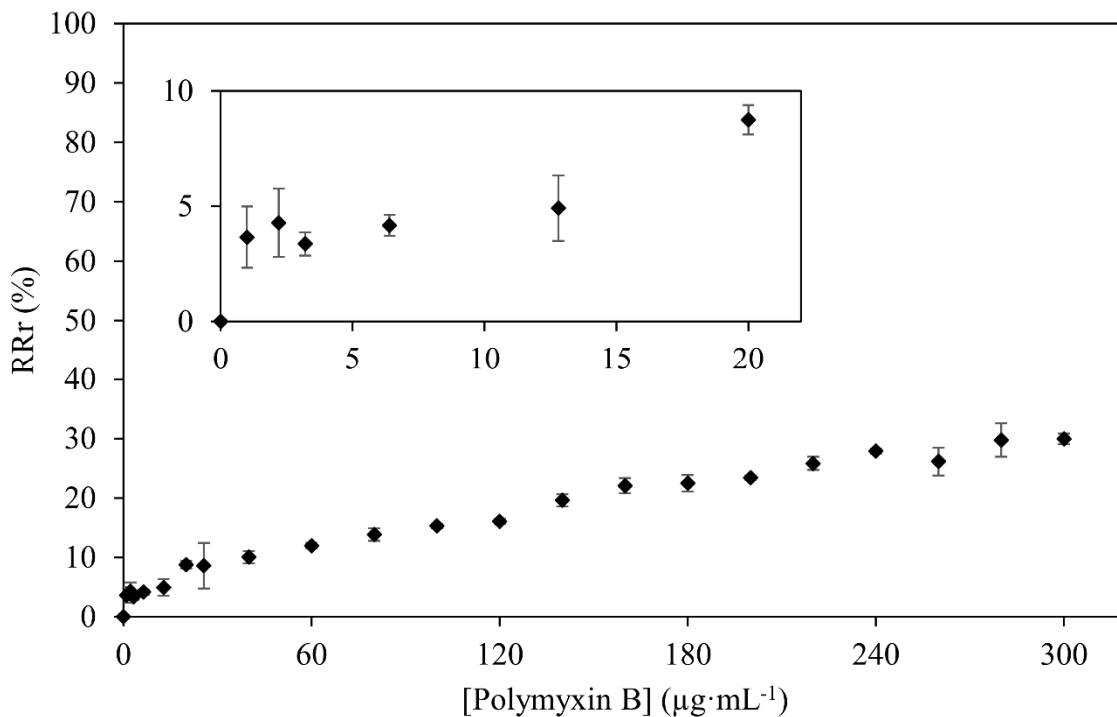


Figure 5.4 Dose-response relationship between the concentration of polymyxin B and the ONPG hydrolysis rate for a bacterial population of 7.2×10^7 colony forming units (CFU)·mL⁻¹ ($OD_{600nm} = 0.27$). The inserted box represents a zoom of the sub-MIC concentrations.

As mentioned before, the initial ONPG concentration in the bacterial periplasm should be null in our assay. The monitored reaction observed with polymyxin B is thus probably related to the destabilization of the outer membrane that directly facilitates the influx of ONPG in the periplasm and further indirectly increases ONPG access to the cytoplasm. The reaction rate must be limited by the passage of ONPG through the inner membrane.

The MIC of **BAC** for the wild-type strain *E. coli* MG1655 was determined to be 45 ± 5 µg·mL⁻¹. Kinetics of ONPG hydrolysis in real time, upon the exposure of *E. coli* cells to **BAC**, revealed key information about the permeabilization process. With the mathematical approach that we described above, we were able to determine the minimal **BAC** concentration that has an immediate effect on the bacterial envelope. This concentration of **BAC** is below the MIC; it does not inhibit bacterial growth nor kill bacterial cells. However, exposure to this sub-

lethal concentration of **BAC** has a membrane-permeabilizing effect and might thus give rise to resistant bacterial clones.

E. coli membrane permeabilization was observed by monitoring the enzymatic hydrolysis of ONPG at different concentrations of **BAC** (in annex, figures A4.7 – A4.11, pp. 205 – 207). While membrane permeabilization by polymyxin B was observed as a one-step process (figure 5.4), all the curves obtained for **BAC** show a biphasic dose–response function. This indicates that the permeabilization process induced by **BAC** is a two-step process. The inflexion points of each phase of the curve in figure 5.5, also called effective concentrations (EC_{50}), were calculated using the biphasic dose–response function analysis implemented in OriginPro 8. The results are reported in figure 5.5 and table 5.1.

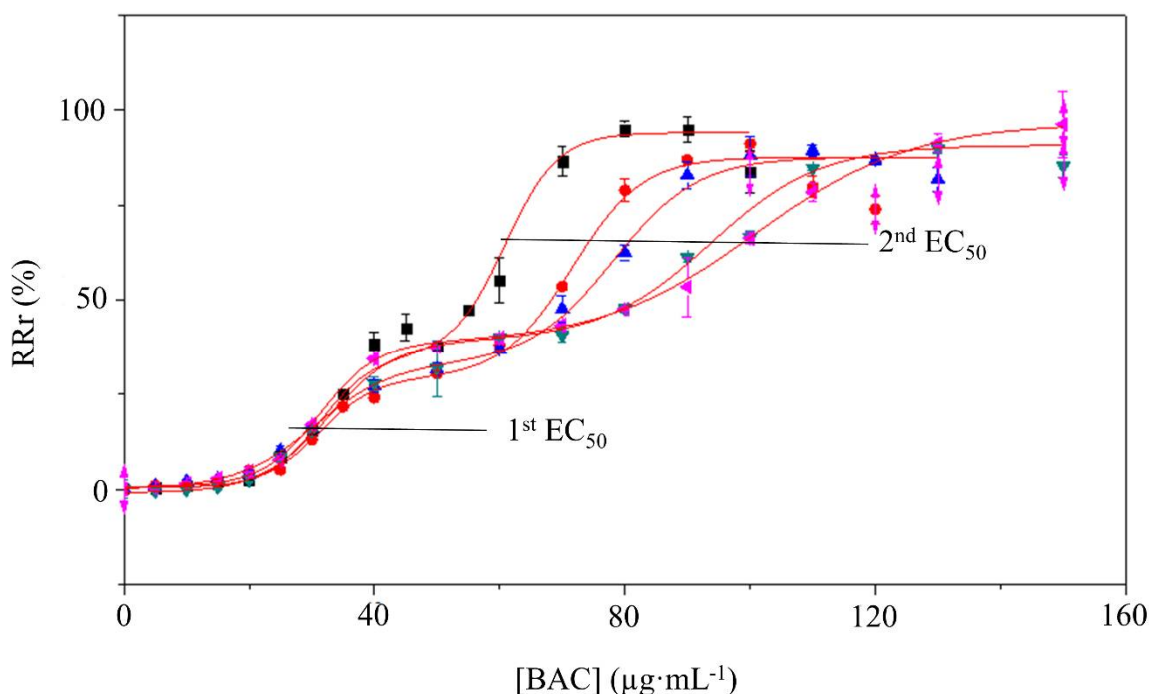


Figure 5.5 Dose-response relationship between the concentration of **BAC** and the ONPG hydrolysis rate for a bacterial population of 2.5×10^7 (CFU)·mL⁻¹ ($OD_{600nm} = 0.11$, ■ black squares), 5.4×10^7 (CFU)·mL⁻¹ ($OD_{600nm} = 0.21$, ● red circles), 7.8×10^7 (CFU)·mL⁻¹ ($OD_{600nm} = 0.29$, ▲ blue triangles), 1.0×10^8 (CFU)·mL⁻¹ ($OD_{600nm} = 0.37$, ▼ green triangles), 1.4×10^8 (CFU)·mL⁻¹ ($OD_{600nm} = 0.51$, ◀ pink triangles). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represent standard deviations. Curves were fitted using the biphasic dose-response function analysis with *OriginPro 8*.

Table 5.1 EC₅₀ of **BAC** determined from the biphasic dose-response analysis

Bacterial population (CFU·mL ⁻¹)	1 st EC ₅₀ (μg·mL ⁻¹)	2 nd EC ₅₀ (μg·mL ⁻¹)
2.5×10 ⁷	31 ± 1	61 ± 2
5.4×10 ⁷	31.1 ± 0.8	71 ± 1
7.8×10 ⁷	30.5 ± 0.8	78 ± 1
1.0×10 ⁸	33 ± 1	94 ± 2
1.4×10 ⁸	31.3 ± 0.5	101 ± 2

The 1st EC₅₀ value represents the minimal critical concentration of **BAC** necessary to induce considerable ONPG hydrolysis. Above this value of about 30 μg·mL⁻¹ **BAC**, the reaction rate ratio keeps increasing up to a concentration of about 40 μg·mL⁻¹ **BAC** before it reaches a plateau (figure 5.5). The **BAC** concentration that significantly leads to bacterial membrane permeabilization is thus lower than the determined MIC value of 45 μg·mL⁻¹. After the plateau, the reaction rate ratio of ONPG hydrolysis increases up to 100% (figure 5.5). This represents the total activity of the β-galactosidase LacZ in the absence of any membrane barrier. Our data thus suggest that high concentrations of **BAC** can disrupt both the outer and inner membranes at the levels of which these envelope layers no longer restrict the access of ONPG to cytoplasmic LacZ. The effect of **BAC** on the bacterial inner membrane might also allow the β-galactosidase LacZ to leak out of the bacterial cytoplasm.

As shown in table 5.1 and figures 5.5 and 5.6, the 1st EC₅₀ value is independent of the bacterial population, whereas the 2nd EC₅₀ shows a linear relationship with the number of bacterial cells used in the experiments. As the isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) used to induce *lacZ* expression is a non-metabolizable analogue of lactose, its concentration remains stable in a bacterial population, and the number of β-galactosidase enzymes accumulates as the number of bacterial cells increases. This is supported by the fact that the maximal values of β-galactosidase activity increase in the cell lysate controls as the number of bacterial cells increases (in annex, figures A4.7 – A4.11, pp. 205 – 207). Our data thus indicate that the number of β-galactosidase enzymes is not a limiting factor for the 1st EC₅₀ value that is

independent of the bacterial population. The 1st EC₅₀ value must be mainly limited by the amount of ONPG that reaches the cytoplasm. However, the 2nd EC₅₀ is dependent on the number of β-galactosidases available in the experiments, and this suggests that ONPG freely passes the bacterial membranes at these concentrations of **BAC**.

In order to test our model according to which the 1st EC₅₀ value obtained in the ONPG assay is related to the effect of **BAC** on the outer membrane of *E. coli* cells, we performed an outer membrane permeabilization assay using the hydrophobic fluorescent probe *N*-phenyl-1-naphthylamine (NPN) (figure 5.7).²⁰

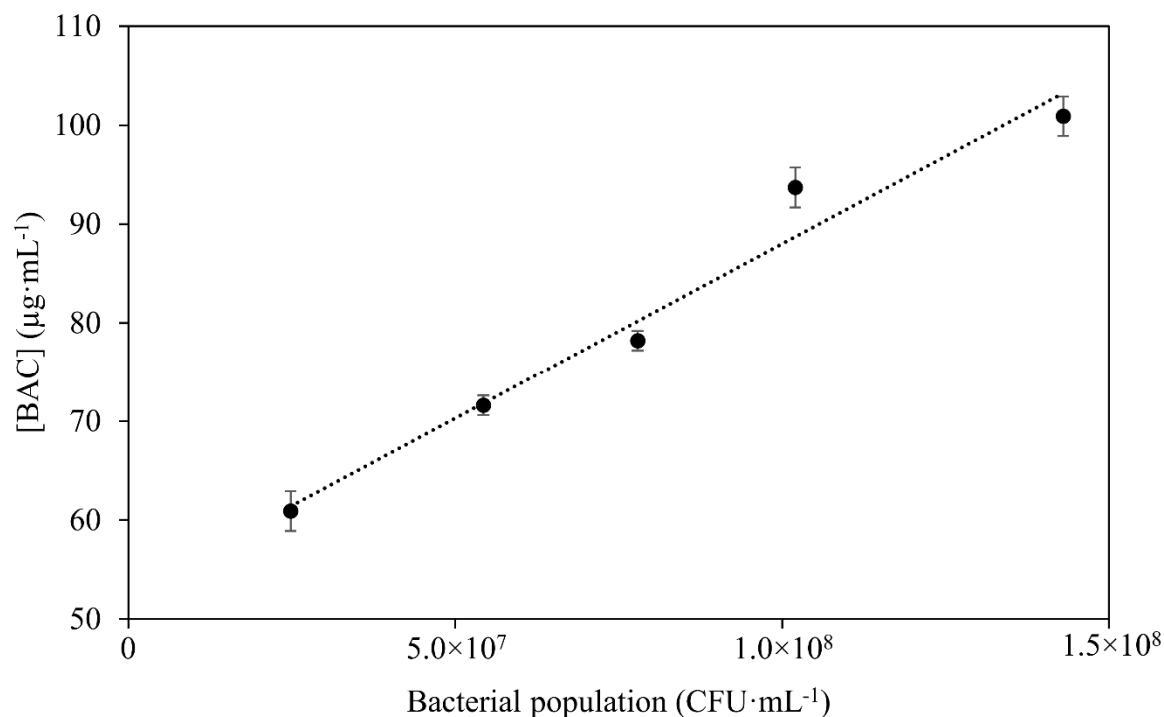


Figure 5.6 Linear relationship between the 2nd EC₅₀ and the bacterial population. Error bars represent the calculated error from the curve fitting. $y = 3.54 \times 10^7 x + 52.6$; $R^2 = 0.9674$

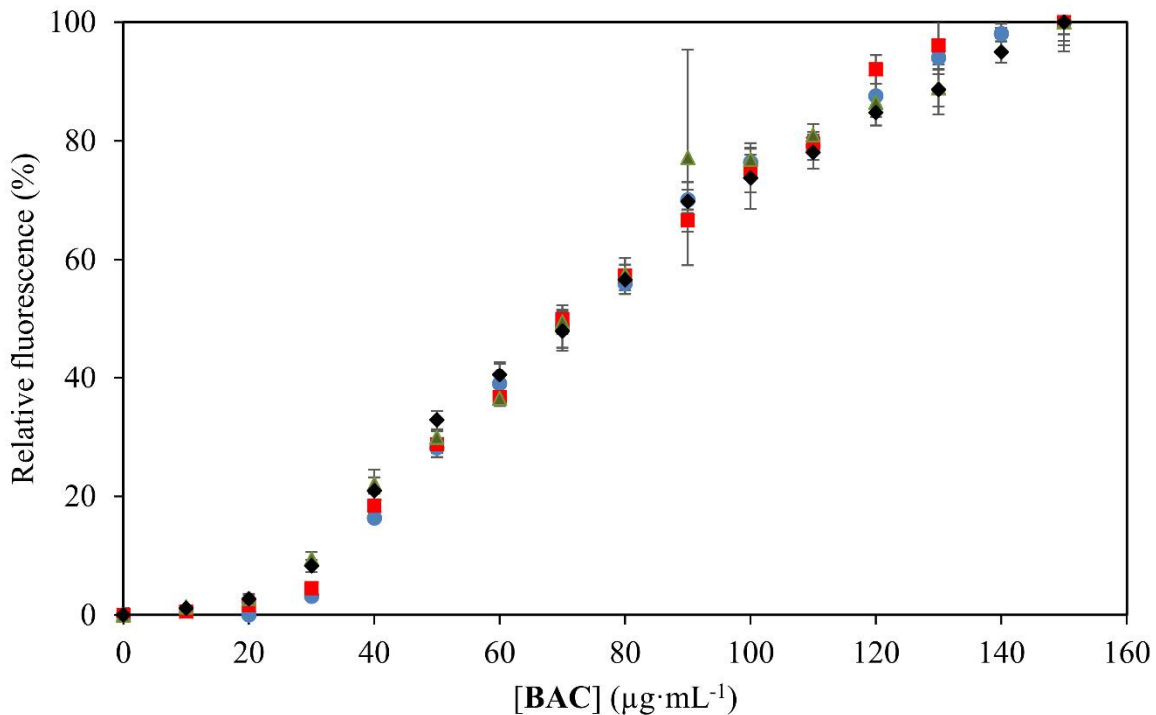


Figure 5.7 Relative fluorescence of NPN induced by different concentration of **BAC**. Data were recorded at 3000 s at different bacterial populations: 2.5×10^7 (CFU)·mL⁻¹ (OD_{600nm} = 0.11, ● blue circles), 6.0×10^7 (CFU)·mL⁻¹ (OD_{600nm} = 0.23, ■ red squares), 7.5×10^7 (CFU)·mL⁻¹ (OD_{600nm} = 0.28, ▲ green triangles), 1.1×10^8 (CFU)·mL⁻¹ (OD_{600nm} = 0.41, ◆ black diamonds). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represents standard deviations.

NPN is largely excluded by intact Gram-negative bacteria. However, enhanced uptake of NPN occurs in cells with a damaged outer membrane. NPN has a low fluorescence quantum yield in aqueous solution, but becomes strongly fluorescent in a hydrophobic environment. Therefore, its interaction with phospholipids in the bacterial envelope increases its fluorescence signal that can be used as an indication of the compromised bacterial outer membrane.^{23,24} To study the mode of action of **BAC**, we exposed *E. coli* cells to different concentrations of **BAC** in the presence of NPN. At higher concentrations, **BAC** can form micelles (above 150 μg·mL⁻¹),²⁵ and NPN insertion into their hydrophobic core could occur. The dose–response curves were obtained using the maximum of fluorescence at 3000 s, where the equilibrium was reached for all the experiments (in annex, figures A4.17 – A4.21, pp. 211 – 213). For the

mathematical data treatment, the maximum of fluorescence was arbitrarily considered the one induced by a **BAC** concentration of $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the minimal response was the one obtained in the absence of **BAC** in order to take into account all the parameters that can affect NPN fluorescence. As previously observed for polymyxin B, NPN insertion shows a monophasic **BAC** concentration dependence. As shown in figure 5.7, NPN started to become fluorescent at a **BAC** concentration of $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which corresponds to the 1st EC_{50} value obtained in the ONPG assay (figure 5.5 and table 5.1). At this concentration, the outer membrane is permeable enough to allow ONPG diffusion and enzymatic hydrolysis and NPN insertion into the phospholipid hydrophobic environment. Furthermore, no difference was observed in the relative fluorescence intensity of NPN when different bacterial populations were used. These two observations support the hypothesis that the 1st EC_{50} value corresponds to the permeabilization of the outer membrane.

To assess if sub-lethal concentrations of **BAC** can permeabilize both bacterial membranes, we studied the effect of low sub-MIC concentrations of **BAC** on bacterial cells over time (figure 5.8).

In this case, we monitored ONP production over time. As bacterial cells were kept in PBS buffer, we did not observe any bacterial growth over the period of these experiments. Under these conditions, most sub-lethal concentrations of **BAC** lead to complete ONPG hydrolysis over time, but the permeabilization process is slower when compared to the control lysate. The time lag needed to reach full ONPG consumption is dependent on the **BAC** concentration. These results indicate that **BAC** affects the integrity of both bacterial membranes over time, even at very low concentrations.

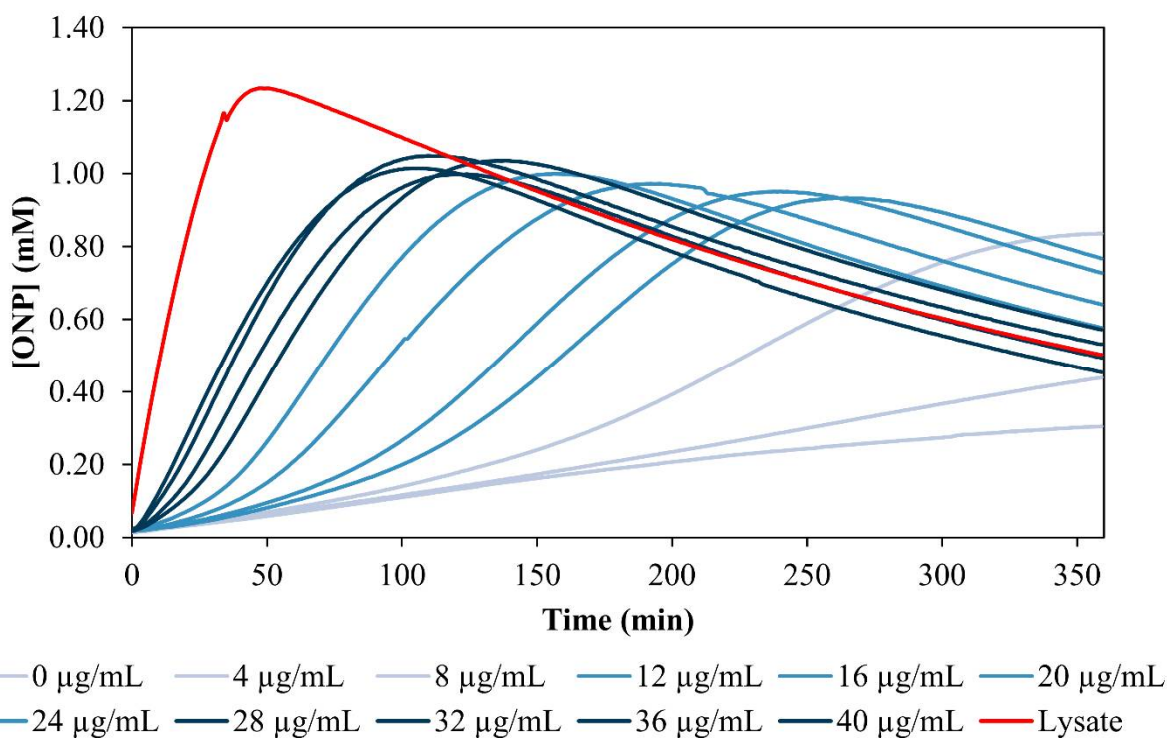


Figure 5.8 Long-term membrane permeabilization induced by **BAC** at sub-MIC concentrations at a bacterial population of 2.2×10^7 CFU·mL⁻¹ ($OD_{600\text{nm}} = 0.10$). Each curve is the average of three different experiments. The observed decrease in ONP's absorption is attributed to a reaction in the buffered solution (in annex, figure A4.22, p. 214).

5.5 Conclusion

Here, we adapted the assay developed by Lehrer *et al.* for the study of bacterial membrane permeabilization kinetics in a wild-type strain of the Gram-negative bacterial species *E. coli*, using a single enzymatic assay and developing a novel mathematical analysis to treat data obtained from ONPG hydrolysis by the β -galactosidase LacZ. This assay gives the possibility to extract quantitative values and should allow scientists to compare the efficacy of different permeabilizing agents. It should also allow a deeper understanding of the mode of action of these permeabilizing agents on bacterial membranes. This is necessary to prevent their usage at inappropriate concentrations, as this can compromise their effectiveness and drive the emergence of bacterial resistance.

Using our adapted assay, we studied the effect of different **BAC** concentrations on the *E. coli* cell membranes. We show that membrane permeabilization occurs very fast, immediately after the addition of bacteria to the **BAC** solutions. Our data demonstrate that the most common QAC, **BAC**, induces the permeabilization of the outer and inner membranes of Gram-negative bacterial cells in a two-step process. Analysis of the two EC_{50} values of **BAC** obtained from our adapted ONPG assay, combined with the data of the NPN assay that detects outer membrane permeability defects, enabled us to dissect the steps of the permeabilization process. **BAC** seems to affect Gram-negative bacterial cells by first disrupting their outer membrane, and then permeabilizing their inner membrane. Further investigation should allow us to verify this hypothesis and to study the membrane permeabilization kinetics of other permeabilizing agents.

Quite importantly, we observed that **BAC** concentrations lower than the MIC value permeabilize both bacterial membranes almost completely over time. This effect of sub-lethal concentrations of **BAC**, and of QACs in general, on Gram-negative bacterial membranes must be considered when using these antibacterial agents. The permeabilization of bacterial membranes by low-doses of QACs probably activates envelope stress responses in bacteria and therefore leads to the development of bacterial tolerance and resistance to antibiotics. Exposure of bacteria to sub-lethal concentrations of **BAC** should thus be avoided, especially in the current context of the emergence of multi-resistant bacterial pathogens.

5.6 Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Université de Montréal for financial support (JG is a NSERC scholar and ARS is the PI for grant 03866). We thank professors J. N. Pelletier and K. J. Wilkinson for the access to their laboratories and instruments. We also thank our colleagues from the Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie – Université de Montréal for the use of instruments.

5.7 References

- (1) Lehrer, R. I.; Barton, A.; Ganz, T. *J. Immunol. Methods* **1988**, *108*, 153-158.
- (2) World Health Organization, Web, Accessed August 3rd 2017, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- (3) Buffet-Bataillon, S.; Tattevin, P.; Bonnaure-Mallet, M.; Jolivet-Gougeon, A. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *39*, 381-389.
- (4) Gilbert, P.; Moore, L. E. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 703-715.
- (5) Dufresne, K.; Paradis-Bleau, C. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *883*, 41-76.
- (6) Nikaido, H. *Drug Resist. Update* **1998**, *1*, 93-98.
- (7) Delcour, A. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 808-816.
- (8) Gilbert, P.; McBain, A. J. *Surg. Infect.* **2002**, *3 Suppl 1*, S55-63.
- (9) Bloomfield, S. F. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 144S-157S.
- (10) Braoudaki, M.; Hilton, A. C. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 73-78.
- (11) Gilbert, P.; Al-taa, A. *Lett. Appl. Microbiol.* **1985**, *1*, 101-104.
- (12) Gilbert, P.; McBain, A. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 189-208.
- (13) McBain, A. J.; Rickard, A. H.; Gilbert, P. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *29*, 326-330.
- (14) Heir, E.; Sundheim, G.; Holck, A. L. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 378-388.
- (15) Poole, K. *Clin. Microbiol. Infec.* **2004**, *10*, 12-26.
- (16) Walker, E. B. In *Handbook of topical antimicrobials: industrial applications in consumer products and pharmaceuticals*; Paulson, D. S., Ed.; NY: Marcel Dekker: New York, 2003, p 99-116.
- (17) Ioannou, C. J.; Hanlon, G. W.; Denyer, S. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 296-306.
- (18) Fredell, D. L. In *Cationic surfactants*; Cross, J., Singer, E. J., Eds.; NY: Marcel Dekker: New York, 1994, p 31-60.
- (19) Kumar, A.; Schweizer, H. P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1486-1513.
- (20) Lehrer, R. I.; Barton, A.; Daher, K. A.; Harwig, S. S.; Ganz, T.; Selsted, M. E. *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 553-561.
- (21) Martti, V. *Microbiol. Rev.* **1992**, *53*, 395-411.
- (22) Martti, V.; Timo, V. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 107-113.
- (23) Loh, B.; Grant, C.; Hancock, R. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *26*, 546-551.
- (24) Eriksson, M.; Nielsen, P. E.; Good, L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7144-7147.

(25) Deutsche, T.; Porkert, U.; Reiter, R.; Keck, T.; Riechelmann, H. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 1472-1477.

Chapitre 6 : Conclusion et Perspectives

6.1 Transport transmembranaire contrôlé : vers le ciblage de la toxicité

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont eu comme objectif principal d'étudier la capacité de divers composés cationiques à perturber la membrane phospholipidique de liposomes, de bactéries ou de globules rouges. Cette capacité a tout d'abord été exploitée par des systèmes capables de transporter des anions au travers des membranes de phospholipides pour finalement tirer profit en tant qu'agent possédant des propriétés antibactériennes.

Nous avons développé des récepteurs d'anions à base de sels d'imidazolium comme transporteurs transmembranaires. Une nouvelle famille de sels d'imidazolium fonctionnalisés par des groupements adamantyles ont été identifiés comme étant des transporteurs transmembranaires mobiles, les premiers transporteurs de ce type développés dans notre groupe. Au sein de cette nouvelle famille de transporteurs, nous avons optimisé leur efficacité de transport d'anions en faisant varier l'affinité du récepteur envers l'anion transporté et, de façon plus importante, leur lipophilie majoritairement influencée par la nature du contre-anion.

À l'aide du meilleur transporteur de cette famille, nous avons démontré la possibilité de contrôler le processus de transport d'anions en exploitant les interactions compétitives et réversibles du système supramoléculaire hôte:invité. La formation d'un complexe d'inclusion entre le sel d'imidazolium et deux β -CDs a été prouvé par RMN ^1H , spectrométrie de masse et diffraction des rayons X. Le complexe d'inclusion possède des propriétés physicochimiques complètement différentes de celles du transporteur, surtout son hydrophilie accrue. Le complexe d'inclusion ne peut donc pas pénétrer la bicouche phospholipidique et inhibe le processus de transport d'anions. La présence d'un invité compétitif, l'adamantaneéthanol, ayant une plus forte affinité avec la β -CD, déplace le sel d'imidazolium du complexe d'inclusion et déclenche le processus de transport d'anion à nouveau, ce qui est induit par le partitionnement du sel d'imidazolium dans la membrane de phospholipides.

La même approche supramoléculaire s'est ensuite montrée comme une stratégie intéressante pour le transport d'un agent toxique dans une cellule. Nous avons démontré la capacité de ce système à moduler la toxicité d'un composé contre des bactéries et des globules

rouges humains. En tant que complexe supramoléculaire, la toxicité d'un sel d'imidazolium est complètement masquée, mais lorsqu'un invité compétitif est ajouté, la toxicité s'en voit restaurée. La suite logique de cette recherche est d'incorporer cette stratégie dans un système d'administration ciblée de médicaments possédant un effet toxique. En chimiothérapie, un des défis est d'augmenter la sélectivité des composés anticancéreux afin de réduire les effets secondaires qui résultent directement de leur toxicité sur les cellules saines. Les récepteurs de folates (RF) sont des protéines peu ou pas exprimées à la surface des cellules saines, toutefois, ils sont surexprimés dans certains types de cellules cancéreuses.¹ Par conséquent, la fonctionnalisation d'un composé avec de l'acide folique (AF), le ligand naturel des RF, peut conduire à ce que le composé en question arrive à sélectivement être concentré autour des cellules cancéreuses.

Nous proposons donc de fonctionnaliser la β -CD avec l'AF (figure 6.1) et de l'utiliser pour former des complexes d'inclusion avec des composés connus pour leurs propriétés anticancéreuses, mais qui sont également toxiques. L'acide folique sert dans ce cas de ligand pour cibler les cellules cancéreuses et pour obtenir une accumulation du complexe supramoléculaire autour des cellules surexprimant les RF.

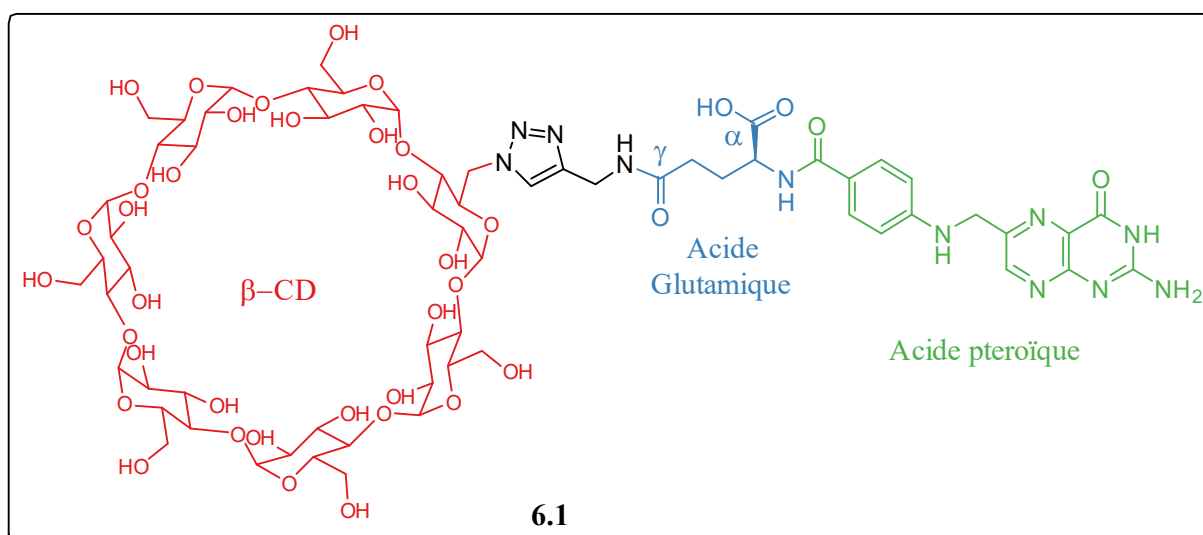


Figure 6.1 Structure du conjugué β -CD-AF **6.1** proposé.

La stratégie s'illustre de la façon suivante : la toxicité d'un composé anticancéreux, camouflée dans le complexe d'inclusion, peut ensuite être rétablie par l'ajout d'un invité compétitif, non toxique, autour du site d'intérêt (figure 6.2).

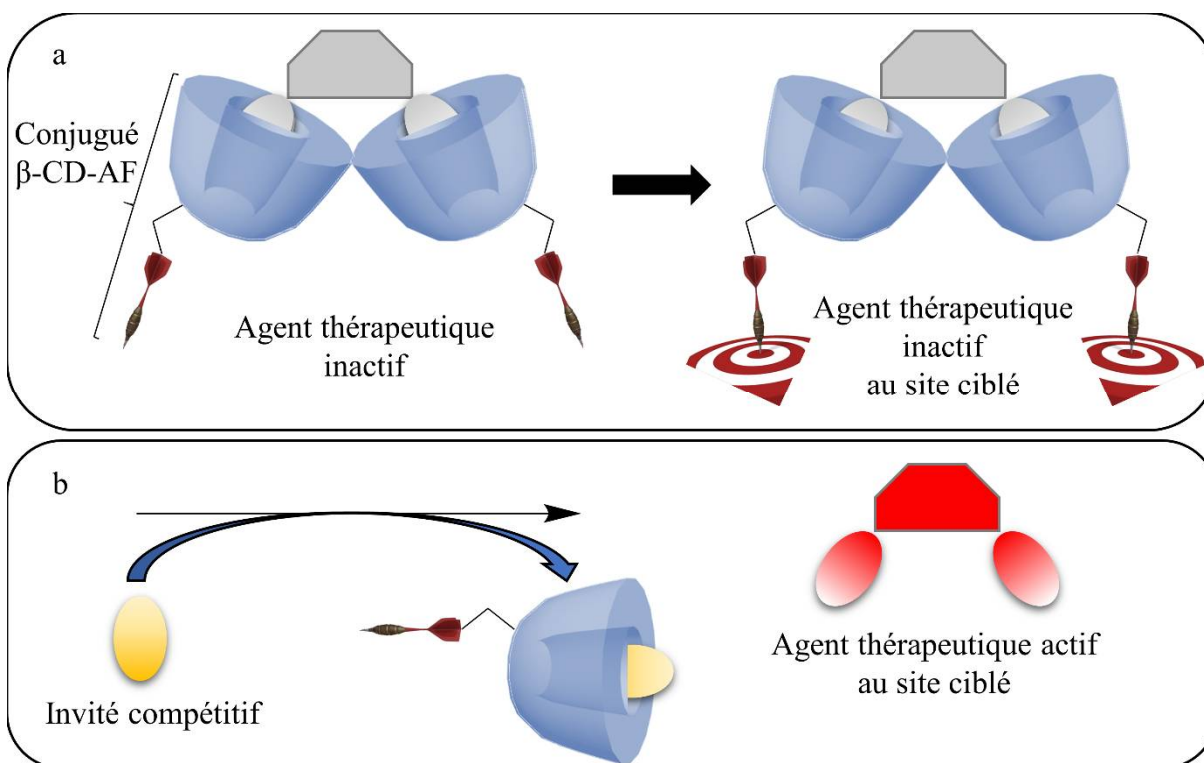


Figure 6.2 Représentation schématique illustrant la stratégie d'administration ciblée de médicaments : a) ciblage des cellules cancéreuses par la complexation RF:AF, b) activation de l'agent thérapeutique toxique au site ciblé par l'ajout de l'invité compétitif.

D'un point de vue synthétique, l'acide folique porte deux groupements acide carboxylique : un en position α et l'autre en position γ de l'acide glutamique (Glu). Seul l'acide carboxylique en position γ doit être fonctionnalisé dans le but d'obtenir une meilleure sélectivité de la protéine ciblée.² Nous avons effectué quelques tentatives de synthèse qui sont encore non concluantes à présent, utilisant des méthodes de couplage peptidique simples décrites dans la littérature.³ Il serait intéressant de tenter la synthèse du conjugué sélectif à l'acide carboxylique en position γ de l'AF en passant par le couplage peptidique entre l'acide pteroylique (AP) et l'acide glutamique protégée et fonctionnalisée.^{4,5} La synthèse du composé **6.1** pourrait procéder

de la façon suivante : l'acide aminé Glu commercialement disponible **6.2**, dont l'amine est protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) et l'acide carboxylique en position α par un ester de méthyle serait tout d'abord soumis à une condensation peptidique avec la propargylamine. Suite à la déprotection du Boc, l'acide glutamique **6.3** fonctionnalisée à la propargylamine peut ensuite être couplée à l'AP pour obtenir l'analogue de l'AF **6.4**. Finalement, **6.1** serait obtenu par une cycloaddition azoture-alcyne de type chimie « click » entre **6.4** et la β -CD- N_3 .

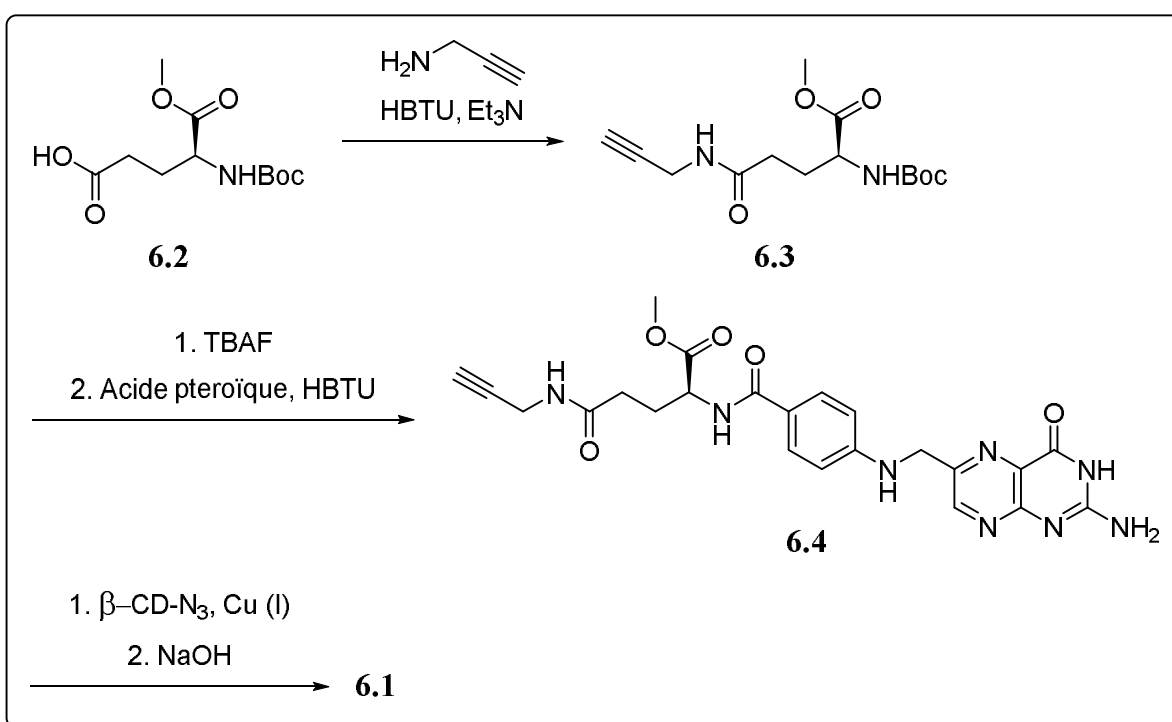


Figure 6.3 Proposition de la synthèse pour le conjugué β -CD-AF **6.1**.

Suite à la synthèse de ce composé, il sera nécessaire d'effectuer des études *in vitro* de ce type de système, dans des cellules saines et les comparer aux cellules cancéreuses surexprimant les RF. Différents sels d'imidazolium ou leurs complexes métalliques pourront être étudiés pour s'assurer de la viabilité de cette stratégie.

6.2 Perméabilisation des membranes bactériennes

Dans un but de caractériser la perméabilisation de la membrane des bactéries à Gram négatif induite par un agent perturbant, nous avons développé un essai spectroscopique quantitatif, basé sur un essai connu dans la littérature.^{6,7} En utilisant une approche mathématique pouvant normaliser chaque expérience cinétique, nous avons montré que le BAC perméabilise les membranes des bactéries à Gram négatif en deux étapes. Nos observations nous ont aussi amené à émettre l'hypothèse que ces deux étapes, caractérisées par deux EC_{50} distinctes, peuvent être attribuées à la perméabilisation des membranes externe et interne. Cette méthode est actuellement largement utilisée dans notre groupe pour quantifier l'effet perturbateur de différents composés sur les membranes bactériennes.

Jérémie Tessier, assisté de sa stagiaire Margaux Lecluse, étudie présentement la relation structure-activité et structure-mécanisme de plusieurs composés qui ont montré des propriétés antibactériennes,^{8,9} afin de développer de nouveaux sels de benzimidazolium contenant un motif lutidine (figure 6.4).

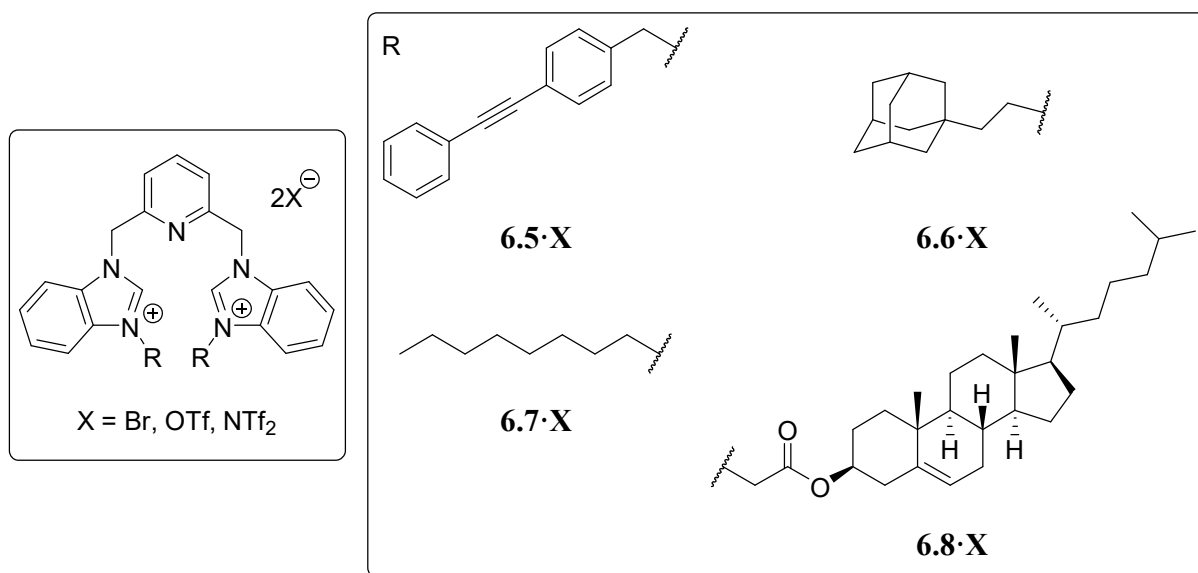


Figure 6.4 Structures des sels de benzimidazolium étudiés pour leurs propriétés antibactériennes.

Malgré le fait que certains de ces composés possèdent des activités antibactériennes bien intéressantes (tableau 6.1), la perméabilisation membranaire induite par ces composés est drastiquement plus lente que celle qu'on aurait pu imaginer (figure 6.5).

Tableau 6.1 Valeurs des MICs des composés **6.5** à **6.8**^a

Composés	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) <i>E. coli</i> SK037
6.5·Br	8
6.5·OTf	10
6.5·NTf₂	13
6.6·Br	10
6.6·OTf	6
6.6·NTf₂	7
6.7·Br	15
6.7·OTf	43
6.7·NTf₂	113
6.8·Br	>100
6.8·OTf	>100
6.8·NTf₂	>100

^a Les résultats ont été obtenus par Claude-Rosny Élie,⁹ Jérémie Tessier et Margaux Lecluse.

Cependant, comme on peut le voir dans la figure 6.5, seuls les composés **6.5** et **6.6** perméabilisent la membrane suffisamment pour laisser l'ONPG diffuser au travers de la membrane bactérienne. Ce sont d'ailleurs les composés qui ont montré les meilleures propriétés antibactériennes. Cette expérience sera dorénavant effectuée naturellement lors de l'étude de nouveaux composés possédant des propriétés antibactériennes dans notre groupe et, on espère, par d'autres groupes de recherche.

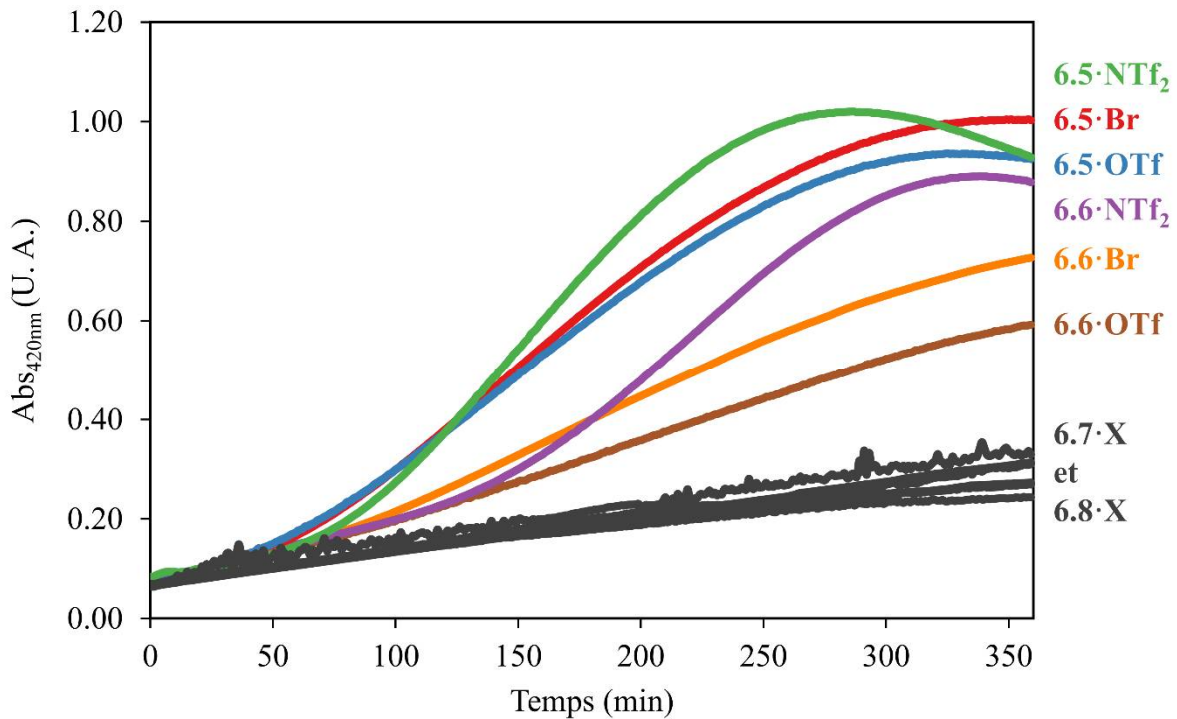


Figure 6.5 Cinétique de l'hydrolyse de l'ONPG des composés **6.5** à **6.8** à une population bactérienne de 2.5×10^7 CFU·mL⁻¹.

C'est dans le contexte de l'émergence de bactéries multi-résistantes que ces travaux ont été effectués. La résistance des bactéries, une menace pour la santé humaine, est principalement causée par l'acquisition de mutations d'un ou plusieurs gènes qui sont associés à leurs mécanismes de défenses. Par conséquent, les bactéries mutées deviennent résistantes à la plupart des antibiotiques classiques et leur survie est physiquement ou génétiquement améliorée. Par conséquent, le développement de nouveaux agents antimicrobiens est nécessaire et primordial actuellement. À ce jour, une très grande quantité de composés cationiques possédant des propriétés antimicrobiennes ont été identifiés.¹⁰ Ils partagent les caractéristiques suivantes : ils sont cationiques, comportent au moins un segment hydrophobe et sont globalement amphiphiles. Le mécanisme antimicrobien de ces composés implique une interaction physique et rapide avec la membrane cellulaire plasmique, ce qui entraînerait une augmentation de la perméabilité et de la perte de la fonction de la membrane, contrairement aux antibiotiques classiques ayant des cibles moléculaires spécifiques affectant la croissance bactérienne. Ceci

étant dit, le développement de résistances aux composés qui affectent l'intégrité de la membrane bactérienne est considérablement réduit par rapport à celui de nombreux antibiotiques actuels et est une stratégie de choix dans le traitement des infections persistantes.¹¹ Ainsi, ces composés cationiques possèdent un grand potentiel pour contourner l'imminence de l'apparition des bactéries super-résistantes.

Ces quatre années de recherche ont été dédiées à mieux comprendre l'interaction des composés cationiques avec les membranes de phospholipides, à apprendre et comprendre comment ces interactions peuvent être contrôlées et exploitées. Les composés que nous avons développés et l'étude de tous les complexes supramoléculaires formées ne sont qu'une infime partie de ce qui peut être imaginé dans d'éventuelles applications biologiques. Nous sommes optimistes que nos résultats et idées auront un impact visible dans le développement de nouveaux composés antimicrobiens et agents perturbateurs des membranes cellulaires.

6.3 Références

- (1) Xia, G.; An, Z.; Wang, Y.; Zhao, C.; Li, M.; Li, Z.; Ma, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 390-398.
- (2) Boss, S. D.; Betzel, T.; Muller, C.; Fischer, C. R.; Haller, S.; Reber, J.; Groehn, V.; Schibli, R.; Ametamey, S. M. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 74-86.
- (3) Trindade, A. F.; Frade, R. F.; Macoas, E. M.; Graca, C.; Rodrigues, C. A.; Martinho, J. M.; Afonso, C. A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3181-3190.
- (4) Temple, C.; Rose, J. D.; Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3666-3667.
- (5) Fischer, C. R.; Muller, C.; Reber, J.; Muller, A.; Kramer, S. D.; Ametamey, S. M.; Schibli, R. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 805-813.
- (6) Lehrer, R. I.; Barton, A.; Ganz, T. *J. Immunol. Methods* **1988**, *108*, 153-158.
- (7) Lehrer, R. I.; Barton, A.; Daher, K. A.; Harwig, S. S.; Ganz, T.; Selsted, M. E. *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 553-561.
- (8) Gravel, J.; Schmitzer, A. R. *Supramol. Chem.* **2014**, *27*, 364-371.
- (9) Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2358-2366.
- (10) Gravel, J.; Schmitzer, A. R. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1051-1071.
- (11) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I.; Lee, R. E. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 62-75.

Partie expérimentale

Liste des tableaux de la partie expérimentale

Table A2.1 Mass spectrometry results for 3.1:βCD and 3.1:(βCD)₂	175
Table A4.1 Viable count method dilutions.....	201

Liste des figures de la partie expérimentale

Figure A1.1 Relative chloride transport activity of imidazolium salt 2.3·Br at 20 mol% relative to EYPC or EYPC:Cholesterol (7:3).....	150
Figure A1.2 Relative chloride transport activity of imidazolium salt 2.5·NTf₂ at 20 mol% relative to EYPC or EYPC:Cholesterol (7:3)	150
Figure A1.3 Relative chloride transport activity of imidazolium salts at 15 mol% relative to DPPC.....	151
Figure A1.4 2.1·NTf₂ NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl ₃	152
Figure A1.5 2.2·NTf₂ NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl ₃	152
Figure A1.6 2.3·Br NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl ₃	153
Figure A1.7 2.3·NTf₂ NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl ₃	153
Figure A1.8 2.4·NTf₂ NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl ₃	154
Figure A1.9 2.5·NTf₂ NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl ₃	154
Figure A1.10 Stacked ¹ H NMR spectra and titration curves of 2.1·NTf₂ with TBAC	155
Figure A1.11 Stacked ¹ H NMR spectra and titration curves of 2.2·NTf₂ with TBAC	156
Figure A1.12 Stacked ¹ H NMR spectra and titration curves of 2.3·Br with TBAC	157
Figure A1.13 Stacked ¹ H NMR spectra and titration curves of 2.3·NTf₂ with TBAC	158
Figure A1.14 Stacked ¹ H NMR spectra and titration curves of 2.4·NTf₂ with TBAC	159
Figure A1.15 Stacked ¹ H NMR spectra and titration curves of 2.5·NTf₂ with TBAC	160
Figure A1.16 HPTS-based transport assay of imidazolium salt 2.3·NTf₂ at 15 mol% relative to EYPC.....	161
Figure A1.17 U-tube experiment results	162
Figure A2.1 ¹ H NMR titration of 3.1 with βCD	165
Figure A2.2 ¹ H NMR titration of AdmOH with βCD	166
Figure A2.3 ¹ H NMR titration of AdmMeOH with βCD	167
Figure A2.4 ¹ H NMR titration of AdmEtOH with βCD	168
Figure A2.5 ¹ H NMR titration of AdmNH ₂ with βCD	169
Figure A2.6 ¹ H NMR titration of AdmMeNH ₂ with βCD	170
Figure A2.7 ¹ H NMR titration of AdmCOOH with βCD	171

Figure A2.8 Partial mass spectrum of the supramolecular complex 3.1:βCD showing the ion [3.1:βCD]⁺	172
Figure A2.9 Partial mass spectrum of the supramolecular complex 3.1:(βCD)₂ showing the ion [3.1:βCD₂ +H]²⁺	173
Figure A2.10 Partial mass spectrum of the supramolecular complex 3.1:(βCD)₂ showing the ions [3.1:(βCD)₂ +NH₄]²⁺ and [3.1:(βCD)₂ +Na]²⁺	173
Figure A2.11 Partial mass spectrum of the supramolecular complex 3.1:(βCD)₂ showing the ion [3.1:(βCD)₂]⁺ with the overlapping [(3.1:(βCD)₂)₂]²⁺	174
Figure A2.12 Partial mass spectrum of the supramolecular complex (3.1:(βCD)₂)₂ showing the ion [(3.1:(βCD)₂)₂]²⁺	174
Figure A2.13 Relative chloride transport activity of αCD, βCD and γCD at 100 mol% relative to EYPC.....	175
Figure A2.14 Relative chloride transport activity of AdmOH, AdmMeOH, AdmEtOH, AdmNH ₂ , AdmMeNH ₂ and AdmCOOH at 100 mol% relative to EYPC	176
Figure A2.15 Relative chloride transport activity of 3.1 at 20 mol% relative to EYPC compared to a solution of 3.1 at 20 mol% containing 10 eq. of αCD.....	176
Figure A2.16 Relative chloride transport activity of 3.1 at 20 mol% relative to EYPC compared to solutions of 3.1 at 20 mol% containing 1 eq. of γCD, 5 eq. of γCD, and 10 eq. of γCD....	177
Figure A2.17 Conductance recording after the addition of βCD.	178
Figure A2.18 Conductance recording after the addition of AdmEtOH.	178
Figure A2.19 Anion transport process of a mixture of 3.1 and 1 eq. of βCD	179
Figure A2.20 Anion transport process of a mixture of 3.1 and 2 eq. of βCD	179
Figure A2.21 Anion transport process of a mixture of 3.1 and 3 eq. of βCD	180
Figure A2.22 Anion transport process of a mixture of 3.1 and 4 eq. of βCD	180
Figure A2.23 Reversible anion transport process in BLM bilayer experiment.....	181
Figure A3.1 Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> (HD73) by 4.1	185
Figure A3.2 Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> (HD73) by βCD	185
Figure A3.3 Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> (HD73) by CG.....	186
Figure A3.4 Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> (HD73) by βCD:CG	186
Figure A3.5 Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> (HD73) by 4.1:CG	187
Figure A3.6 Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> (HD73) by 4.1:(βCD)₂ ..	187

Figure A3.7 Dose-dependent growth inhibition of <i>B. thuringiensis</i> (HD73) by 4.1:(βCD)₂:CG	188
Figure A3.8 LIVE/DEAD® <i>BacLight</i> TM Bacterial Viability calibration curve for <i>B. Thuringiensis</i> (HD73)	190
Figure A3.9 Results of the membrane integrity assays of <i>B. thuringiensis</i>	191
Figure A3.10 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> stained by <i>BacLight</i> TM stains after incubation with NaCl 0.9%	192
Figure A3.11 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> stained by <i>BacLight</i> TM stains after incubation with βCD	193
Figure A3.12 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> stained by <i>BacLight</i> TM stains after incubation with CG	193
Figure A3.13 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> stained by <i>BacLight</i> TM stains after incubation with βCD and CG	194
Figure A3.14 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> stained by <i>BacLight</i> TM stains after incubation with 4.1	194
Figure A3.15 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> stained by <i>BacLight</i> TM stains after incubation with 4.1:(βCD)₂	195
Figure A3.16 Fluorescence microscopy of <i>B. thuringiensis</i> stained by <i>BacLight</i> TM stains after incubation with 4.1:(βCD)₂:CG	195
Figure A3.17 Hemolytic activity of 4.1 , 4.1:(βCD)₂ and 4.1:(βCD)₂:CG at various concentrations after 1 hour of incubation	196
Figure A3.18 Hemolytic activity of 4.1 , 4.1:(βCD)₂ and 4.1:(βCD)₂:CG at various concentrations after 24 hours of incubation.	197
Figure A4.1 Absorption of ONP at $\lambda = 420$ nm.....	200
Figure A4.2 Viable count calibration for <i>E. coli</i> MG1655.....	202
Figure A4.3 Influence of the IPTG concentration during the preculture growth on the ONPG hydrolysis rate of intact bacteria and bacterial lysate	203
Figure A4.4 Influence of the DMSO concentration on the ONPG hydrolysis rate with intact bacteria and bacterial lysate.....	204
Figure A4.5 Influence of 50% concentration of DMSO on the ONPG hydrolysis reaction rate with solutions of intact bacteria and bacterial lysate	205

Figure A4.6 Membrane permeabilization induced by polymyxin B at a bacterial population of 7.2×10^7 CFU/mL.....	206
Figure A4.7 Membrane permeabilization induced by BAC at a bacterial population of 2.5×10^7 CFU/mL.....	206
Figure A4.8 Membrane permeabilization induced by BAC at a bacterial population of 5.4×10^7 CFU/mL.....	207
Figure A4.9 Membrane permeabilization induced by BAC at a bacterial population of 7.8×10^7 CFU/mL.....	207
Figure A4.10 Membrane permeabilization induced by BAC at a bacterial population of 1.0×10^8 CFU/mL.....	208
Figure A4.11 Membrane permeabilization induced by BAC at a bacterial population of 1.4×10^8 CFU/mL.....	208
Figure A4.12 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 2.5×10^7 CFU/mL	209
Figure A4.13 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 5.4×10^7 CFU/mL	209
Figure A4.14 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 7.8×10^7 CFU/mL	210
Figure A4.15 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 1.0×10^8 CFU/mL	210
Figure A4.16 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 1.4×10^8 CFU/mL	211
Figure A4.17 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC , for a bacterial population of 2.5×10^7 CFU/mL.....	212
Figure A4.18 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC , for a bacterial population of 6.0×10^7 CFU/mL.....	212
Figure A4.19 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC , for a bacterial population of 7.5×10^7 CFU/mL.....	213
Figure A4.20 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC , for a bacterial population of 1.1×10^8 CFU/mL.....	213

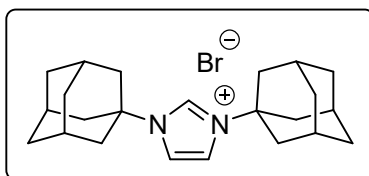
Figure A4.21 NPN fluorescence induced by different concentrations of BAC at 3000 s at different bacterial populations	214
Figure A4.22 Decrease of ONP absorption in PBS buffer (pH = 7.4).....	215

Annexe 1 : Informations supplémentaires de l'article 1
« Transmembrane anion transport mediated by
adamantyl-functionalised imidazolium salts »

General procedures

All chemicals were purchased from Aldrich Chemicals and used without further purification. Chloroform-d was purchased from CDN Isotopes. NMR experiments were recorded on Brüker Avance 300, Brüker Avance 400 or Brüker Avance 500 spectrometers. Mass spectral data were obtained by the Université de Montréal Mass Spectrometry Facility and were recorded on a Mass spectrometer TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific) with accurate mass options instrument. Fluorimetric studies were performed on a Varian Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer equipped with a temperature controller.

Syntheses



2.1·Br: 1,3-Bis(adamantan-1-yl)imidazolium bromide

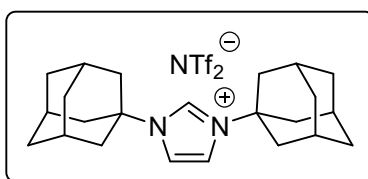
Adamantylamine (2 g, 13.2 mmol, 1 eq.) was solubilized in 20 mL of MeOH with formaldehyde 37% (1.04 mL, 14 mmol, 1.1 eq.) and agitated for 30 minutes at room temperature. Solubilized adamantylamine (2 g, 13.2 mmol, 1 eq.) in 20 mL of MeOH was slowly added over 1 hour. During this time, a solution of 20% aqueous HBr (3.84 mL, 14 mmol, 1.1 eq.) was cooled in an ice bath. Cold HBr 20% was added dropwise and the mixture is agitated for 2 h at room temperature. Glyoxal (40%, 1.6 mL, 14 mmol, 1.1 eq.) was added dropwise to the reaction mixture, which was agitated overnight at reflux. Volatiles were evaporated and the crude product was triturated with 20 mL of AcOEt and the precipitated solid was filtered. The product was then dissolved in 250 mL of saturated NaHCO₃ and extracted with 3 portions of 200 mL of dichloromethane. The combined organic phases were concentrated and the residue was purified by column chromatography using a 90%/10% dichloromethane/MeOH eluent. Combined fractions of the product were evaporated and triturated with 20 mL of AcOEt. The

precipitate was filtered, rinsed with 2 portions of 20 mL of AcOEt and dried to yield the imidazolium salt as a white solid (1.1 g, 19%).

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 10.32 (t, J =1.7 Hz, 1 H), 7.44 (d, J =1.8 Hz, 2 H), 2.32 - 2.38 (m, 18 H), 1.84 - 1.89 (m, 6 H), 1.76 - 1.81 ppm (m, 6 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz): δ = 134.3, 117.7, 61.2, 42.9, 35.3, 29.6 ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 337.2648; found (m/z): 337.2648



2.1·NTf₂:1,3-Bis(adamantan-1-yl)imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide

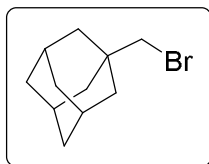
Imidazolium salt **2.1·Br** (200 mg, 0.48 mmol, 1 eq.) was solubilized in 5 mL of MeOH and treated with an excess of LiNTf₂ (413mg, 1.44 mmol, 3 eq.). The solution was heated to 50 °C overnight. Volatiles were evaporated and the residue was triturated in 50 mL of water. The precipitate was filtered to yield the imide salt as a white solid (223mg, 75%).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 8.59 (t, J =1.7 Hz, 1 H), 7.54 (d, J =1.7 Hz, 2 H), 2.32 (br. s., 6 H), 2.17 (d, J =2.9 Hz, 12 H), 1.80 ppm (d, J =2.9 Hz, 12 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 129.8, 119.9, 119.2, 60.9, 42.6, 35.2, 29.4 ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 337.2638; found (m/z): 337.2648.

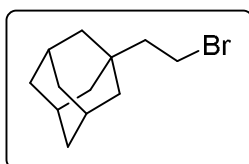
HRMS (ESI) for $\text{C}_2\text{F}_6\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}]^-$: Calc. (m/z): 279.9178; found (m/z): 279.9176



2.6: 1-(Bromomethyl)adamantane

Adamantanemethanol (2 g, 12 mmol, 1 eq.) was introduced in 30 mL of concentrated aqueous HBr and heated at reflux for 12 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and diluted with 50 mL of distilled water. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (75 mL \times 3). The combined organic extracts were washed with 100 mL of saturated NaHCO₃, with 100 mL of distilled water and with 100 mL of brine. The organic extracts were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated to yield the bromide as a white powder (2.59 g, 94 %).

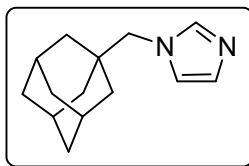
¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS data were in accordance with the literature.¹



2.7: 1-(2-Bromoethyl)adamantine

Based on the procedure for the synthesis of **2.6**, using Adamantaneethanol (2 g, 11 mmol, 1 eq.). The bromide was obtained as a white powder (2.45 g, 91 %).

¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS data were in accordance with the literature.²



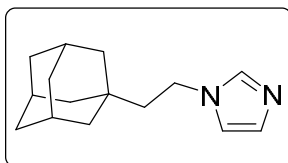
2.8: 1-(2-(Adamantan-1-yl)methyl)imidazole

Sodium hydride 60 % in oil (312 mg, 7.8 mmol, 3 eq.) and imidazole (492 mg, 7.8 mmol, 3 eq.) were suspended in 20 mL of dry DMF and stirred for 2 h under nitrogen atmosphere at room temperature. The resulting solution was added to **2.6** (600 mg, 2.6 mmol, 1 eq.) via a syringe and heated to 100 °C overnight. The reaction mixture was cooled to room temperature and quenched with methanol. The volatiles were evaporated and the residue was dissolved in DCM (100 mL), transferred to an Erlenmeyer flask and treated with 150 mL of distilled water. The heterogeneous mixture was vigorously stirred for 20 min and the organic layer was separated, washed with 100 mL of brine, dried over MgSO₄, and evaporated to yield the imidazole as a white solid (429 mg, 76 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.39 (s, 1 H), 7.05 (s, 1 H), 6.84 (s, 1 H), 3.59 (s, 2 H), 2.01 (br. s., 3 H), 1.67 - 1.78 (m, 3 H), 1.56 - 1.64 (m, 3 H), 1.50 ppm (d, J=2.2 Hz, 6 H)

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 138.3, 128.4, 120.6, 59.7, 40.3, 36.6, 34.1, 28.1 ppm

HRMS (ESI) for C₁₄H₂₁N₂ [M+H]⁺: Calc. (m/z): 217.1699; found (m/z): 217.1689



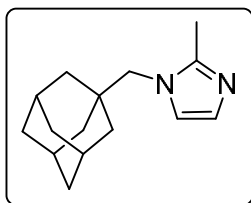
2.9: 1-(2-(Adamantan-1-yl)ethyl)imidazole

Based on the procedure for the synthesis of **2.8**, using sodium hydride 60% in oil (493 mg, 12.3 mmol, 3 eq.), imidazole (837 mg, 12.3 mmol, 3 eq.), bromide **2.7** (1 g, 4.1 mmol, 1 eq.) and the reaction was heated at 40 °C. The imidazole was obtained as a pale yellow solid (850 mg, 89 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7.49 (s, 1 H), 7.07 (s, 1 H), 6.93 (s, 1 H), 3.92 - 3.99 (m, 2 H), 2.01 (br. s., 3 H), 1.71 - 1.80 (m, 3 H), 1.58 - 1.71 (m, 5 H), 1.56 ppm (br. s., 6 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz): δ = 136.5, 128.9, 118.3, 45.0, 41.8, 41.7, 36.5, 31.5, 28.0 ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calc. (m/z): 231.1856; found (m/z): 231.1856



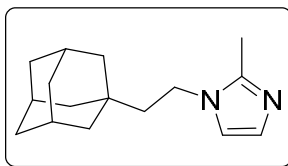
2.10: 1-(2-(Adamantan-1-yl)methyl)-2-methylimidazole

Based on the procedure for the synthesis of **2.8**, using sodium hydride 60% in oil (260 mg, 6.5 mmol, 3 eq.), 2-methylimidazole (536 mg, 6.5 mmol, 3 eq.) and bromide **2.6** (500 mg, 2.2 mmol, 1 eq.). A white solid was obtained (443 mg, 88 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 6.88 (s, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 3.49 (s, 2 H), 2.36 (s, 3 H), 1.99 (br. s., 3 H), 1.65 - 1.76 (m, 3 H), 1.54 - 1.64 (m, 3 H), 1.51 ppm (d, $J=2.0$ Hz, 6 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 145.3, 126.2, 121.2, 58.2, 40.6, 36.6, 35.2, 28.1, 13.7 ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calc. (m/z): 231.1856; found (m/z): 231.1866



2.11: 1-(2-(Adamantan-1-yl)ethyl)-2-methylimidazole

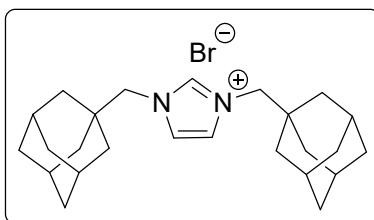
Based on the procedure for the synthesis of **2.8**, using sodium hydride 60% in oil (100 mg, 2.5 mmol, 3 eq.), 2-methylimidazole (205 mg, 2.5 mmol, 3 eq.), bromide **2.7** (205 mg,

0.82 mmol, 1 eq.) and the reaction was heated at 40 °C. A pale brown solid was obtained (161 mg, 81 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 6.92 (s, 1 H), 6.82 (s, 1 H), 3.77 - 3.89 (m, 2 H), 2.39 (s, 3 H), 2.02 (br. s., 3 H), 1.75 - 1.78 (m, 3 H), 1.64 - 1.71 (m, 3 H), 1.58 (d, $J=2.0$ Hz, 6 H), 1.47 - 1.54 ppm (m, 2 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126MHz): δ = 127.1, 118.8, 45.1, 42.2, 41.1, 37.0, 31.9, 28.5, 29.6 13.0 ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calc. (m/z): 245.2012; found (m/z): 245.2003.



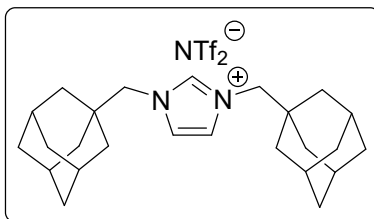
2.2·Br: 1,3-Bis(2-(adamantan-1-yl)methyl)imidazolium bromide

Imidazole **2.8** (500 mg, 2.3 mmol, 1 eq.) and bromide **2.6** (583 mg, 2.5 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in 5 mL of NMP in a vial that was sealed and heated using a Biotage® Initiator Classic Microwave Synthesizer at 200 °C for 2 h. The volatiles were evaporated and the residue was triturated with 20 mL AcOEt. The resulting solid was filtered and dried to yield a white solid (717 mg, 70 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 10.51 (s, 1 H), 7.21 (d, $J=1.5$ Hz, 2 H), 4.11 (s, 4 H), 2.05 (br. s., 6 H), 1.70 - 1.78 (m, 6 H), 1.58 - 1.64 (m, 6 H), 1.57 ppm (d, $J=2.6$ Hz, 12 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz): δ = 139.0, 122.6, 61.4, 39.8, 36.3, 34.1, 27.9 ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 365.2951; found (m/z): 365.2944



2.2·NTf₂: 1,3-Bis(2-(adamantan-1-yl)methyl)imidazolium bis(trifluoromethylsulfoniyl)imide

Imidazolium salt **2.2·Br** (150 mg, 0.34 mmol, 1 eq.) was dissolved in 5 mL of MeOH, treated with an excess of LiNTf₂ (290 mg, 1.01 mmol, 3 eq.) and heated to 50°C overnight. The volatiles were evaporated and the residue was triturated in 50 mL of water. The resulting solid was filtered to yield an imide salt as a white solid (196 mg, 90%).

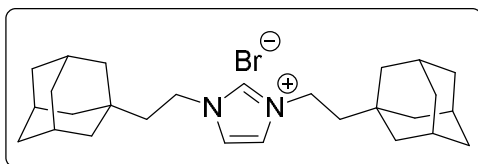
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.75 (s, 1 H), 7.11 (d, J=1.7 Hz, 2 H), 3.93 (s, 4 H), 2.06 (br. s., 6 H), 1.69 - 1.81 (m, 6 H), 1.55 - 1.66 (m, 6 H), 1.50 ppm (d, J=2.7 Hz, 12 H)

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz): δ = 137.2, 123.1, 119.8, 61.7, 39.7, 36.3, 34.0, 27.9 ppm

¹⁹F NMR (CDCl₃, 282 MHz): δ = -80.2 ppm

HRMS (ESI) for C₂₅H₃₇N₂ [M]⁺: Calc. (m/z): 365.2951; found (m/z): 365.2943.

HRMS (ESI) for C₂F₆NO₄S₂ [M]⁻: Calc. (m/z): 279.9178; found (m/z): 279.9183



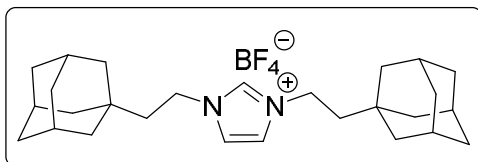
2.3·Br: 1,3-Bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium bromide

Imidazole **2.9** (500 mg, 2.2 mmol, 1 eq.) and bromide **2.7** (792 mg, 3.3 mmol, 1.5 eq.) were dissolved in 20 mL of acetonitrile, heated to reflux for 72 h, cooled and the volatiles were evaporated. The residue was triturated with 20 mL of AcOEt. The resulting solid was filtered, rinsed with 2 portions of 20 mL of AcOEt, and dried to yield the bromide salt as a white solid (722 mg, 70 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 10.80$ (s, 1 H), 7.27 (s, 2 H), 4.33 - 4.43 (m, 4 H), 2.00 (br. s., 6 H), 1.56 - 1.78 ppm (m, 28 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 213.1, 208.9, 189.9, 189.6, 189.0, 187.6, 186.5, 185.5$ ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 393.3264; found (m/z): 393.3269



2.3·BF₄: 1,3-Bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium tetrafluoroboride

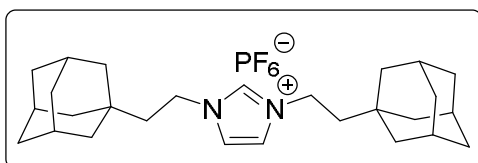
Based on the procedure for the synthesis of **2.2·NTf₂**, using imidazolium salt **2.3·Br** (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) and NaBF_4 (35 mg, 0.32 mmol, 3 eq.). The boride salt was obtained as a white solid (47 mg, 89 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 8.98$ (br. s., 1 H), 7.33 (s, 2 H), 4.15 - 4.30 (m, 4 H), 1.99 (br. s., 6 H), 1.53 - 1.80 ppm (m, 28 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz): $\delta = 135.7, 121.6, 45.4, 43.9, 41.6, 36.4, 31.7, 28.0$ ppm

^{19}F NMR (CDCl_3 , 282 MHz): $\delta = -151.3$ ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 393.3264; found (m/z): 393.3269



2.3·PF₆: 1,3-Bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium hexafluorophosphate

Based on the procedure for the synthesis of **2.2·NTf₂**, using imidazolium salt **2.3·Br** (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) and KPF_6 (59 mg, 0.32 mmol, 3 eq.). The phosphate salt was obtained as white solid (54 mg, 92 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 9.08 (br. s., 1 H), 7.25 (br. s., 2 H), 4.23 (br. s., 4 H), 2.01 (br. s., 6 H), 1.50 - 1.81 ppm (m, 28 H)

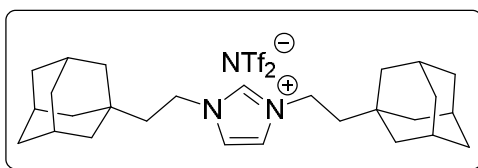
^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz): δ = 135.7, 122.1, 45.8, 44.2, 41.9, 36.8, 32.0, 28.4 ppm

^{19}F NMR (CDCl_3 , 282 MHz): δ = -72.3 ppm (d, $J=710$ Hz)

^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ = -143 ppm (sep, $J=710$ Hz)

HRMS (ESI) for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 393.3264; found (m/z): 393.3267

HRMS (ESI) for F_6P $[\text{M}]^-$: Calc. (m/z): 144.9647; found (m/z): 144.9647



2.3·NTf₂: 1,3-Bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide

Based on the procedure for the synthesis of **2.2·NTf₂**, using imidazolium salt **2.3·Br** (50 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) and LiNTf₂ (92 mg, 0.32 mmol, 3 eq.). The imide salt was obtained as white solid (67 mg, 91 %).

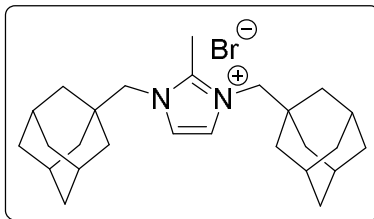
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 9.02 (s, 1 H), 7.22 (s, 2 H), 4.22 - 4.29 (m, 4 H), 2.02 (br. s., 6 H), 1.72 - 1.79 (m, 6 H), 1.64 - 1.71 (m, 10 H), 1.57 ppm (s, 12 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 126 MHz): δ = 135.5, 122.2, 119.8, 45.9, 44.2, 41.9, 36.7, 32.0, 28.4 ppm

^{19}F NMR (CDCl_3 , 282 MHz): δ = -78.8 ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 393.3264; found (m/z): 393.3270

HRMS (ESI) for $\text{C}_2\text{F}_6\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}]^-$: Calc. (m/z): 279.9178; found (m/z): 279.9182



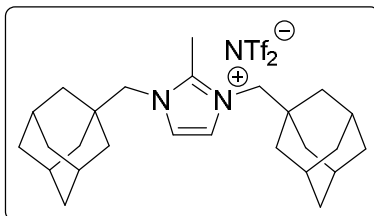
2.4·Br: 1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)methyl)-2-methylimidazolium bromide

Based on the procedure for the synthesis of **2.2·Br**, using imidazole **2.10** (80 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) and bromide **2.6** (160 mg, 2.5 mmol, 2 eq.). The imidazolium salt was obtained as white solid (116 mg, 71 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.38 (s, 2 H), 4.01 (s, 4 H), 2.81 (s, 3 H), 2.07 (br. s., 6 H), 1.72 - 1.80 (m, 6 H), 1.61 - 1.68 (m, 6 H), 1.59 ppm (s, 12 H)

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz): δ = 144.9, 122.8, 60.6, 40.4, 36.3, 35.4, 27.9, 12.5 ppm

HRMS (ESI) for C₂₆H₃₉N₂ [M]⁺: Calc. (m/z): 379.3108; found (m/z): 379.3118



2.4·NTf₂:

1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)methyl)-2-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide

Based on the procedure for the synthesis of **2.2·NTf₂**, using imidazolium salt **2.4·Br** (115 mg, 0.25 mmol, 1 eq.) and LiNTf₂ (215 mg, 0.75 mmol, 3 eq.). The imide salt was obtained as white solid (143 mg, 87 %).

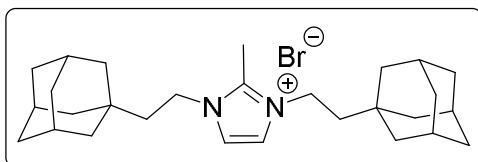
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.13 (s, 2 H), 3.83 (s, 4 H), 2.63 (s, 3 H), 2.07 (br. s., 6 H), 1.72 - 1.80 (m, 6 H), 1.58 - 1.66 (m, 6 H), 1.54 ppm (d, J=2.4 Hz, 12 H)

¹³C NMR (CDCl₃, 101MHz): δ = 144.6, 122.6, 120.0, 60.4, 40.2, 36.2, 35.3, 27.8, 11.3 ppm

¹⁹F NMR (CDCl₃, 282MHz): δ = -80.1 ppm

HRMS (ESI) for $C_{26}H_{39}N_2 [M]^+$: Calc. (m/z): 379.3108; found (m/z): 379.3108

HRMS (ESI) for $C_2F_6NO_4S_2 [M]^-$: Calc. (m/z): 279.9178; found (m/z): 279.9175



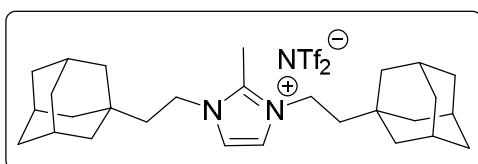
2.5·Br: 1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)-2-methylimidazolium bromide

Based on the procedure for the synthesis of **2.3·Br**, using imidazole **2.11** (500 mg, 2.1 mmol, 1 eq.) and bromide **2.7** (747 mg, 3.1 mmol, 1.5 eq.). The imidazolium salt was obtained as white solid (116 mg, 71 %).

1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 7.52 (s, 2 H), 4.20 - 4.25 (m, 4 H), 2.79 (s, 3 H), 2.01 (br. s., 6 H), 1.71 - 1.77 (m, 6 H), 1.63 - 1.68 (m, 6 H), 1.55 - 1.61 ppm (m, 16 H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz): δ = 142.8, 121.5, 44.6, 44.1, 42.1, 36.7, 32.1, 28.4, 11.0 ppm

HRMS (ESI) for $C_{28}H_{43}N_2 [M]^+$: Calc. (m/z): 407.3421; found (m/z): 407.3418



2.5·NTf₂:

1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)-2-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide

Based on the procedure for the synthesis of **2.2·NTf₂**, using imidazolium salt **2.5·Br** (200 mg, 0.41 mmol, 1 eq.) and LiNTf₂ (353 mg, 1.23 mmol, 3 eq.). The imide salt was obtained as white solid (246 mg, 87 %).

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.19 (s, 2 H), 4.04 - 4.12 (m, 4 H), 2.60 - 2.64 (m, 3 H), 2.02 (br. s., 6 H), 1.71 - 1.81 (m, 6 H), 1.62 - 1.71 (m, 6 H), 1.50 - 1.61 ppm (m, 16 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 101 MHz): $\delta = 142.8, 121.0, 120.0, 44.4, 43.8, 42.0, 36.7, 32.0, 28.4, 9.7$ ppm

^{19}F NMR (CDCl_3 , 282 MHz): $\delta = -80.1$ ppm

HRMS (ESI) for $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{N}_2$ $[\text{M}]^+$: Calc. (m/z): 407.3421; found (m/z): 407.3435

HRMS (ESI) for $\text{C}_2\text{F}_6\text{NO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}]^-$: Calc. (m/z): 279.9178; found (m/z): 279.9171

Lucigenin-based fluorescence assays

Preparation of EYPC liposomes for lucigenin-based fluorescence assays

A lipid film was formed by evaporating a chloroform solution containing 50 mg or 25 mg of EYPC lipids (Egg Yolk Phosphatidyl Choline) under reduced pressure at 25 °C for at least 2 h. The lipid film was then hydrated with 500 μL of a 2 mM lucigenin solution containing 100 mM NaCl and 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH = 6.2). The resulting suspension was then subjected to at least 10 freeze/thaw cycles (1 minute at -78°C followed by 1 minute at 35 °C) and vortexed for 30 seconds between each cycle. The suspension was then extruded through a 100 nm polycarbonate membrane 21 times. The liposomes were purified through a Sephadex G-25 column to remove the extravesicular lucigenin dye using a 100 mM NaNO_3 and 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH = 6.2) eluent. The isolated liposomes were diluted to 10 mM (50 mg of EYPC) or 5 mM (25 mg of EYPC) relative to the lipid, assuming all EYPC was conserved through manipulations.

Preparation of EYPC:Cholesterol liposomes for lucigenin-based fluorescence assays

The procedures were the same as the “*Preparation of EYPC liposomes for lucigenin-based fluorescence assays*”, except that cholesterol was added in proportion of 7:3 EYPC:Cholesterol in the chloroform solution.

Preparation of DPPC liposomes for lucigenin-based fluorescence assays

The procedures were the same as the “*Preparation of EYPC liposomes for lucigenin-based fluorescence assays*”, except that EYPC was replaced by dipalmitoylphosphatidylcholine lipids (DPPC).

Lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes

A 50 μL (10 mM EYPC liposome stock solution) or 100 μL (5 mM EYPC liposomes stock solution) aliquot of liposomes solution was added to a 2.5 mL solution containing 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH = 6.2) and 100 mM salt (salt = NaCl, NaNO_3 , NaHCO_3 , Na_2SO_4 , NaClO_4). 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 μL of solution of transporter at different concentrations in MeOH were added, and at $t = 300$ s, 100 μL of a Triton-X 5% (V/V) solution were added to lyse the liposomes and observe maximal lucigenin fluorescence in solution. The temperature was set to 25 °C. Experiments were repeated in triplicate and all traces reported were the average of the three trials.

Lucigenin-based fluorescence assays with EYPC:Cholesterol liposomes

The procedures were the same as the “*Lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes*”, except that it was a EYPC:Cholesterol 7:3 liposomes stock solution.

Lucigenin-based fluorescence assays with DPPC liposomes

The procedures were the same as the “*Lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes*”, except that it was a DPPC liposomes stock solution with the temperature set to 30°C or 40°C.

Transport in EYPC:Cholesterol liposomes

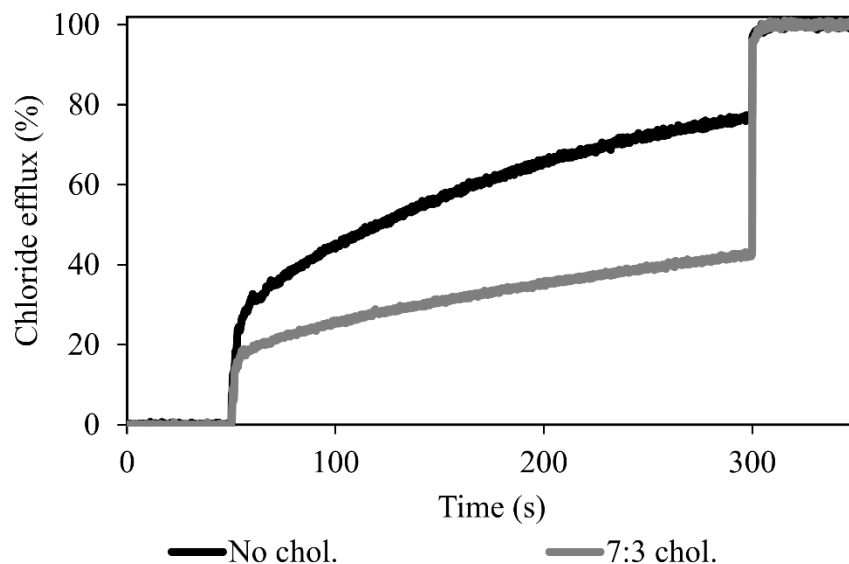


Figure A1.1 Relative chloride transport activity of imidazolium salt **2.3·Br** at 20 mol% relative to EYPC or EYPC:Cholesterol (7:3). Intravesicular: 2 mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2).

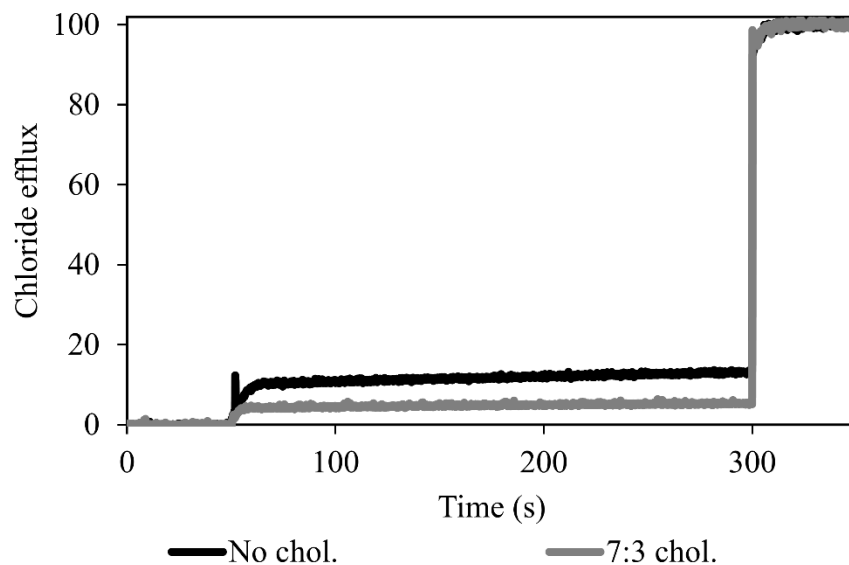


Figure A1.2 Relative chloride transport activity of imidazolium salt **2.5·NTf₂** at 20 mol% relative to EYPC or EYPC:Cholesterol (7:3). Intravesicular: 2 mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH = 6.2).

Transport in DPPC liposomes

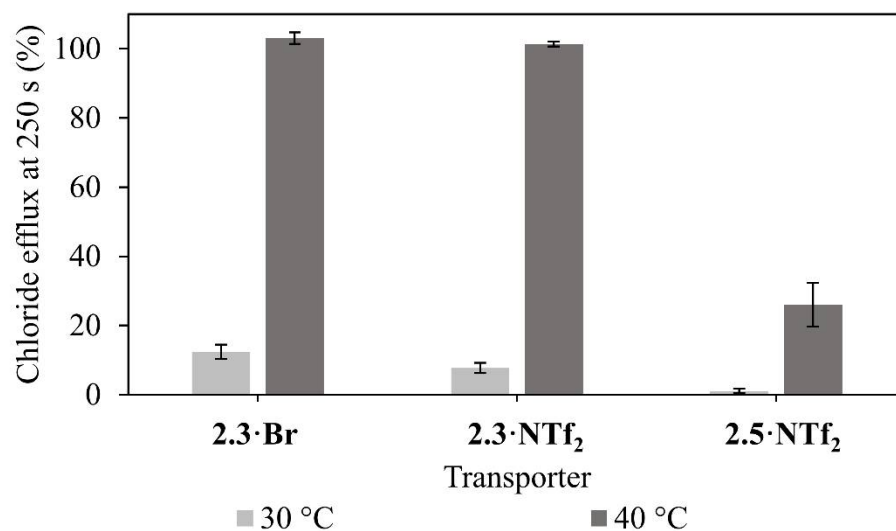


Figure A1.3 Relative chloride transport activity of imidazolium salts at 15 mol% relative to DPPC. Intravesicular: 2 mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2).

NMR Job's plots

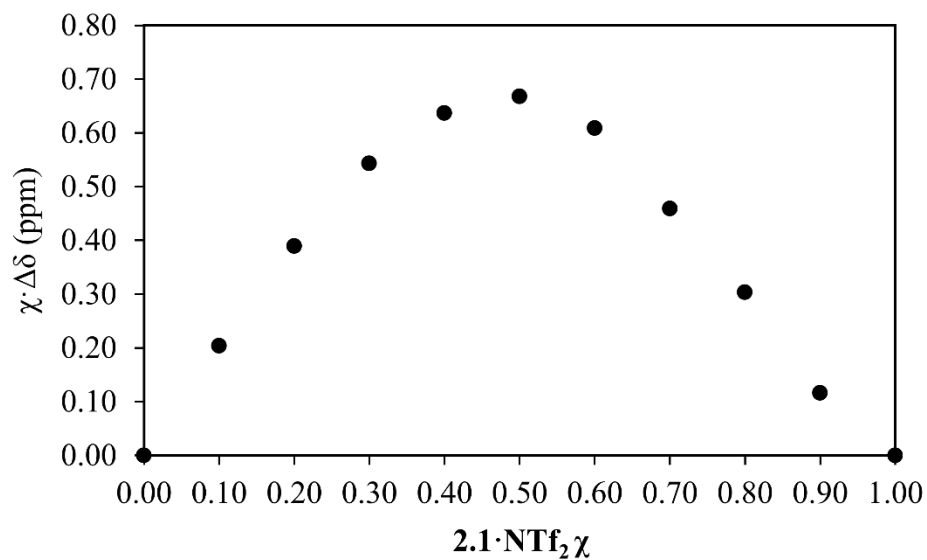


Figure A1.4 $2.1 \cdot \text{NTf}_2$ NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl_3 . Total concentration = 12,5 mM. Effect on H2 proton signal.

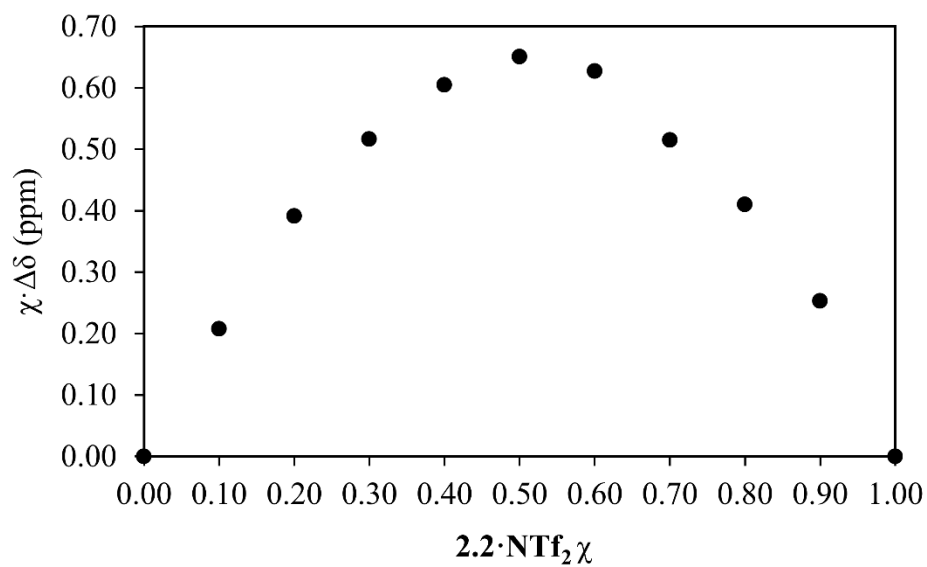


Figure A1.5 $2.2 \cdot \text{NTf}_2$ NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl_3 . Total concentration = 12,5 mM. Effect on H2 proton signal.

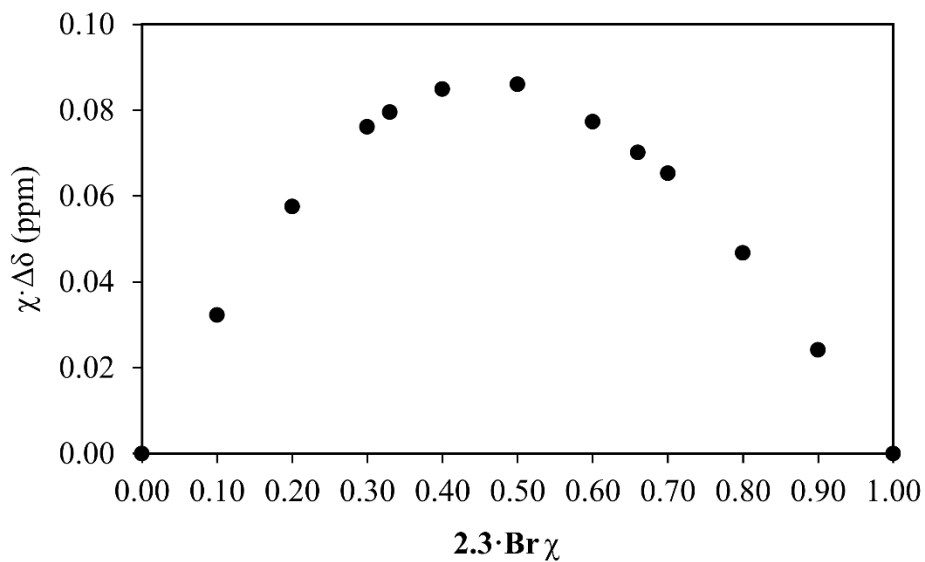


Figure A1.6 **2.3·Br** NMR Job's plot with TBAC salt in $CDCl_3$. Total concentration = 12,5 mM. Effect on H2 proton signal.

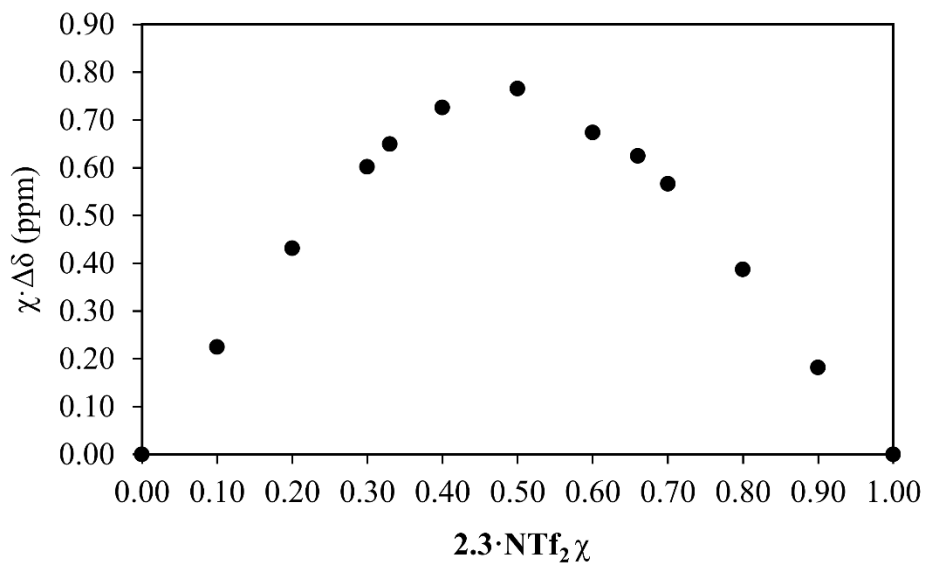


Figure A1.7 **2.3·NTf₂** NMR Job's plot with TBAC salt in $CDCl_3$. Total concentration = 12,5 mM. Effect on H2 proton signal.

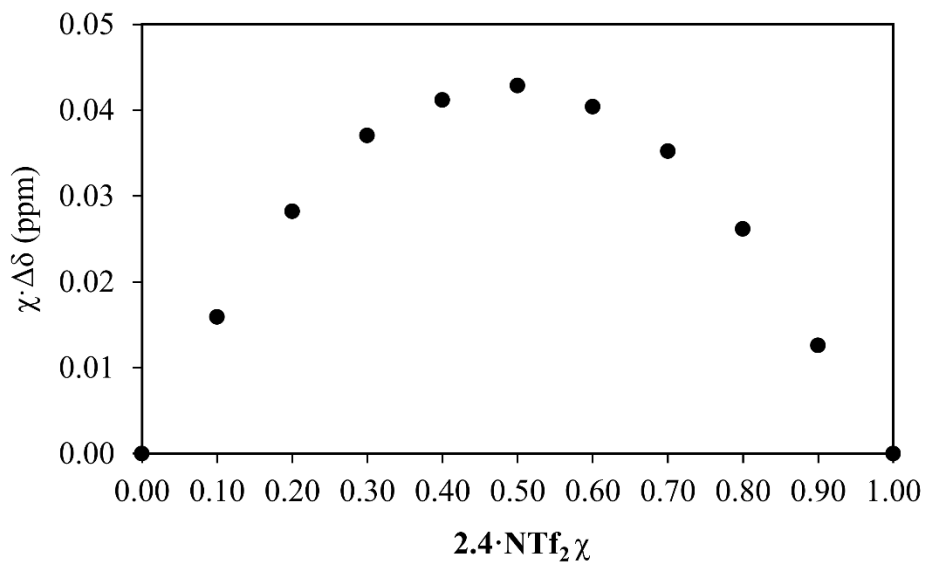


Figure A1.8 **2.4·NTf₂** NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl₃. Total concentration = 12,5 mM. Effect on Me protons signal.

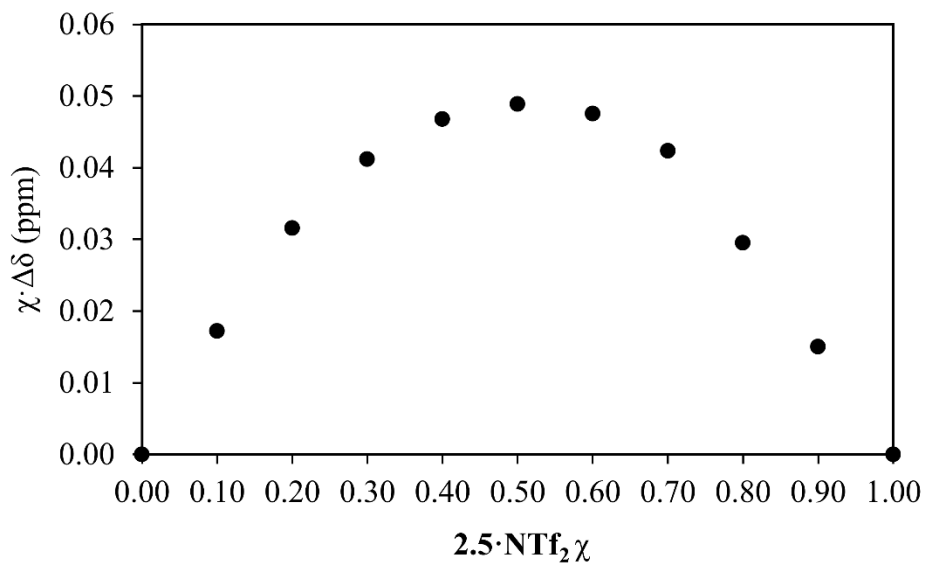


Figure A1.9 **2.5·NTf₂** NMR Job's plot with TBAC salt in CDCl₃. Total concentration = 12,5 mM. Effect on Me protons signal.

NMR Titrations

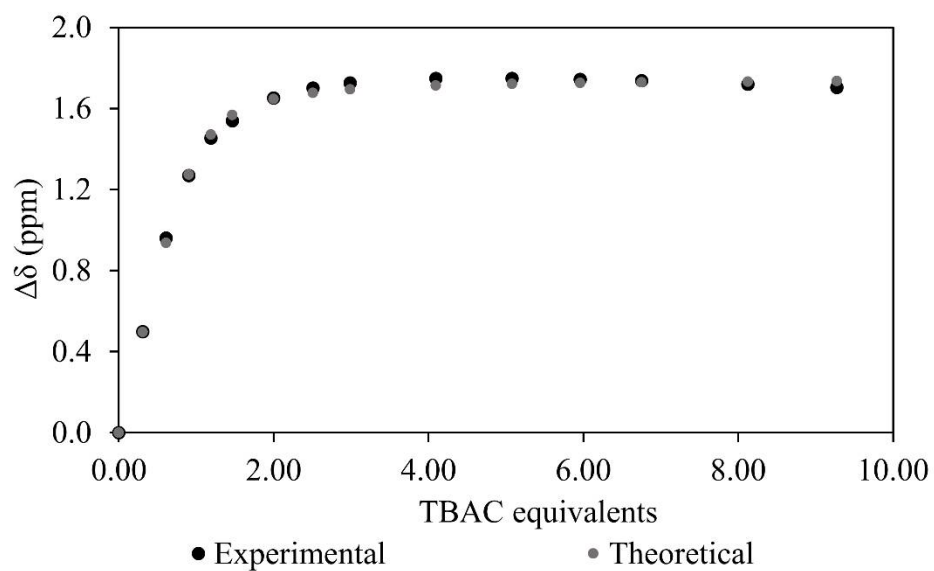
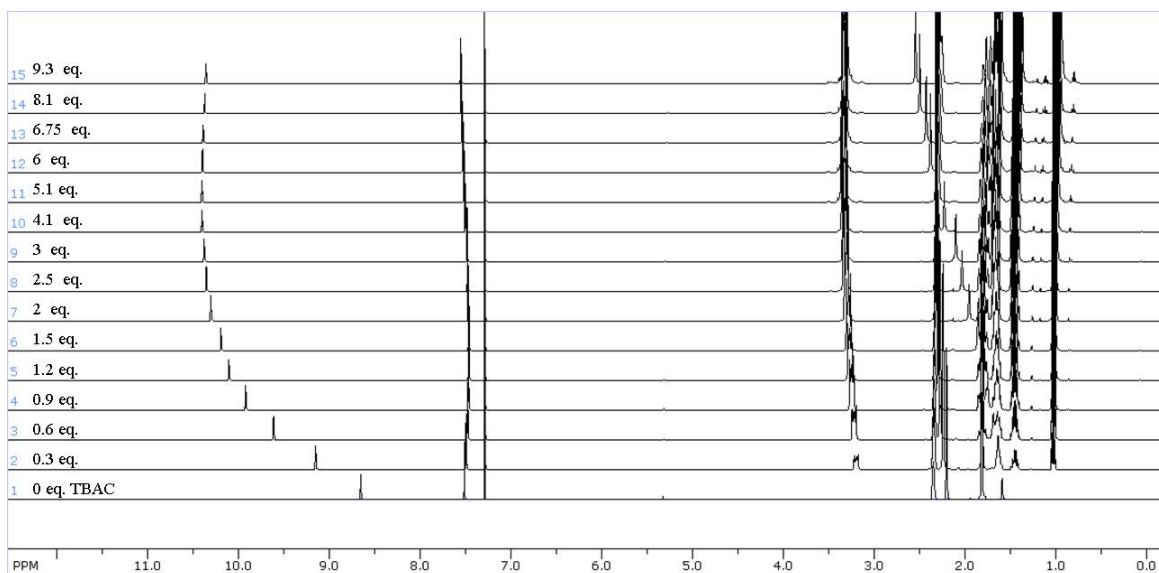


Figure A1.10 Stacked ^1H NMR spectra and titration curves of $[\mathbf{2.1} \cdot \text{NTf}_2] = 12.5 \text{ mM}$ with TBAC (400 MHz, CDCl_3 , 298 K).

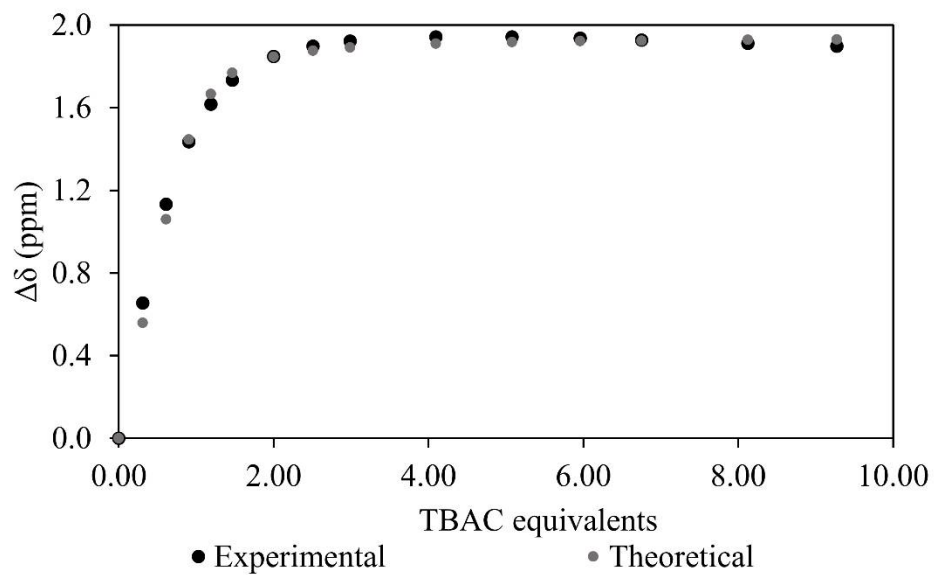
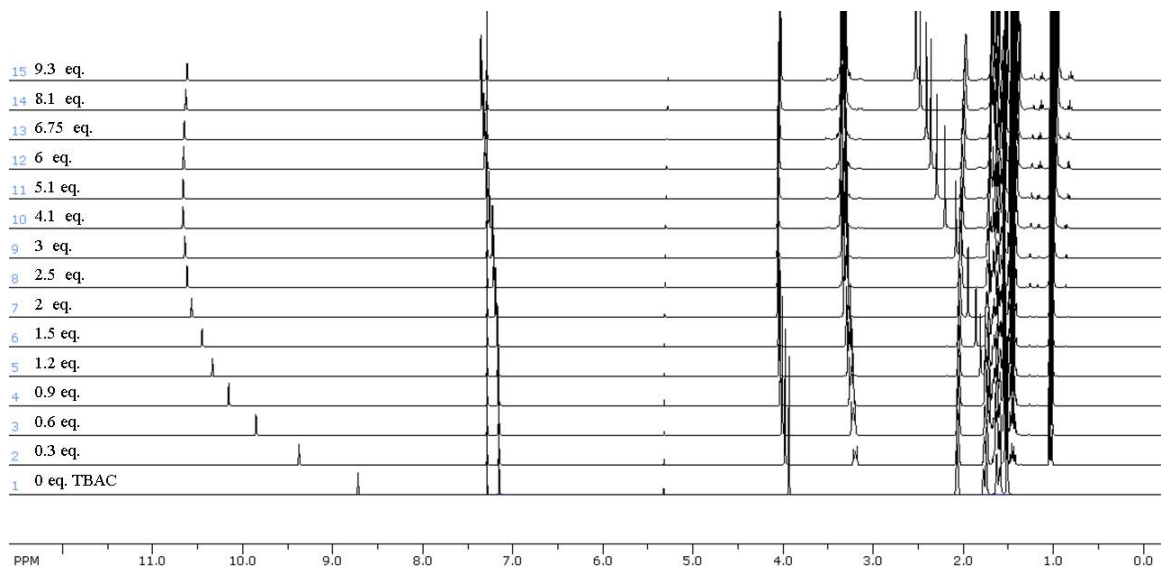


Figure A1.11 Stacked ^1H NMR spectra and titration curves of $[2.2 \cdot \text{NTf}_2] = 12.5$ mM with TBAC (400 MHz, CDCl_3 , 298 K).

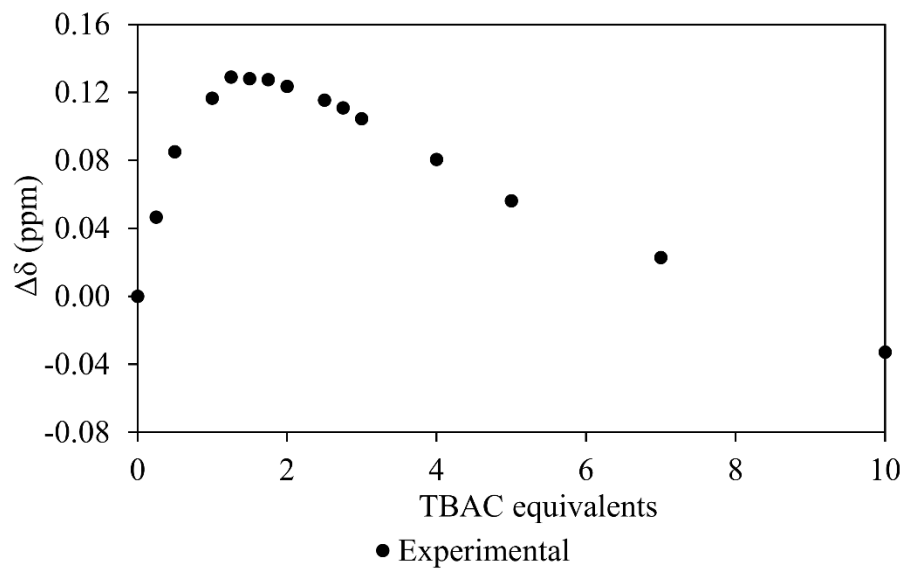
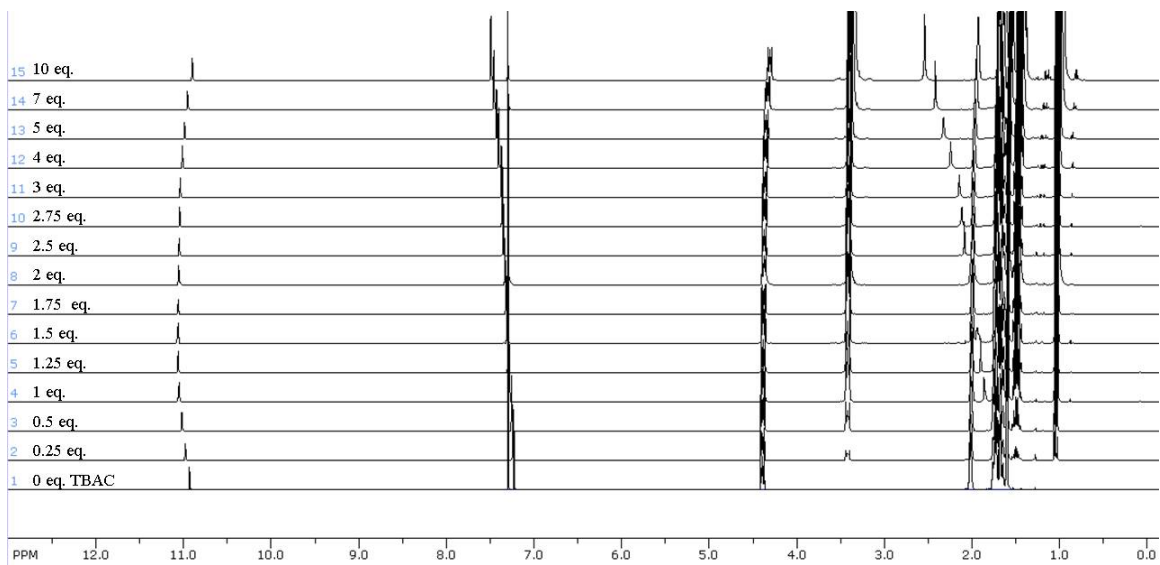


Figure A1.12 Stacked ^1H NMR spectra and titration curves of $[\mathbf{2.3}\cdot\text{Br}] = 12.5$ mM with TBAC (400 MHz, CDCl_3 , 298 K).

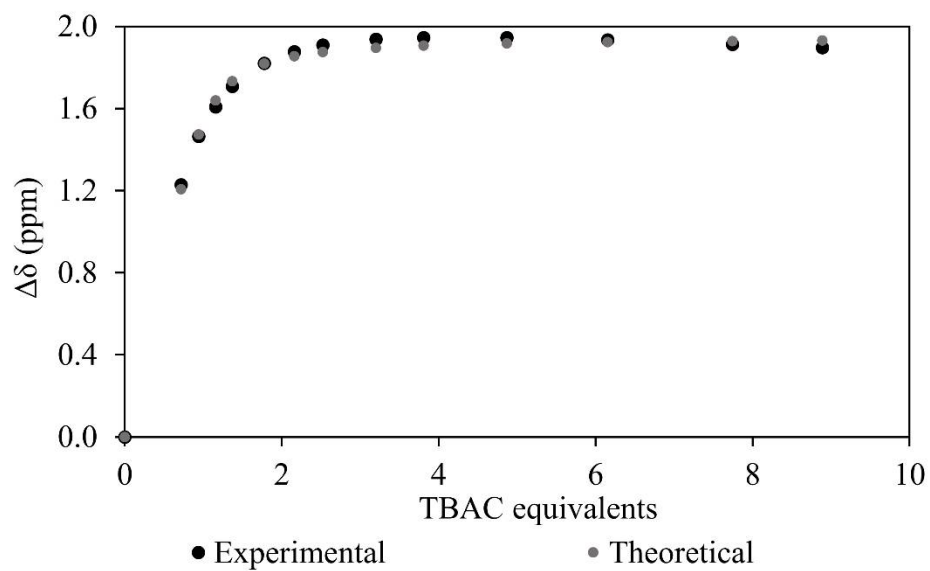
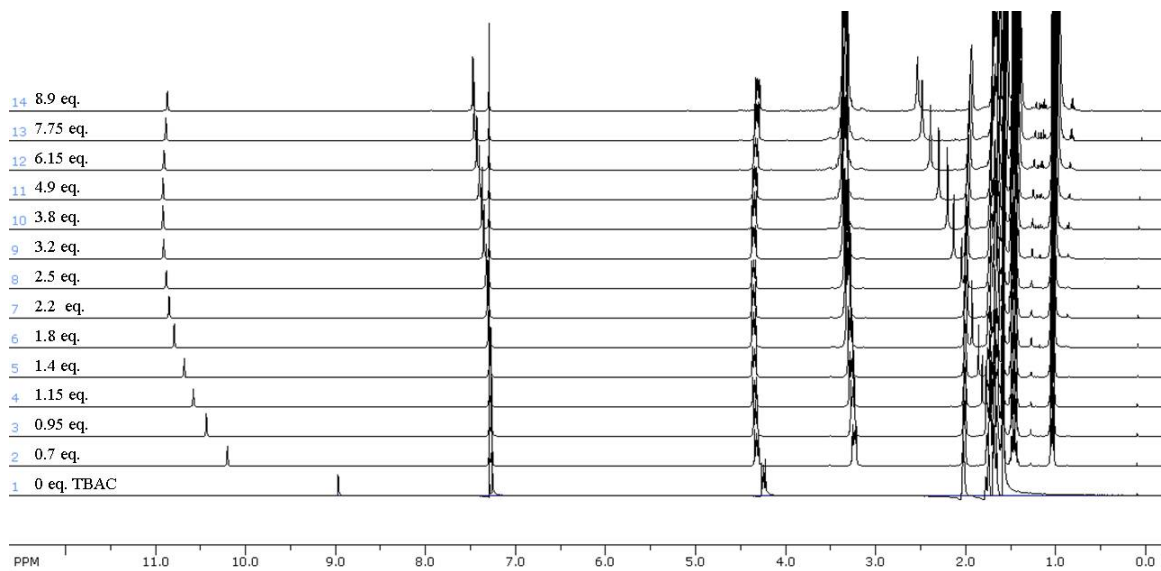


Figure A1.13 Stacked ^1H NMR spectra and titration curves of $[\mathbf{2.3} \cdot \text{NTf}_2] = 12.5$ mM with TBAC (400 MHz, CDCl_3 , 298 K).

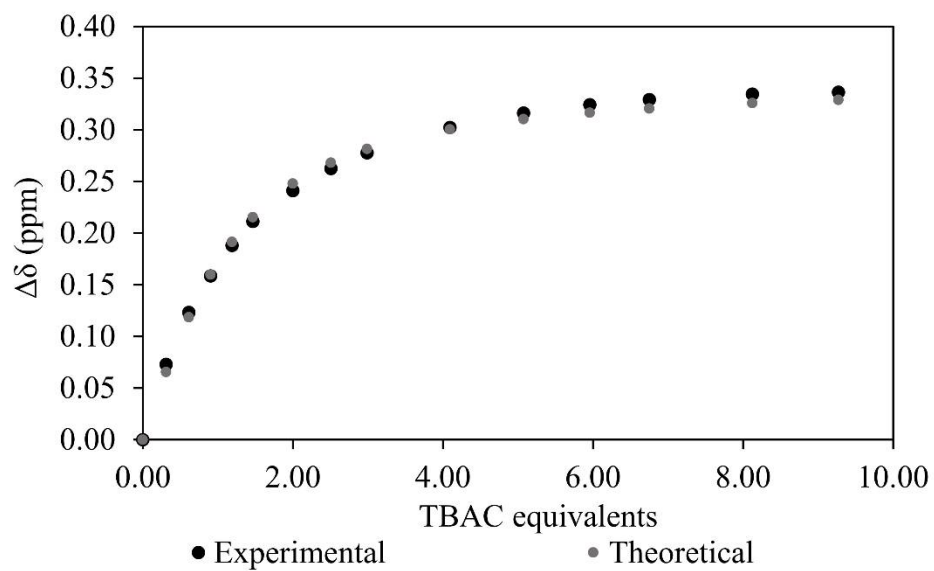
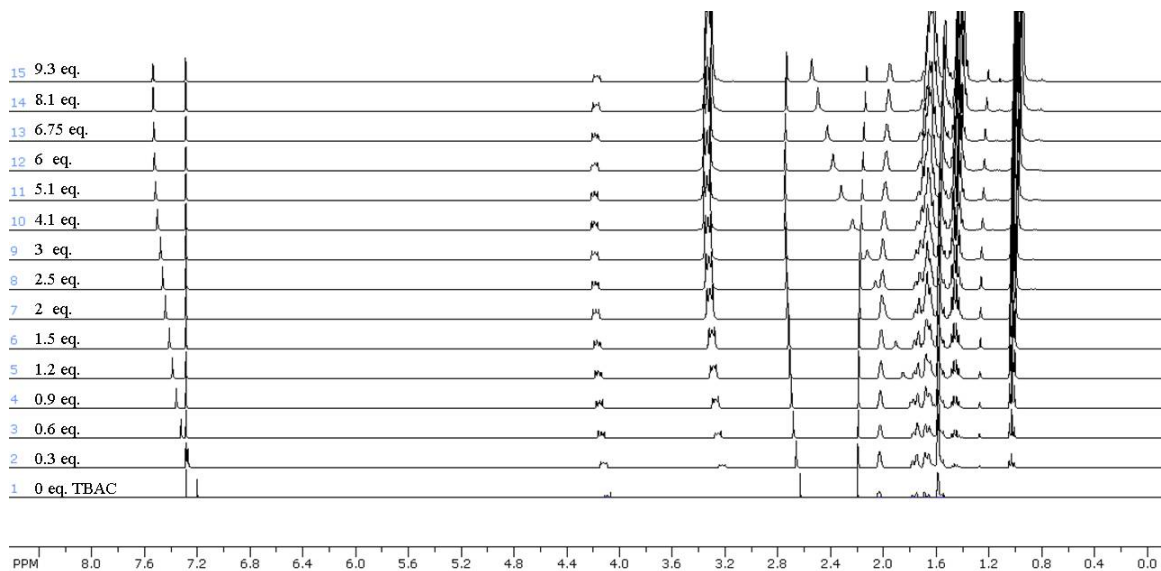


Figure A1.14 Stacked ^1H NMR spectra and titration curves of $[\mathbf{2.4} \cdot \text{NTf}_2] = 12.5$ mM with TBAC (400 MHz, CDCl_3 , 298 K).

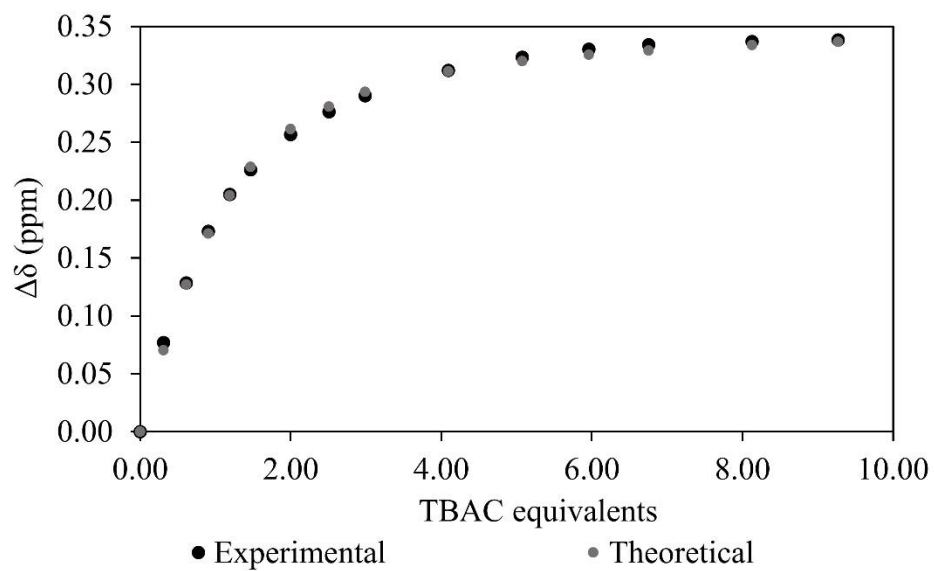
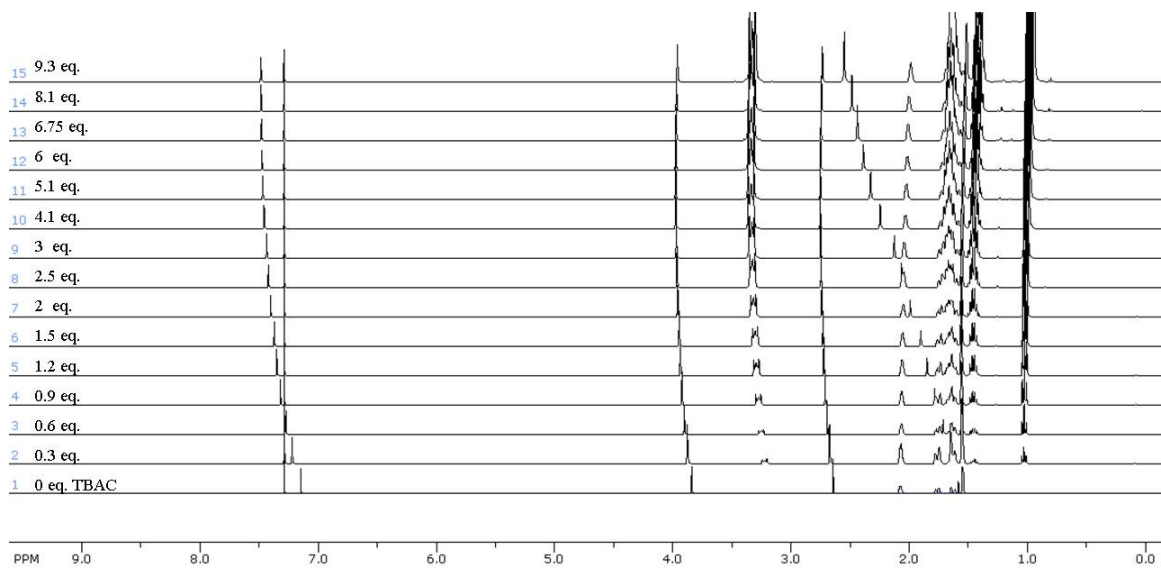


Figure A1.15 Stacked ^1H NMR spectra and titration curves of $[\mathbf{2.5} \cdot \text{NTf}_2] = 12.5$ mM with TBAC (400 MHz, CDCl_3 , 298 K).

HPTS-based fluorescence assays

Preparation of EYPC liposomes for HPTS-based fluorescence assays

The procedures were the same as the “*Preparation of EYPC liposomes for lucigenin-based fluorescence assays*”, except that the lucigenin was replaced by a HPTS solution of 0.1 mM containing 100 mM of NaCl or NaClO₄.

HPTS-based fluorescence assays with EYPC liposomes

The procedures were the same as the “*Lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes*”, except that it was with the liposomes containing the HPTS probe.

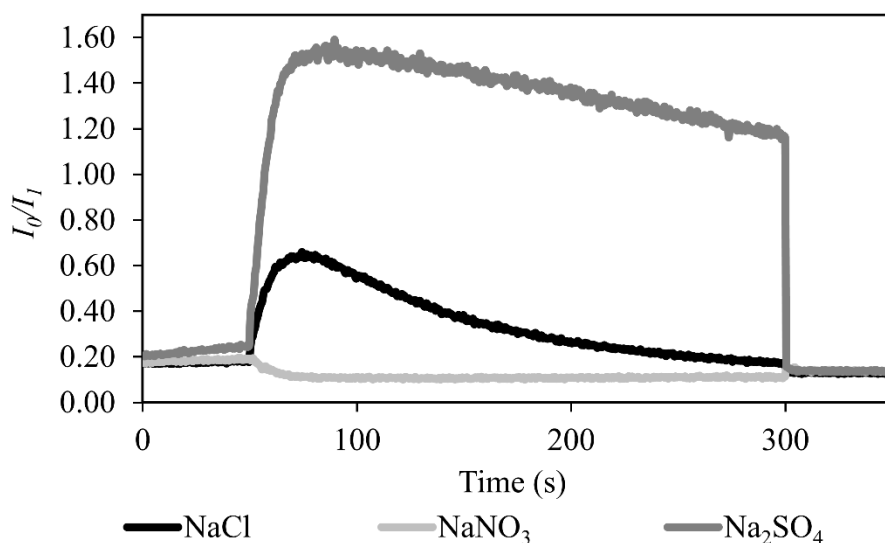


Figure A1.16 HPTS-based transport assay of imidazolium salt **2.3**·NTf₂ at 15 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 0.1 HPTS, 100 mM NaOCl₄, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2). Extravesicular: 100 mM NaX or Na₂X, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2).

U-tube experiments

U-tube experiments were performed in a U-shaped glass tube in which two aqueous phases were separated by a bulk hydrophobic solvent, such as chloroform.³ U-tube experiments were performed with transporter **2.3·NTf₂** in order to confirm the carrier transport mechanism.

If the transporter **2.3·NTf₂** transported NO₃⁻ anions that were paired with the lucigenin dication across the bulk organic liquid membrane, fluorescence would increase over time.

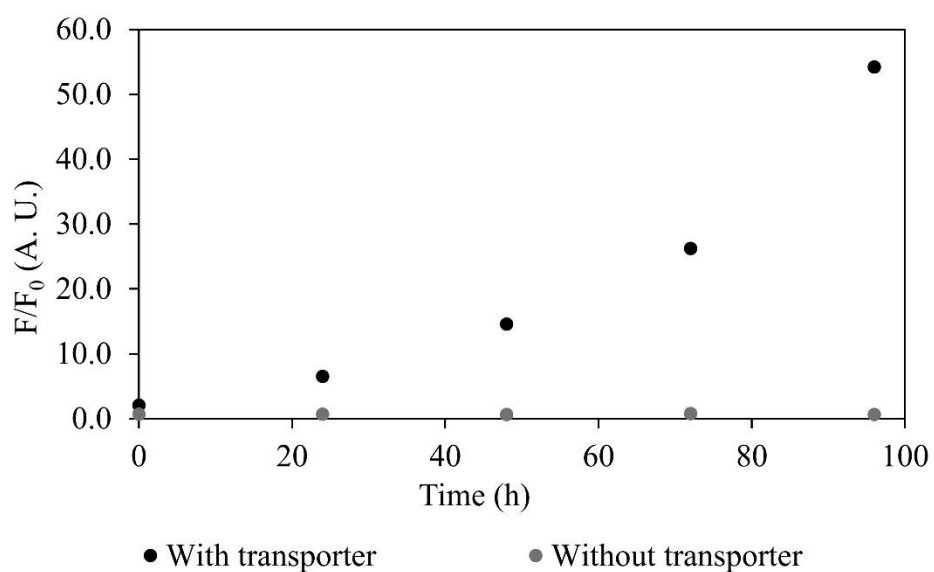
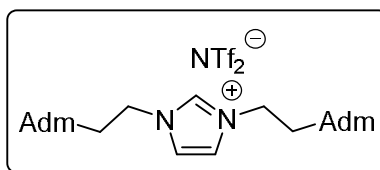


Figure A1.17 U-tube experiment results. The aqueous phase contains 5 mL 0.1 mM aqueous lucigenin. The organic liquid membrane is composed of 10 mL CHCl₃ with transporter **2.3·NTf₂** (1 mM) or without. Fluorescence results are from the receiving phase.

U-tube experiments were conclusive with compound **2.3·NTf₂** transporting NO₃⁻ using a carrier mechanism. Paired with EYPC:Cholesterol and DPPC studies, the evidence demonstrates that molecule **2.3·NTf₂** transport anion by a carrier mechanism.

Annexe 2 : Informations supplémentaires de l'article 2
« Host-guest strategy to reversibly control a chloride carrier process with cyclodextrins »

Synthesis



3.1: 1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide

The syntheses and characterization of **3.1** were already reported in the literature.⁴

Crystals of **3.1** were obtained from a MeOH:H₂O 1:1 solution by slow evaporation over three days at room temperature. Crystals of the supramolecular complex of **3.1** with β -cyclodextrin (β CD) **3.1:(β CD)₂** were obtained by solubilizing **3.1** (100 mg, 0.15 mmol) in 2 mL MeOH and pouring over a solution of β CD (340 mg, 0.30 mmol) in 4 mL of H₂O. The solution was separated into multiple vials containing a fraction of the stock solution (1 mL) and was then slowly evaporated over a week at 4°C to yield a crystalline solid.

¹H NMR Spectroscopic Analysis

¹H NMR Job's Method. Job's method experiments were used to determine the stoichiometry of the complex between **3.1** and β CD. Samples were prepared at total concentration of 2 mM while varying the molar ratios of the components. ¹H upfield shifts of lower field signals of the adamantyl moiety were observed and used to determine the stoichiometry of the complex. Maximum $\Delta\delta$ was obtained at 0.33 mole fraction of **3.1** indicating the formation of a 1:2 complex of **3.1** and 2 β CDs. Job's analysis was performed twice (figure 3.4).

¹H NMR titrations. Titration experiments were performed in D₂O:CD₃CN 1:1 solution. Upfield shifts of ¹H of the adamantyl moiety were observed and used to determine the association constants (K_a , K_1 and K_2). All titration experiments were performed at least twice. The values of the association constants were calculated using the WinEQNMR2 software.⁵ Guests used were **3.1**, adamantanol (AdmOH), adamantanemethanol (AdmMeOH), adamantaneethanol

(AdmEtOH), adamantylamine (AdmNH₂), adamantylmethylamine (AdmMeNH₂), and adamantanecarboxylic acid (AdmCOOH) and were titrated with β CD.

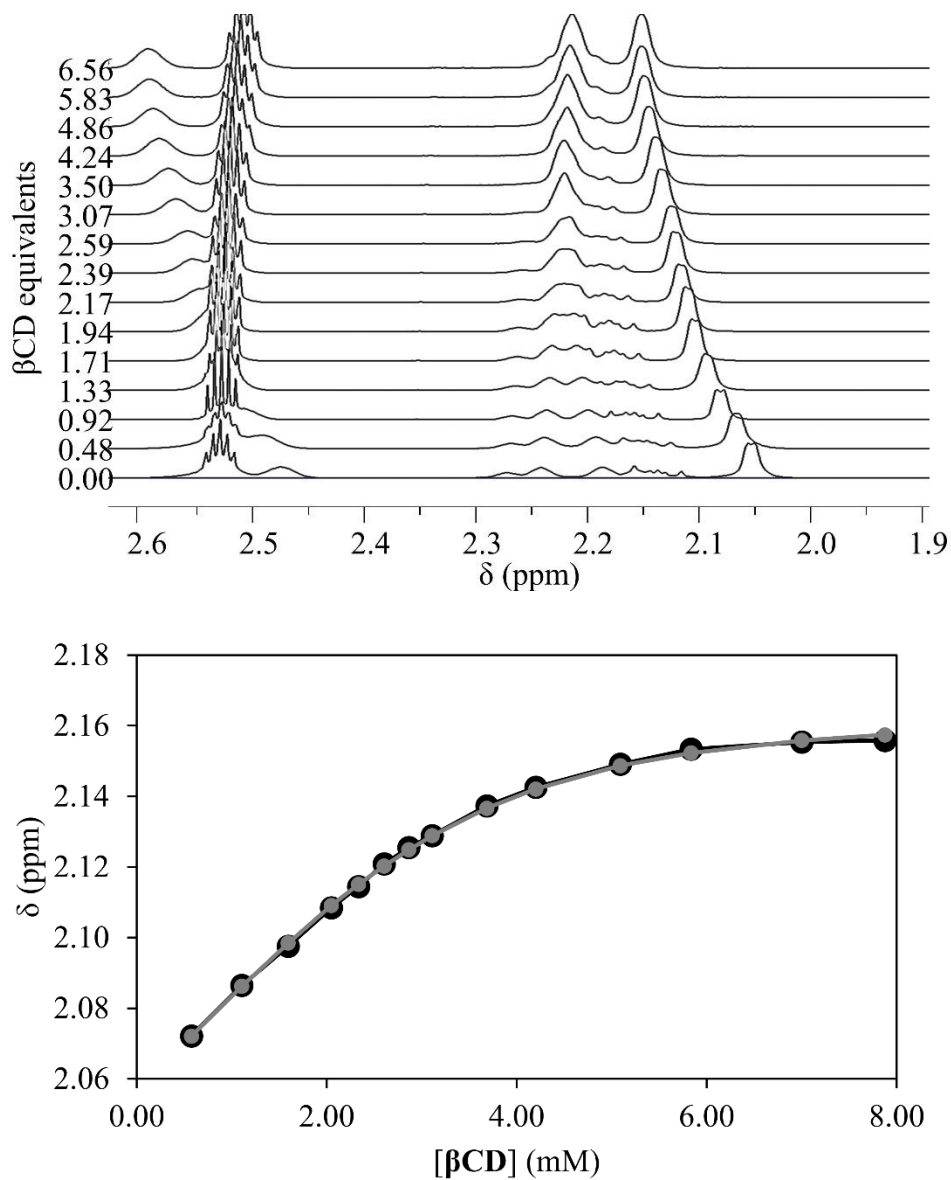


Figure A2.1 ¹H NMR titration of **3.1** with β CD. Partial ¹H NMR spectra of **3.1** at 1.2 mM with different concentration of β CD recorded at 298 K in D₂O:CD₃CN 1:1 and ¹H NMR experimental chemical shift plotted against the β CD concentration (black) and theoretical curve fitting (grey) providing $K_1 = 400 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ and $K_2 = 1800 \pm 100 \text{ M}^{-1}$.

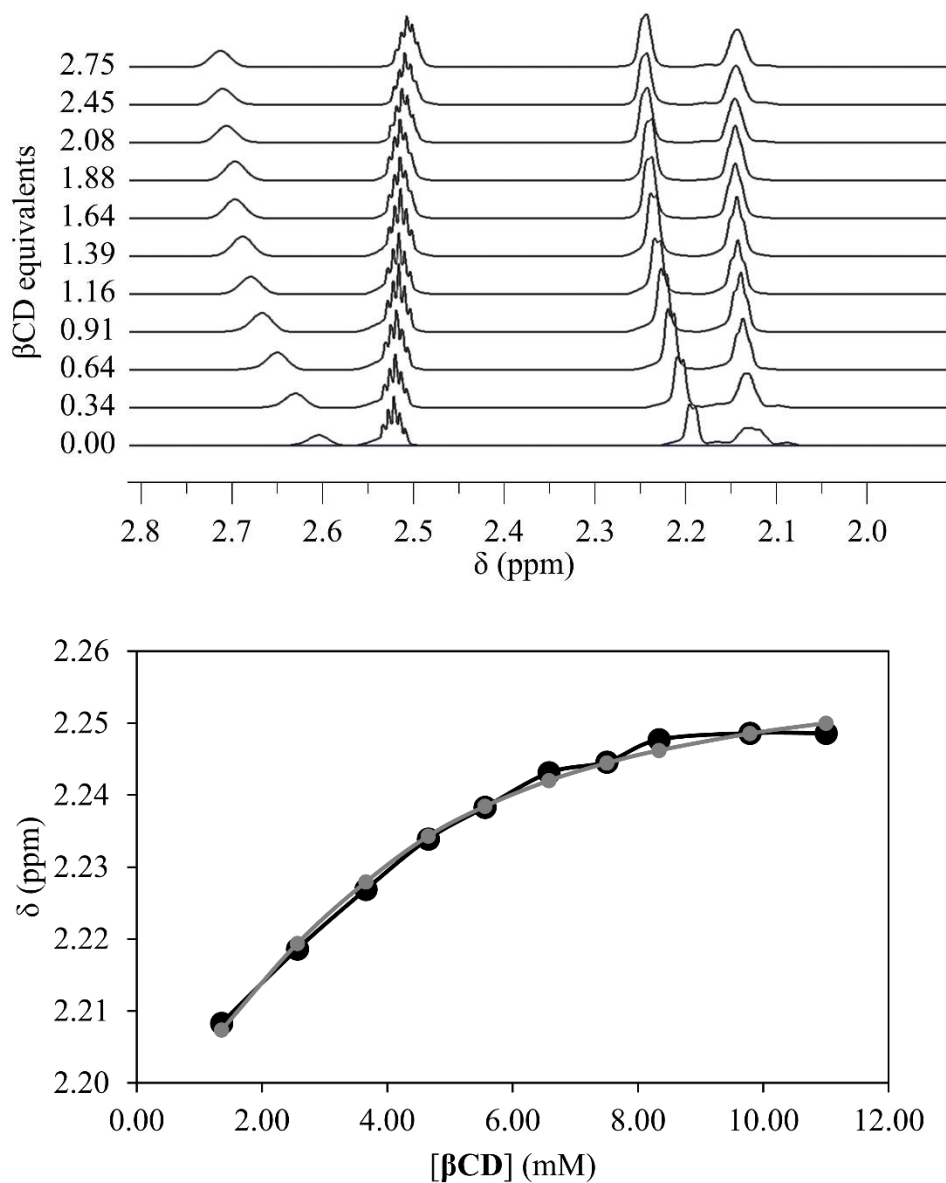


Figure A2.2 ¹H NMR titration of AdmOH with βCD. Partial ¹H NMR spectra of AdmOH at 4.0 mM with different concentration of βCD recorded at 298 K in D₂O:CD₃CN 1:1 and ¹H NMR experimental chemical shift plotted against βCD concentration (black) and theoretical curve fitting (grey) providing $K_a = 800 \pm 200 \text{ M}^{-1}$.

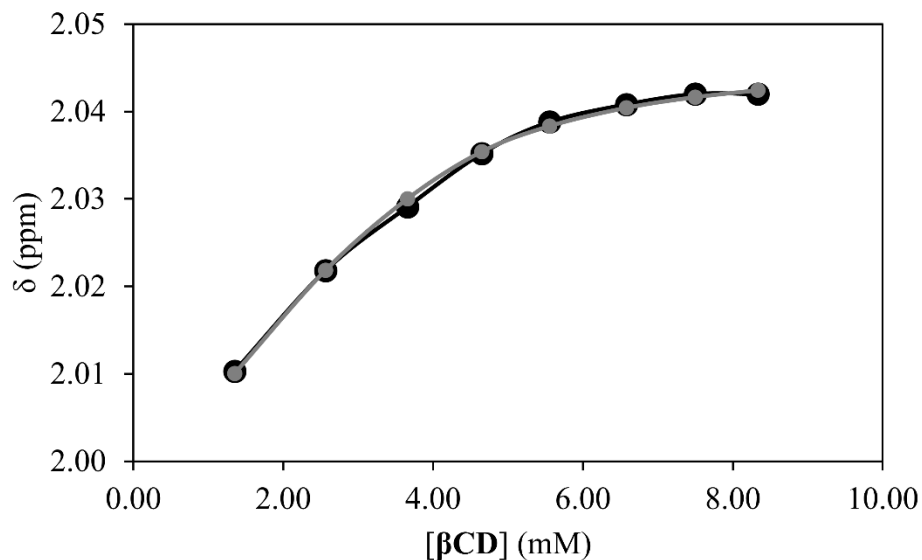
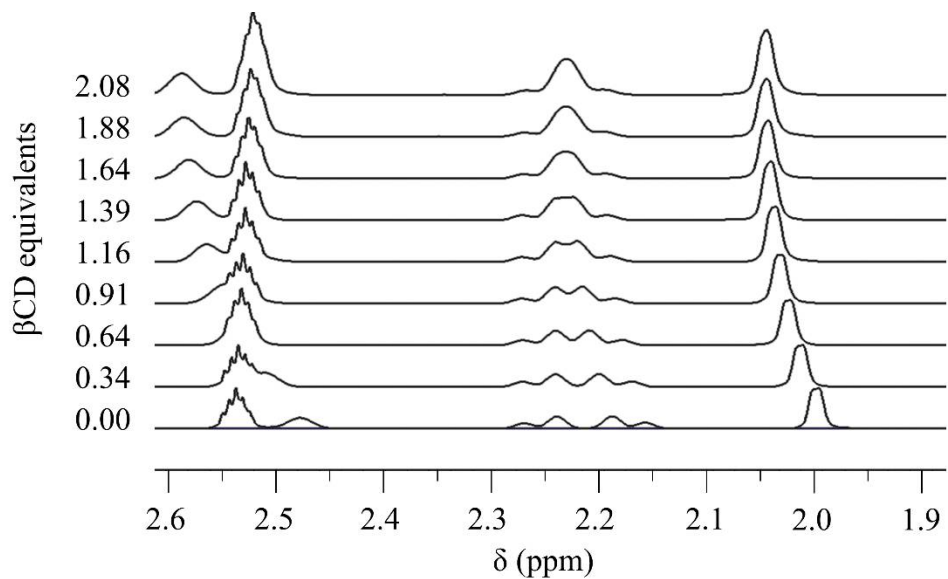


Figure A2.3 ^1H NMR titration of AdmMeOH with β CD. Partial ^1H NMR spectra of AdmMeOH at 4.0 mM with different concentration of β CD recorded at 298 K in $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ 1:1 and ^1H NMR experimental chemical shift plotted against β CD concentration (black) and theoretical curve fitting (grey) providing $K_a = 2300 \pm 400 \text{ M}^{-1}$.

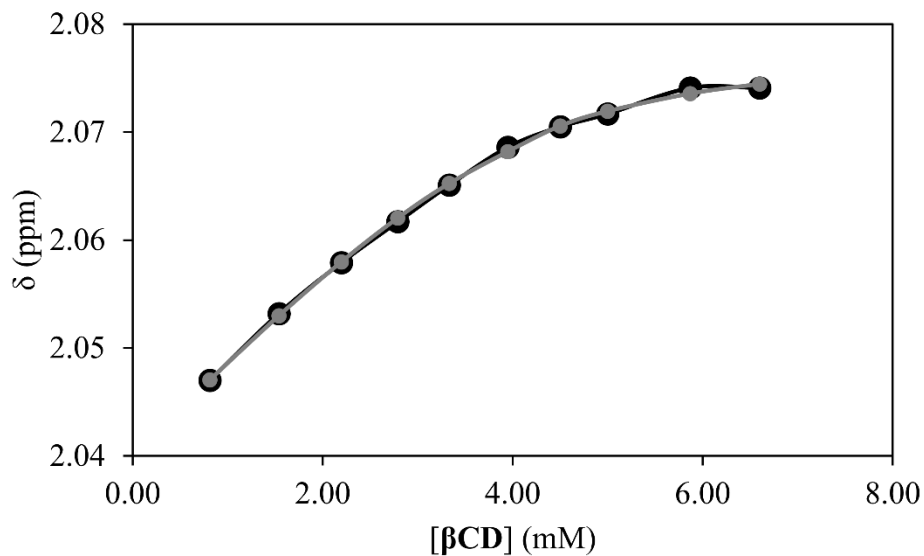
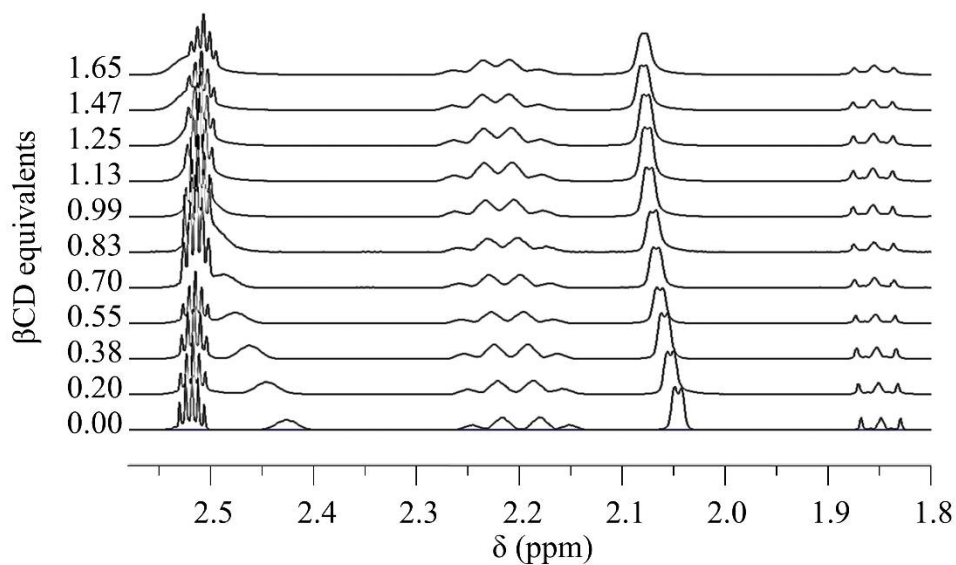


Figure A2.4 ^1H NMR titration of AdmEtOH with βCD . Partial ^1H NMR spectra of AdmEtOH at 4.0 mM with different concentration of βCD recorded at 298 K in $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ 1:1 a ^1H NMR experimental chemical shift plotted against βCD concentration (black) and theoretical curve fitting (grey) providing $K_a = 3000 \pm 100 \text{ M}^{-1}$.

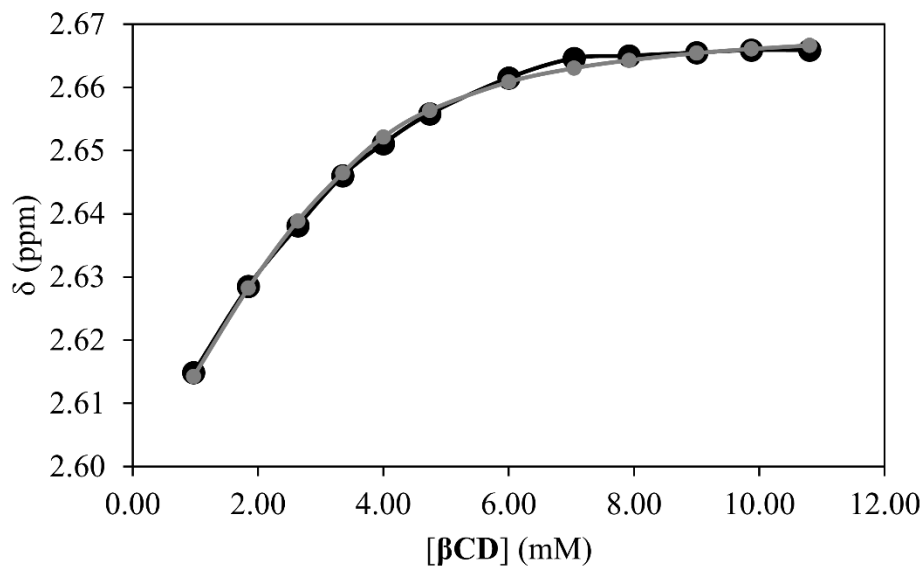
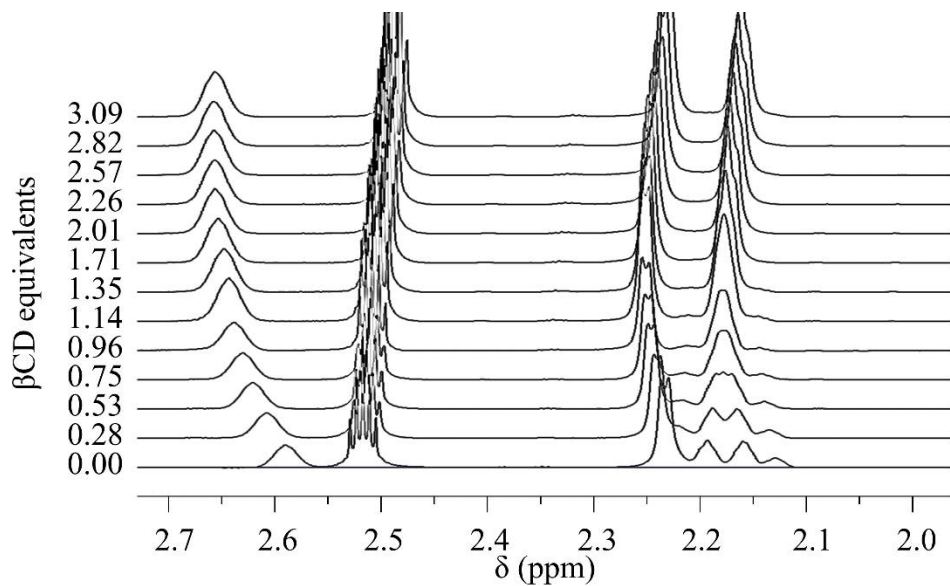


Figure A2.5 ^1H NMR titration of AdmNH_2 with βCD . Partial ^1H NMR spectra of AdmNH_2 at 3.5 mM with different concentration of βCD recorded at 298 K in $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ 1:1 and ^1H NMR experimental chemical shift plotted against βCD concentration (black) and theoretical curve fitting (grey) providing $K_a = 1800 \pm 200 \text{ M}^{-1}$.

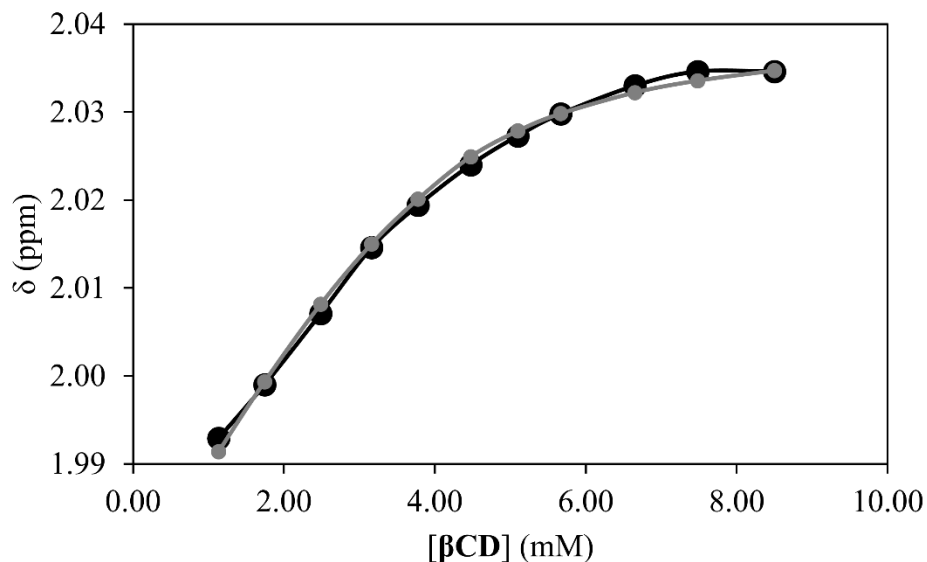
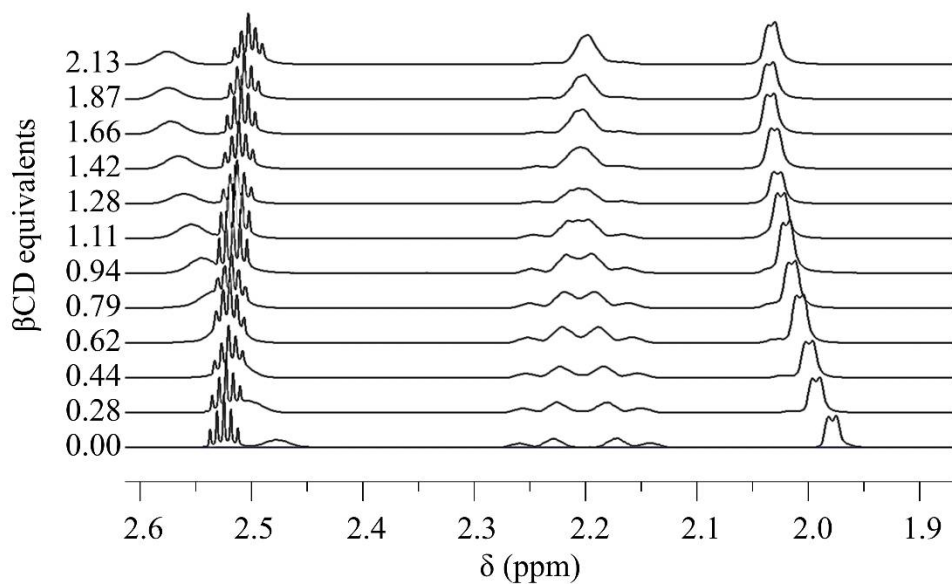


Figure A2.6 ^1H NMR titration of AdmMeNH_2 with βCD . Partial ^1H NMR spectra of AdmMeNH_2 at 4.0 mM with different concentration of βCD recorded at 298 K in $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ 1:1 and ^1H NMR experimental chemical shift plotted against βCD concentration (black) and theoretical curve fitting (grey) providing $K_a = 2300 \pm 100 \text{ M}^{-1}$.

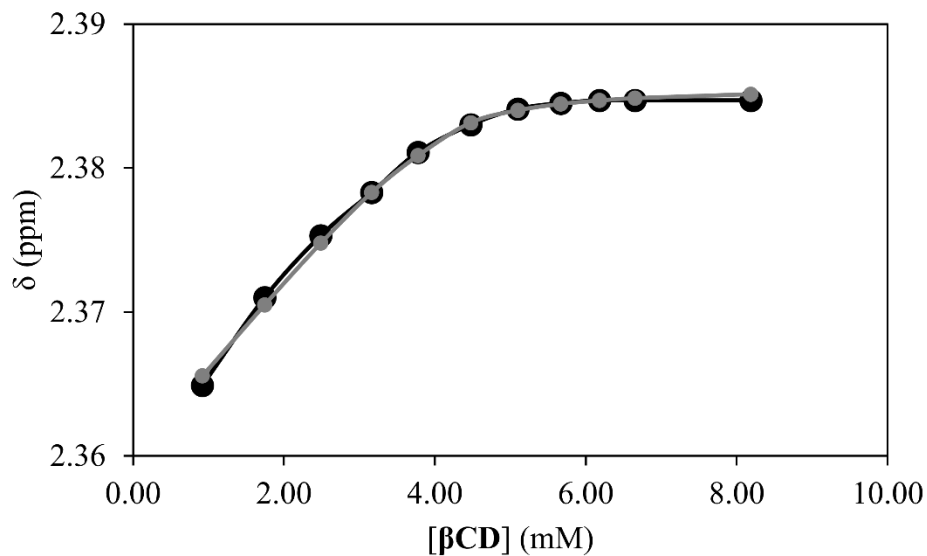
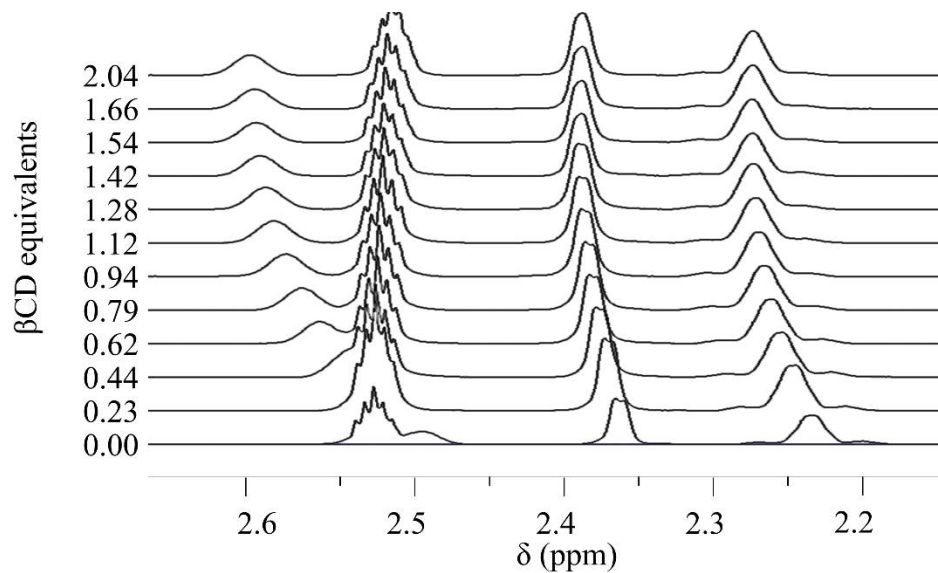


Figure A2.7 ^1H NMR titration of AdmCOOH with βCD . Partial ^1H NMR spectra of AdmCOOH at 4.0 mM with different concentration of βCD recorded at 298 K in $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ 1:1 and ^1H NMR experimental chemical shift plotted against βCD concentration (black) and theoretical curve fitting (grey) providing $K_a = 10200 \pm 200 \text{ M}^{-1}$.

Mass spectrometry

Accurate mass measurements were performed on a LC-TOF 6224 instrument equipped with an electrospray ion source from Agilent Technologies. A sample of **3.1:(β CD)₂** in MeOH:H₂O 1:1 was infused at 10 μ L/min with a syringe pump and mass spectra were acquired from m/z 100 to 3200 in positive mode.

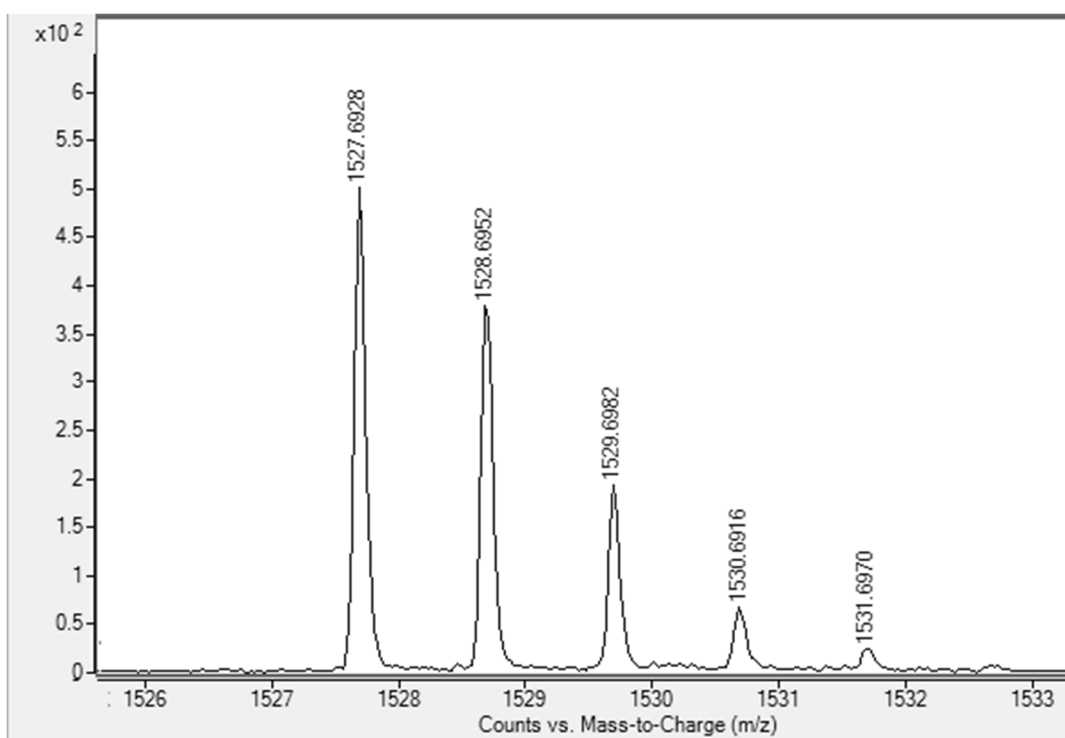


Figure A2.8 Partial mass spectrum of the supramolecular complex **3.1: β CD** showing the ion $[3.1:\beta\text{CD}]^+$.

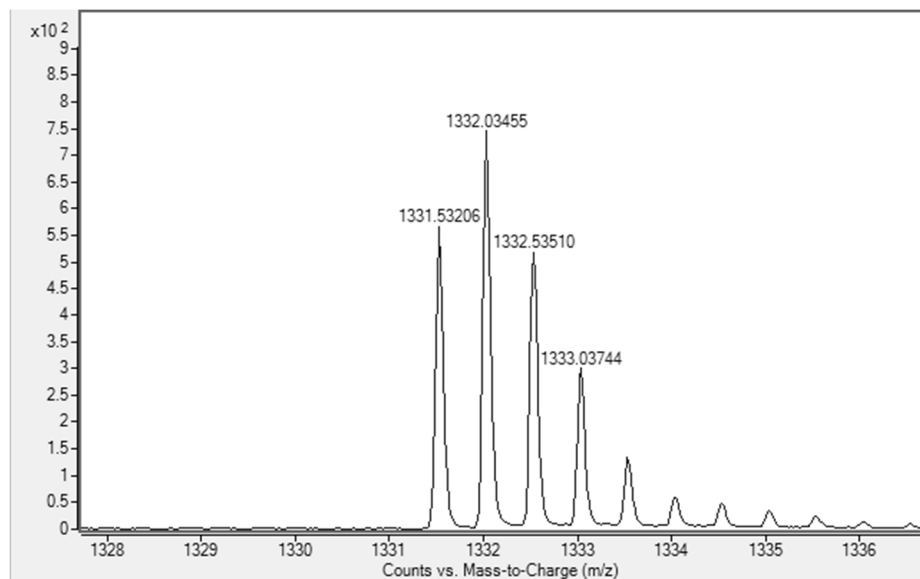


Figure A2.9 Partial mass spectrum of the supramolecular complex **3.1:(βCD)₂** showing the ion **[3.1:βCD₂ + H]²⁺**.

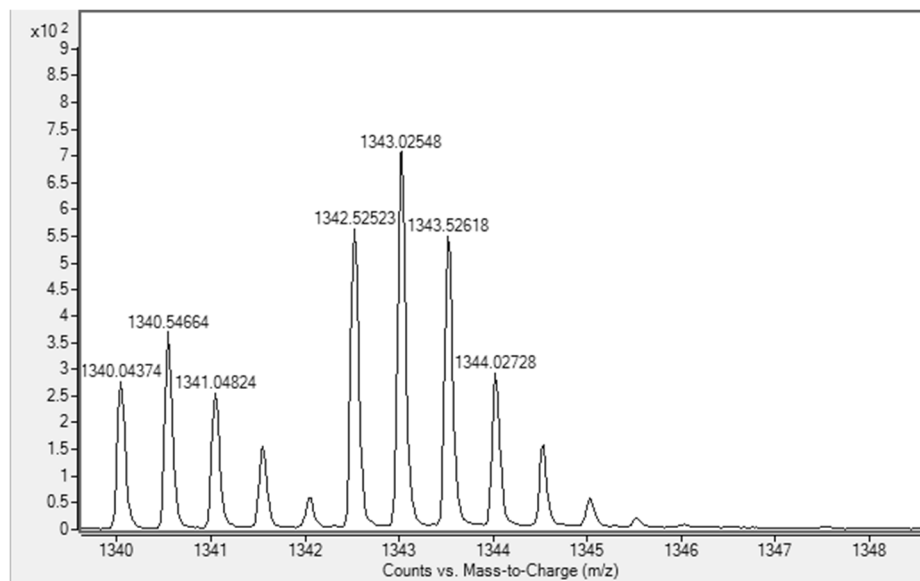


Figure A2.10 Partial mass spectrum of the supramolecular complex **3.1:(βCD)₂** showing the ions **[3.1:(βCD)₂ + NH₄]²⁺** and **[3.1:(βCD)₂ + Na]²⁺**.

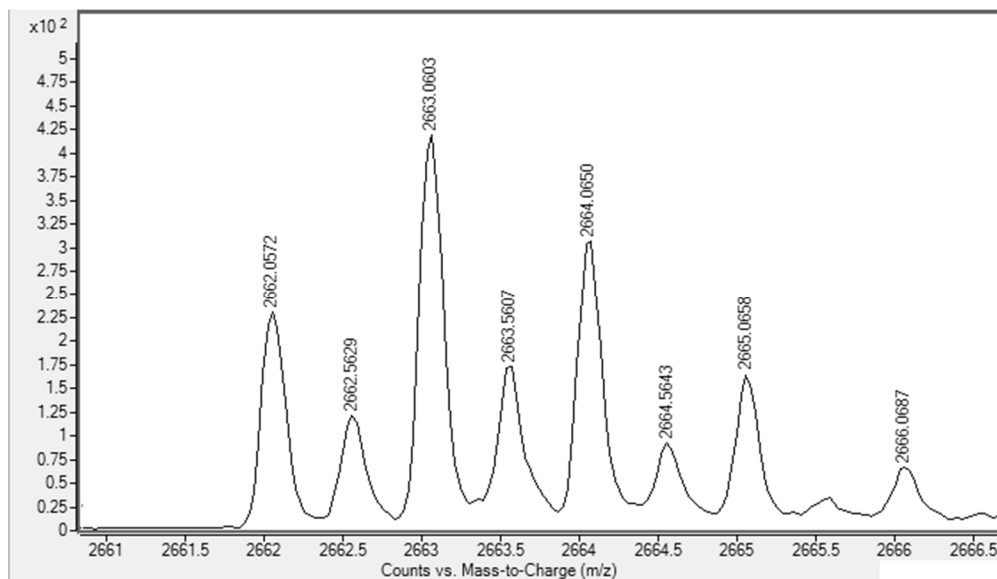


Figure A2.11 Partial mass spectrum of the supramolecular complex **3.1:(β CD)₂** showing the ion **[3.1:(β CD)₂]⁺** with the overlapping **[(3.1:(β CD)₂)₂]²⁺**.

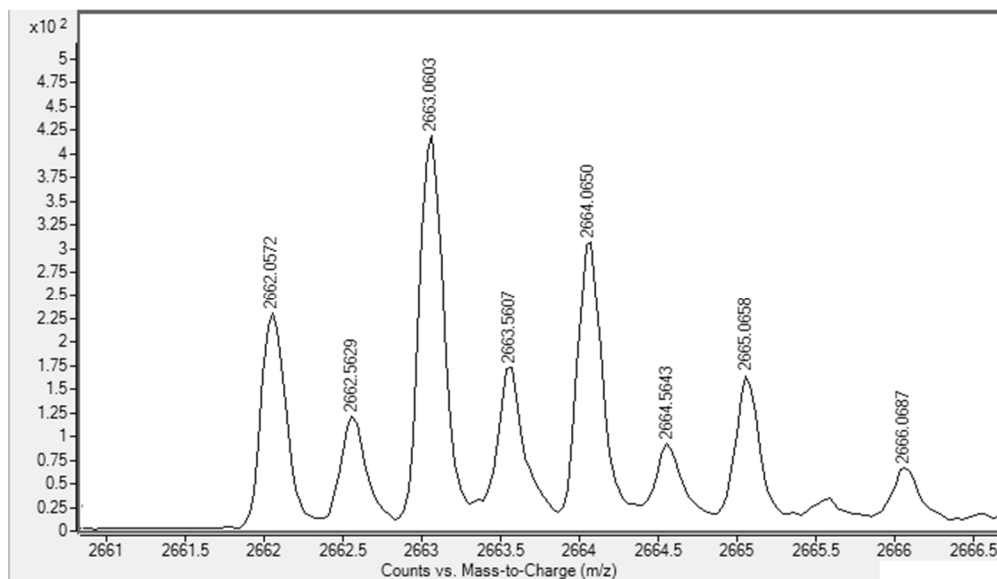


Figure A2.12 Partial mass spectrum of the supramolecular complex **(3.1:(β CD)₂)₂** showing the ion **[(3.1:(β CD)₂)₂]²⁺**.

Table A2.1 Mass spectrometry results (ESI positive mode) for **3.1:βCD** and **3.1:(βCD)₂**.

Entry	Species	Calc (m/z)	Exp (m/z)	Diff (ppm)
1	[1:βCD] ⁺	1527.6962	1527.6928	2.22
2	[1:(βCD)₂+H] ²⁺	1331.5366	1331.5321	3.42
3	[1:(βCD)₂+NH₄] ²⁺	1340.04989	1340.0437	4.59
4	[1:(βCD)₂+Na] ²⁺	1342.5276	1342.5252	1.76
5	[1:(βCD)₂] ⁺	2662.0660	2662.0572	-0.47
6	[(1:(βCD)₂)₂] ⁺	2662.0660	2662.0676	-0.62

Lucigenin-based fluorescence assays

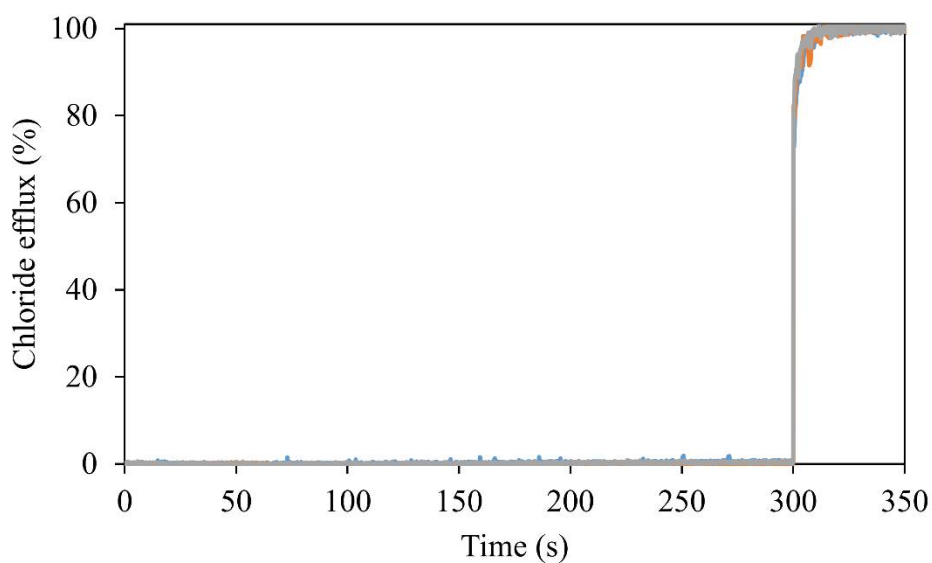


Figure A2.13 Relative chloride transport activity of α CD, β CD and γ CD at 100 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 2 mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2).

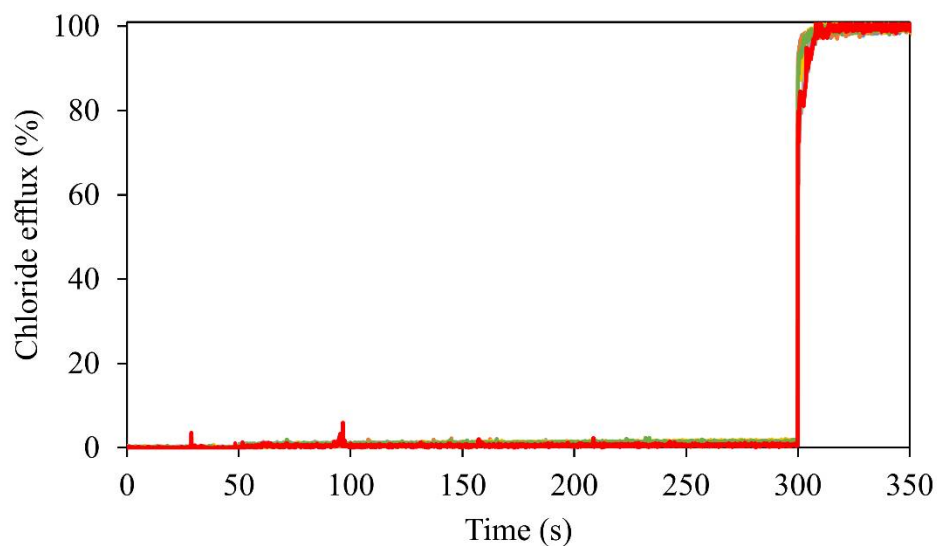


Figure A2.14 Relative chloride transport activity of AdmOH, AdmMeOH, AdmEtOH, AdmNH₂, AdmMeNH₂ and AdmCOOH at 100 mol% relative to EYPC. Intravesicular: 2 mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2).

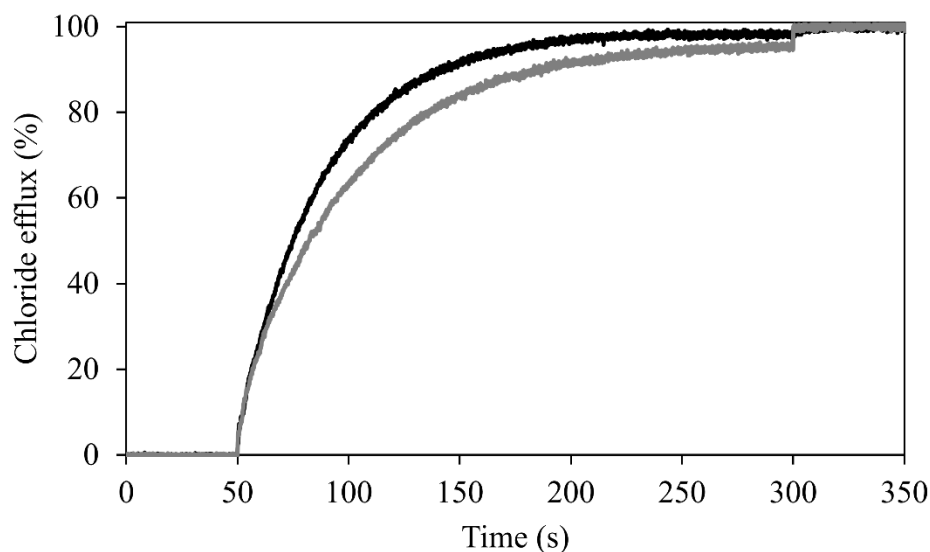


Figure A2.15 Relative chloride transport activity of **3.1** (black) at 20 mol% relative to EYPC compared to a solution of **3.1** at 20 mol% containing 10 eq. of α CD (grey). Intravesicular: 2 mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2).

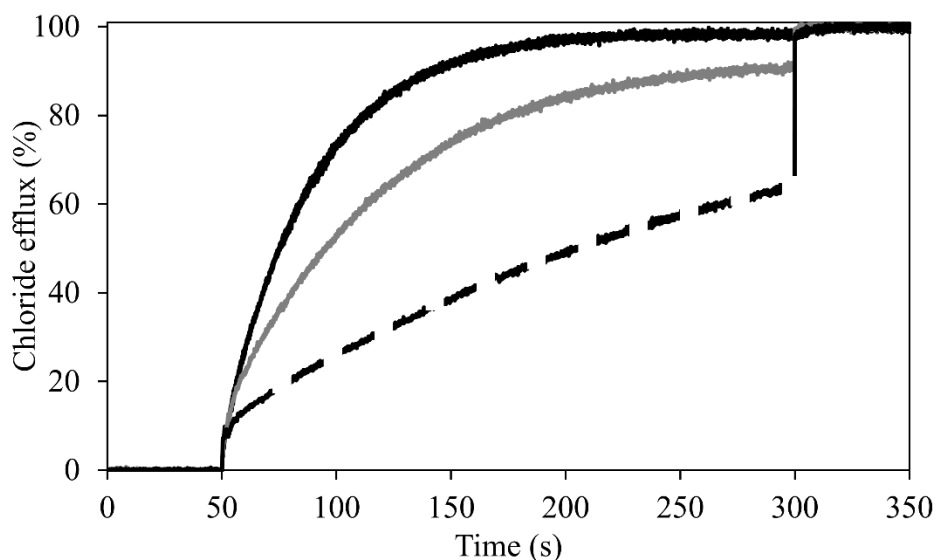


Figure A2.16 Relative chloride transport activity of **3.1** (black) at 20 mol% relative to EYPC compared to solutions of **3.1** at 20 mol% containing 1 eq. of γ CD (black), 5 eq. of γ CD (grey), and 10 eq. of γ CD (dashed). Intravesicular: 2 mM lucigenin, 100 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2). Extravesicular: 100 mM NaNO₃, 10 mM phosphate buffer (pH=6.2).

Inhibition of the transport process in lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes. The procedures were performed the same as the “*Lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes*” described in chapter 3, section 3.6, except that at $t = 50$ s, 50 μ L of **1** (2 mM) in MeOH was added and at $t = 100$ s, 50 μ L of β CD solution in H₂O at different concentrations was added.

Reversibility of the transport process in lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes. The procedures were performed the same as the “*Inhibition of the transport process in lucigenin-based fluorescence assays with EYPC liposomes*” described above, except that at $t = 50$ s, 50 μ L of **1** (2 mM) in MeOH were added, at $t = 75$ s, 40 μ L of β CD (4 eq., 10 mM) in H₂O were added, and at $t = 125$ s, 50 μ L of a competitive guest (AdmOH, AdmMeOH, or AdmEtOH; 5 eq., 10 mM) were added. Experiments were repeated twice to confirm reproducibility. For more clarity, all experiments were adjusted to one baseline and only one of the two experiments is shown.

BLM experiments

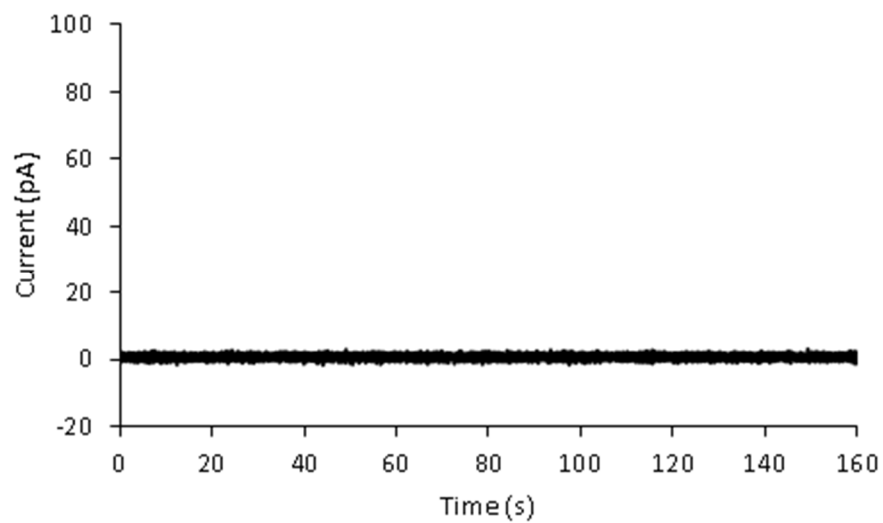


Figure A2.17 Conductance recording after the addition of β CD.

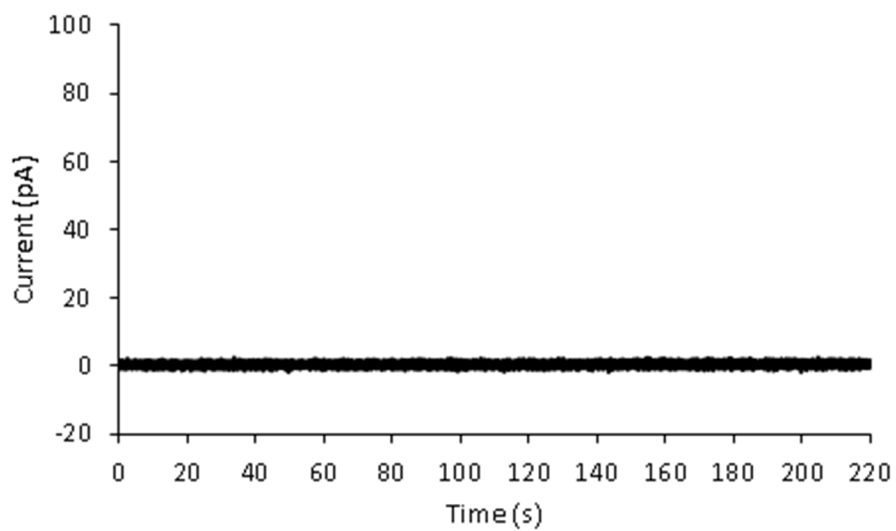


Figure A2.18 Conductance recording after the addition of AdmEtOH.

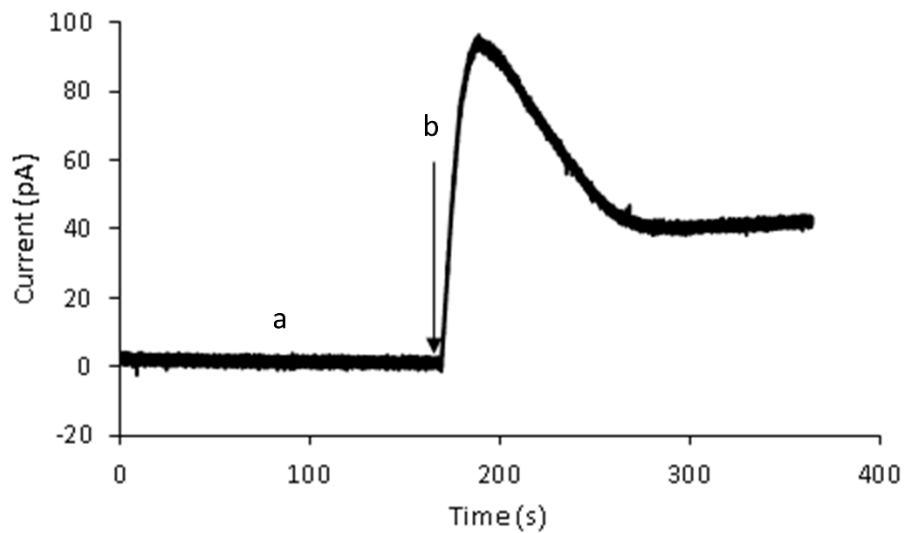


Figure A2.19 Anion transport process of a mixture of **3.1** and β CD: a) conductance recording for the DPhPC membrane, b) addition of **3.1** + 1 eq. of β CD.

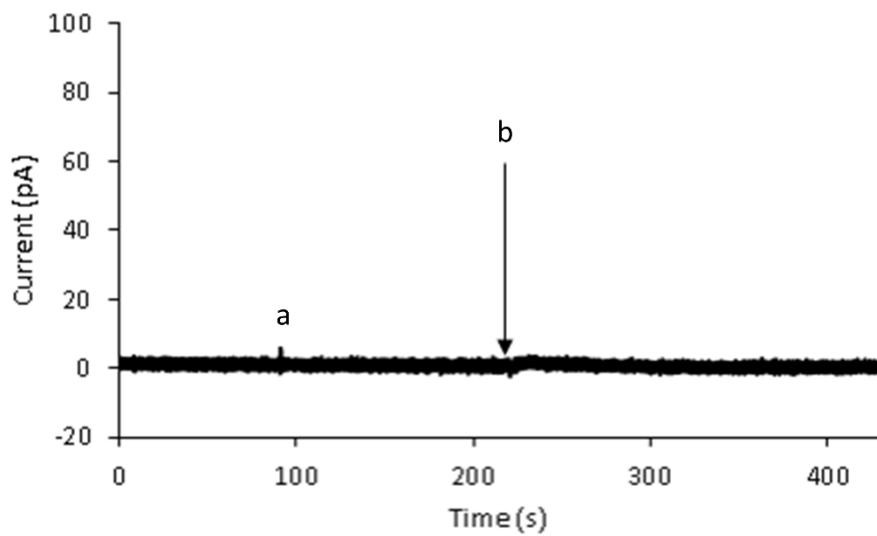


Figure A2.20 Anion transport process of a mixture of **3.1** and β CD: a) conductance recording for the DPhPC membrane, b) addition of **3.1** + 2 eq. of β CD.

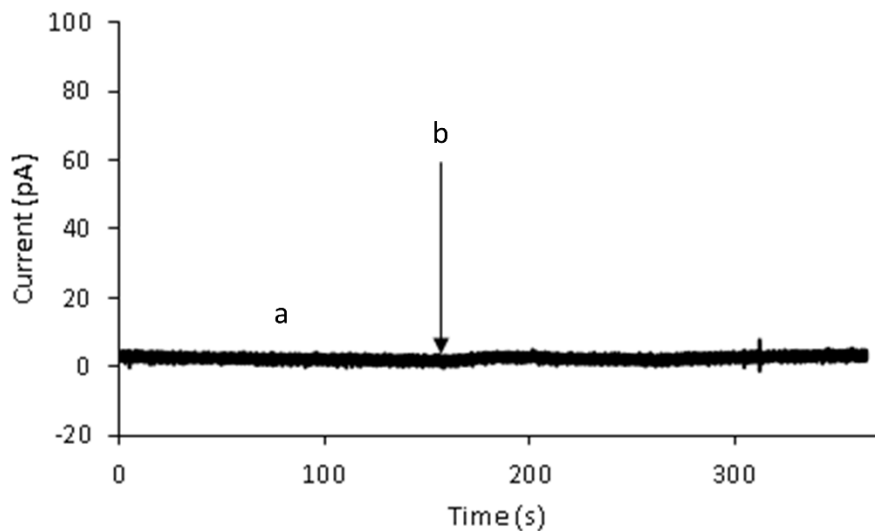


Figure A2.21 Anion transport process of a mixture of **3.1** and β CD: a) conductance recording for the DPhPC membrane, b) addition of **3.1** + 3 eq. of β CD.

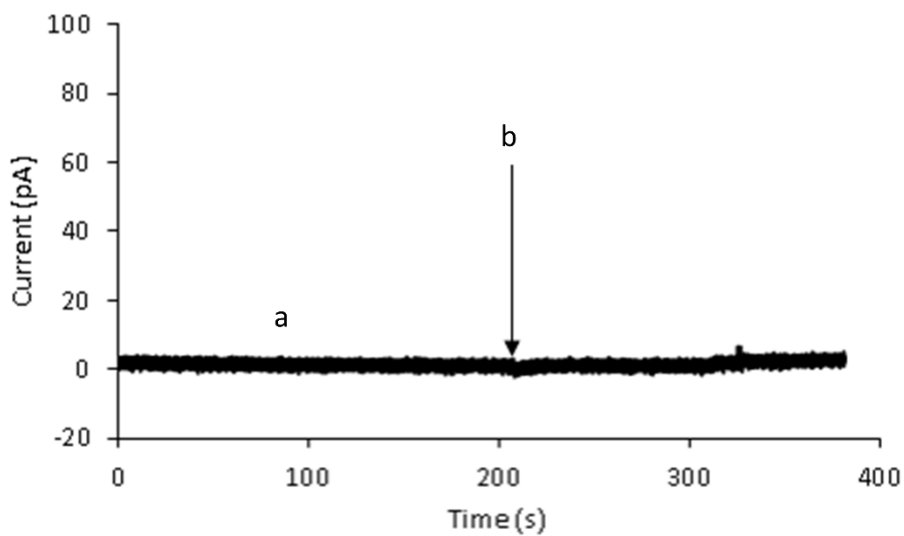


Figure A2.22 Anion transport process of a mixture of **3.1** and β CD: a) conductance recording for the DPhPC membrane, b) addition of 1 + 4 eq. of β CD.

Reversible anion transport experiments. With a stable membrane, 20 μL of a 5 mM solution of **3.1** in DMSO was added in the cis chamber and manually agitated (gently, with a borosilicate pipette). After stabilization of the current, 10 μL of a 20 mM solution of βCD was added in the cis chamber and manually agitated. After stabilization of the current, 20 μL of a 20 mM solution of adamantaneethanol was added to the cis chamber and manually agitated. All experiments were observed upon the application of a potential of 50 mV and were reproduced at least twice.

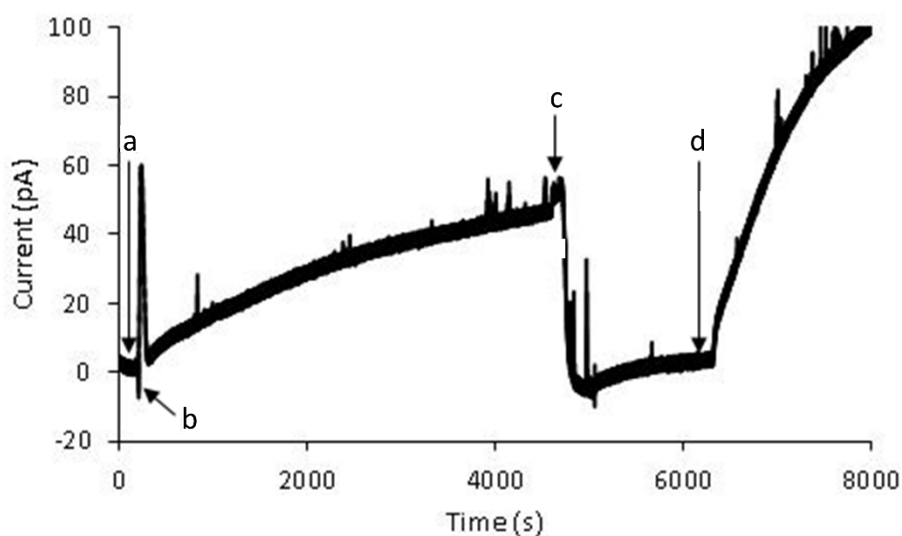
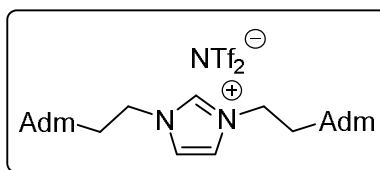


Figure A2.23 Reversible anion transport process in BLM bilayer experiment: a) conductance recording for the DPhPC membrane, b) addition of **3.1**, c) Addition of βCD , d) addition of AdmEtOH.

Transport inhibition from the trans side of the membrane. With a stable membrane, 20 μL of a 5 mM solution of **3.1** in DMSO was added in the cis chamber and manually agitated (gently, with a borosilicate pipette). After stabilization of the current, 20 μL of a 20 mM solution of βCD was added in the trans chamber and manually agitated, twice.

Annexe 3 : Informations supplémentaires de l'article 3
**« Host–guest strategy to potently camouflage and restore
the activity and toxicity of drugs affecting bacterial growth
and viability »**

Synthesis



3.1: 1,3-bis(2-(adamantan-1-yl)ethyl)imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyle)imide

The syntheses and characterization of **3.1** were already reported in the literature.⁴

Biological assays

Preparation of the samples in the minimal inhibitory concentration (MIC) assays

To preserve supramolecular complexation, every sample was prepared in a water/MeOH solution, the solvents were evaporated and 1 mL of DMSO was used to dissolve compounds only prior to the MIC experiment.

Preparation of the **4.1:(β CD)₂** complex: **4.1** (8.4 mg, 0.012 mmol, 1 eq.) was dissolved in 1 mL of MeOH and was added to 1 mL of water containing the β CD (28.3 mg, 0.025 mmol, 2 eq.). The solution was then diluted to 5 mL with MeOH. Aliquots of 1 mL were separated in 5 vials and were dried under vacuum.

Preparation of **4.1:(β CD)₂:CG**: **4.1** (8.4 mg, 0.012 mmol, 1 eq.) and **CG** (4.5 mg, 0.025 mmol, 2 eq.) were dissolved in 1 mL of MeOH and the mixture was added to 1 mL of water containing the β CD (28.3 mg, 0.025 mmol, 2 eq.). The solution was then diluted to 5 mL with MeOH. Aliquots of 1 mL were separated in 5 vials and were dried under vacuum.

MIC assays

5 mL of lysogeny broth (LB) medium was inoculated with *B. thuringiensis* (HD73 strain). The precultures were grown overnight at 37 °C under stirring and resuspended in 75 mL of a fresh LB medium. The cultures were grown at 37 °C until optical density reached 0.5 at 600

nm ($OD_{600nm} = 0.5$) and then rediluted in fresh LB medium to an $OD_{600nm} = 0.1$. Each well of a 96 well plate was filled with 185 μ L of bacterial culture, 10 μ L of Milli-Q[®] water (18.0 M Ω cm) and 5 μ L of DMSO (for the untreated bacteria) or 5 μ L of compounds in DMSO solution, as the final volume in each well was 200 μ L and the concentration in DMSO 2.5% (v/v). Every experiment was performed in two sets of quintuplicates. The MICs were determined as the minimal concentration at which no bacterial growth was detected by optical density. The plates were stirred in a thermostated incubator at 37 °C and the OD_{600nm} was monitored at t = 0, 2, 5, 10 and 24 h.

(a) In the first assay, *B. thuringiensis* was incubated at 37 °C with **4.1** (concentrations ranging from 2 μ M to 32 μ M).

(b) Control assay: *B. thuringiensis* was incubated at 37 °C with **β CD** (concentrations ranging from 4 μ M to 64 μ M).

(c) Control assay: *B. thuringiensis* was incubated at 37 °C with **CG** (concentrations ranging from 4 μ M to 64 μ M).

(d) Control assay with the compounds **β CD** and **CG** (**β CD:CG**): *B. thuringiensis* was incubated at 37 °C with the same concentrations as above of **β CD** and **CG**.

(e) Control assay with the compounds **4.1** and **CG** (**4.1:CG**): *B. thuringiensis* was incubated at 37 °C with the same concentrations as above of **4.1** and 2 equivalents of **CG** (with respect to **4.1**).

(f) In the assay with the compounds **4.1** and **β CD** (**4.1:(β CD)₂**): *B. thuringiensis* was incubated at 37 °C with the same concentrations as in (a) of 1 and 2 equivalents of **β CD** (with respect to **4.1**).

(g) In the competitive assay with the compound **4.1** and **β CD** versus **CG** (**4.1:(β CD)₂:CG**): *B. thuringiensis* was incubated at 37 °C with the same concentrations as in (a) of **4.1** and 2 equivalents of **β CD** and **CG** (with respect to **4.1**).

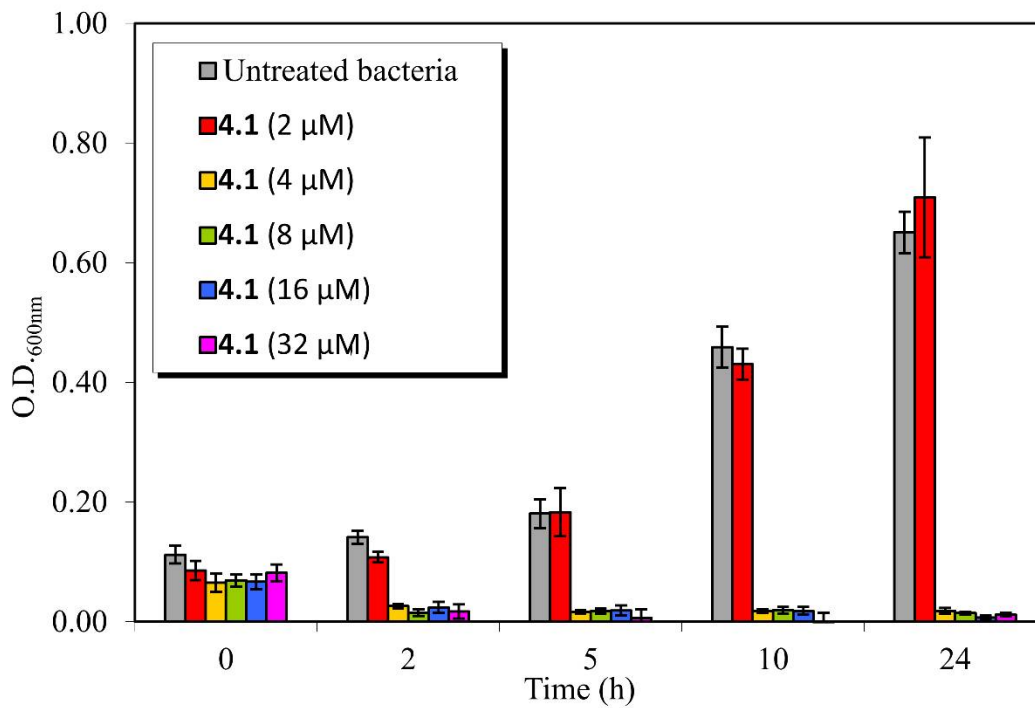


Figure A3.1 Dose-dependent growth inhibition of *B. thuringiensis* (HD73) by 4.1. Error bars show standard deviation.

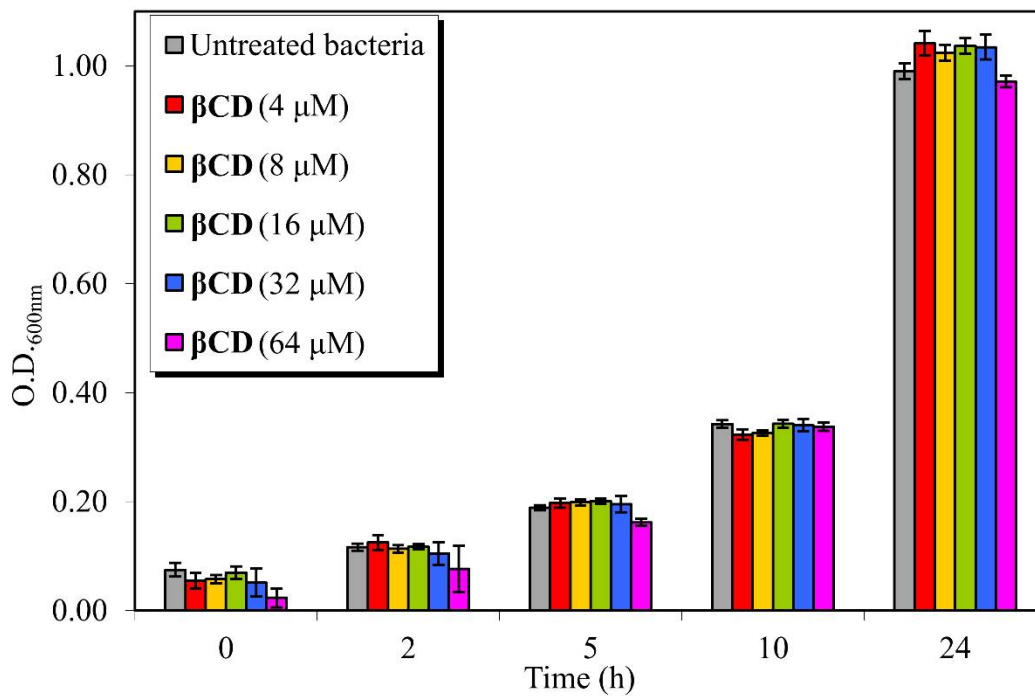


Figure A3.2 Dose-dependent growth inhibition of *B. thuringiensis* (HD73) by β CD. Error bars show standard deviation.

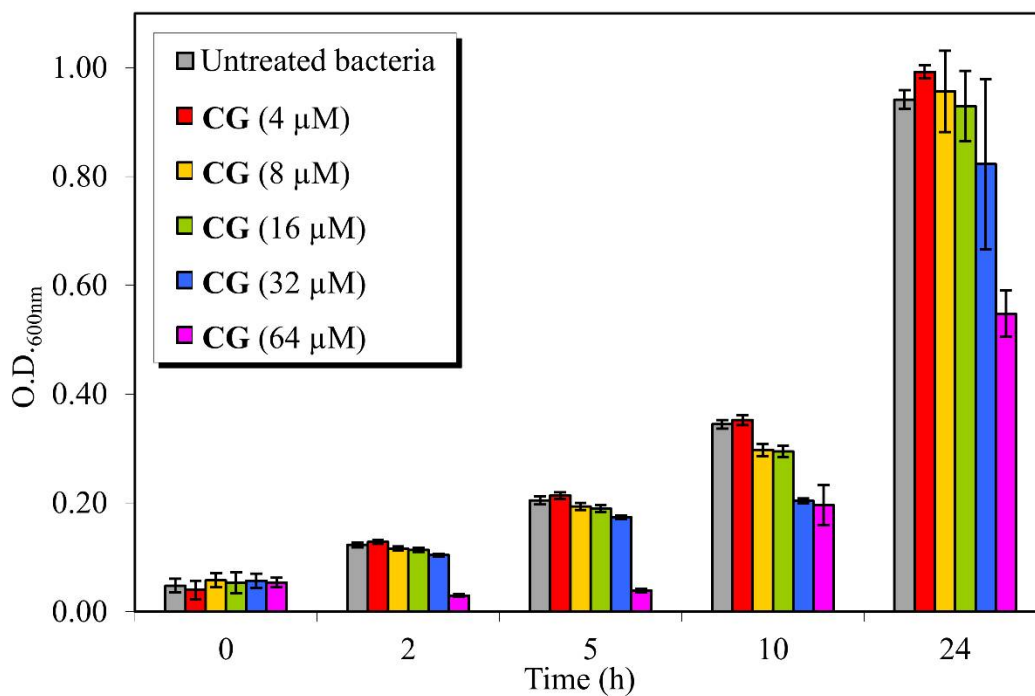


Figure A3.3 Dose-dependent growth inhibition of *B. thuringiensis* (HD73) by CG. Error bars show standard deviation.

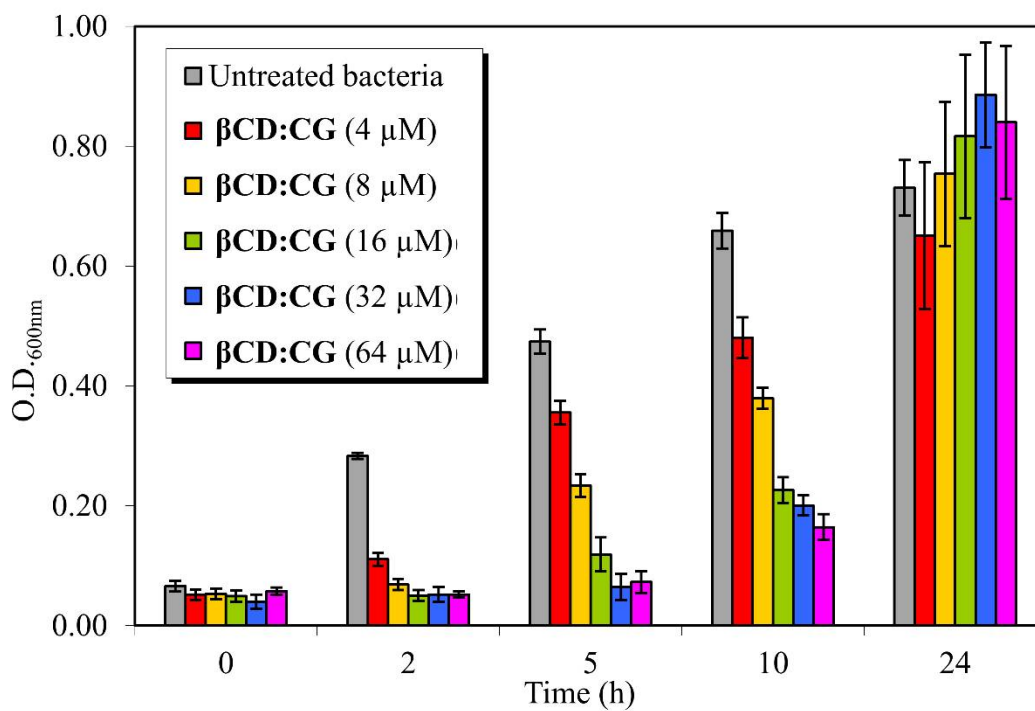


Figure A3.4 Dose-dependent growth inhibition of *B. thuringiensis* (HD73) by βCD:CG. Error bars show standard deviation.

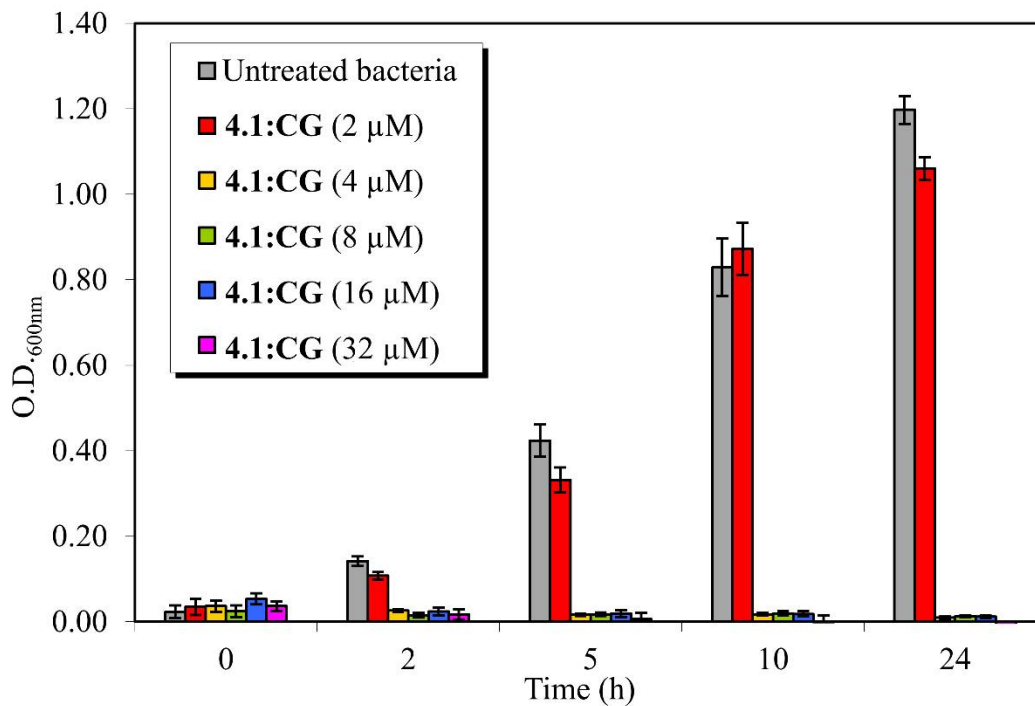


Figure A3.5 Dose-dependent growth inhibition of *B. thuringiensis* (HD73) by 4.1:CG. Concentrations are shown with respect to 4.1. Error bars show standard deviation.

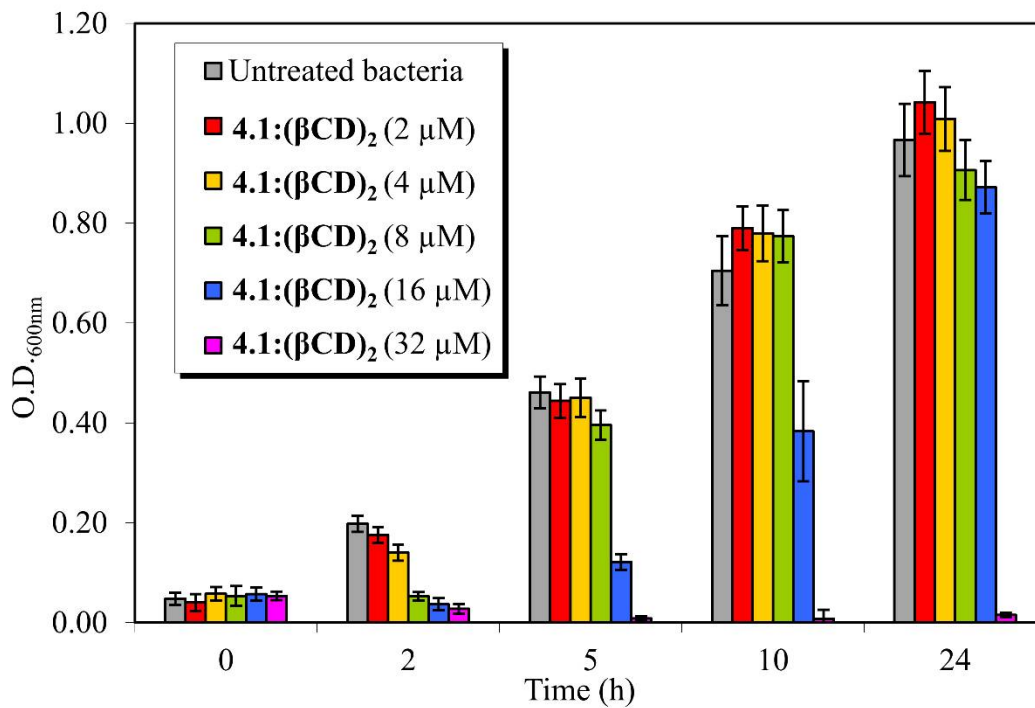


Figure A3.6 Dose-dependent growth inhibition of *B. thuringiensis* (HD73) by 4.1:(βCD)₂. Concentrations are shown with respect to 4.1. Error bars show standard deviation.

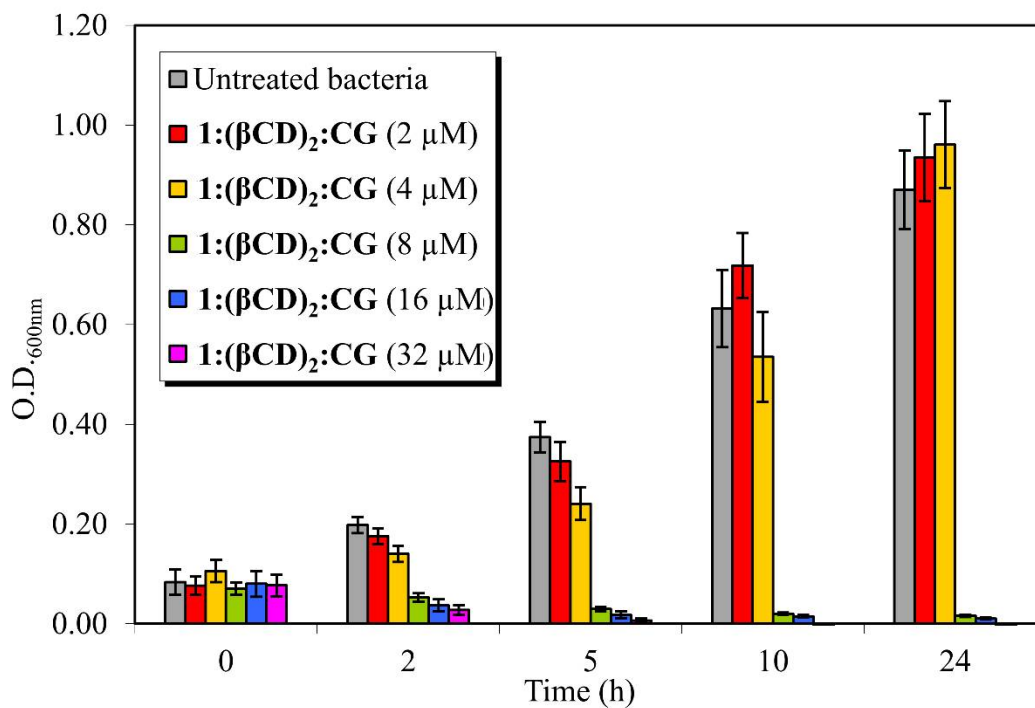


Figure A3.7 Dose-dependent growth inhibition of *B. thuringiensis* (HD73) by **4.1:(βCD)₂:CG**. Concentrations are shown with respect to **4.1**. Error bars show standard deviation.

Preparation of the samples for the LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability assay

βCD (4.1:(βCD)₂): 1 (8.4 mg, 0.012 mmol, 1 eq.) was dissolved in 2 mL of MeOH and added to 2 mL of water containing the **βCD** (56.6 mg, 0.050 mmol, 4 eq.). The solution was then diluted to 5 mL with MeOH. Aliquots of 1 mL were separated in 5 vials and were dried under vacuum. **4.1:(βCD)₂:CG**: **4.1** (8.4 mg, 0.012 mmol, 1 eq.) and **CG** (11.2 mg, 0.062 mmol, 5 eq.) were dissolved in 2 mL of MeOH was added to 2 mL of water containing the **βCD** (56.6 mg, 0.062 mmol, 4 eq.). The solution was then diluted to 5 mL with MeOH. Aliquots of 1 mL were separated in 5 vials and were dried under vacuum. 1 mL of DMSO was used to dissolve compounds only prior to the experiment.

Fluorescence spectroscopy

Calibration of the LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Assay

B. thuringiensis HD73 was inoculated in 1 mL of fresh LB which was grown overnight with agitation at 37 °C. An aliquot of 200 µL of the preculture was inoculated in 60 mL of fresh LB which was grown with agitation (200 rpm) at 37 °C for 4 hours. Bacteria were centrifuged at 1000 × g for 10 minutes at room temperature and the pellet were resuspended in 5 mL of 0.9% (w/w) NaCl solution. The bacterial suspension (1 mL) was added to 20 mL of 0.9% (w/w) NaCl solution for the quantification of the alive bacteria; 1 mL of the bacterial suspension was added to 20 mL of 70% (v/v) *i*PrOH in 0.9% (w/w) NaCl for quantification of dead bacteria. The suspensions were then incubated for 1 hour at 37 °C with manual stirring every 15 minutes. Samples were centrifuged at 1000×g for 10 minutes at room temperature, resuspended in 0.9% (w/w) NaCl and washed once by centrifugation. The pellets were resuspended each in 8 mL of 0.9% (w/w) NaCl solution and their OD_{600nm} was measured (as in *Membrane integrity assay*). The OD₆₀₀ was then adjusted to the lowest of the samples from the *Membrane integrity assay* and the calibration was performed as followed: an aliquot of 100 µL of Live/Dead bacteria were prepared in 0:100, 10:90, 50:50, 90:10 and 100:0 ratios and was transferred to a 96-well flat-bottom microplate in triplicate. The nucleic acid stains SYTO9 and propidium iodide from the LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit (L7012) were prepared as followed: 1 µL of each were diluted in 1 mL of 0.9% (w/w) NaCl. Aliquots of 100 µL of this solution were mixed with the samples and incubated in the dark for 15 minutes. Fluorescence was measured using a *Tecan Infinite M200* microplate reader with $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ set at 480/515 nm for the SYTO9 fluorescence and $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ set at 490/625 nm for propidium iodide fluorescence. Calibration was repeated for every *Membrane integrity assay* experiment.

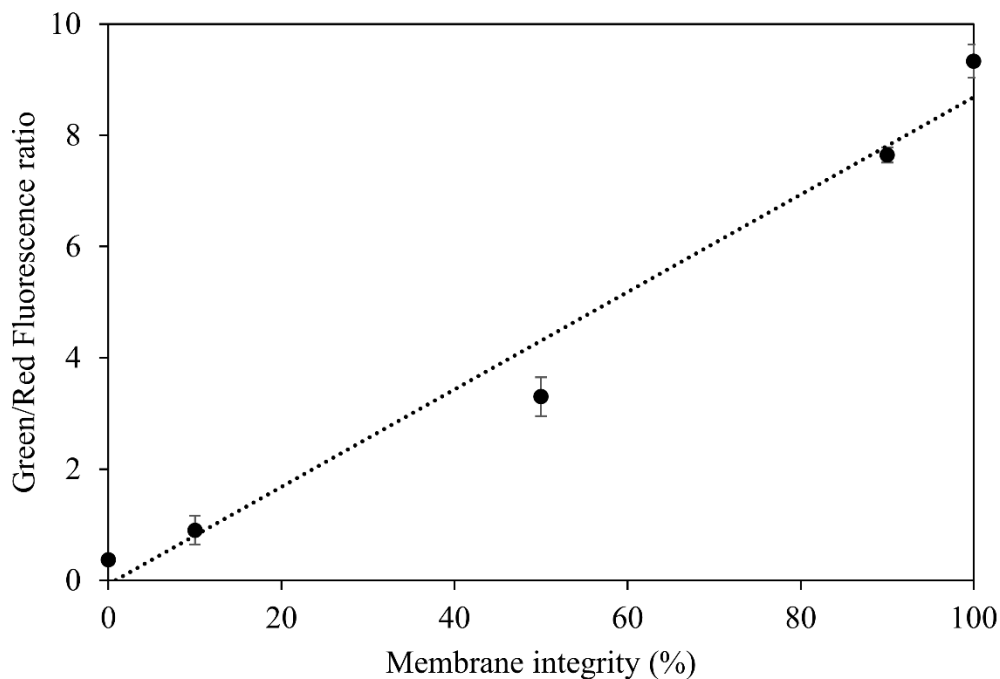


Figure A3.8 LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability calibration curve for *B. Thuringiensis* HD73. Error bars show standard deviation. $y = 0.0876x - 0.0667$; $R^2 = 0.9743$.

Membrane integrity assay of *B. thuringiensis* HD73.

Bacteria were prepared as described in the *Calibration of the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Assay* in which 250 μ L of bacterial suspension was added to 5 mL of the following samples diluted in 0.9% (w/w) NaCl with a maximum of 1% of DMSO: β CD (80 μ M), CG (100 μ M), 4.1 (4 μ M, MIC), 4.1 (20 μ M, 5 \times MIC), 4.1:(β CD)₂ (20 μ M and 80 μ M, respectively) or 4.1:(β CD)₂:CG (20 μ M, 80 μ M and 100 μ M, respectively). The suspensions were incubated for 1 hour at 37 °C with manual stirring every 15 minutes. Samples were centrifuged at 1000 \times g for 10 minutes at room temperature, resuspended in 0.9% (w/w) NaCl and washed once with centrifugation. The pellets were resuspended each in 2 mL of 0.9% (w/w) NaCl and their OD_{600nm} were measured (as well as *Calibration of the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit* samples). OD_{600nm} was then adjusted to the lowest of the samples and all samples were transferred to a 96-well flat-bottom microplate in triplicate. Aliquots of 100 μ L of the nucleic acid stains, prepared as in the *Calibration of the LIVE/DEAD® BacLight™*

Bacterial Viability Assay, were mixed with the samples and incubated in the dark for 15 minutes. Fluorescence was measured using *Tecan Infinite M200* microplate reader with $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ set at 480/515 nm for the SYTO9 fluorescence and $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ set at 490/625 nm for propidium iodide fluorescence. This assay was repeated thrice. Results are reported in *Membrane integrity (%)* using the calibration curve obtained.

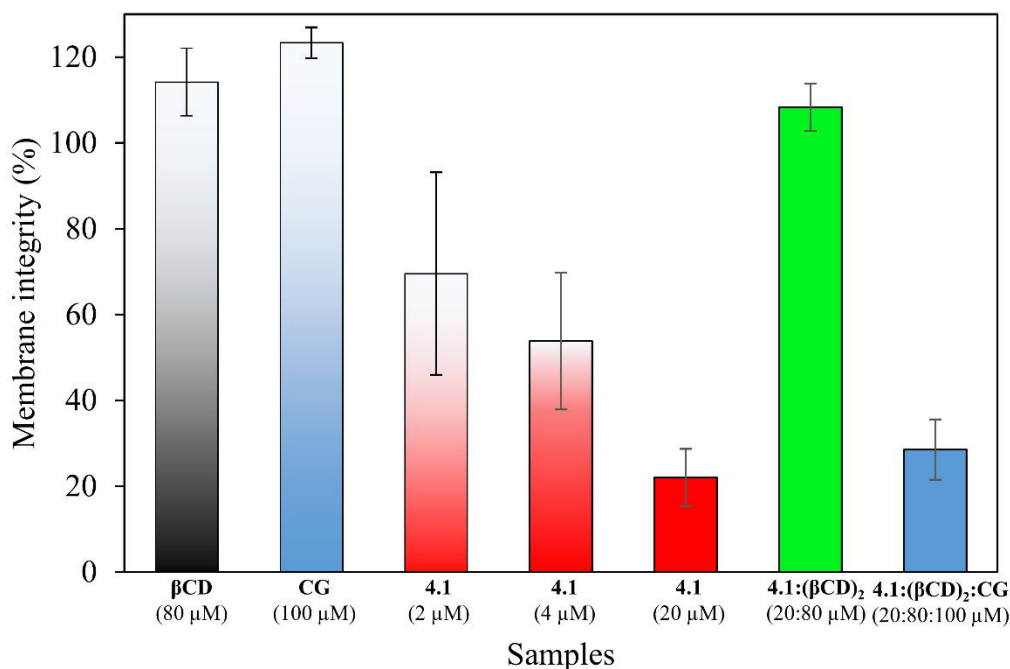


Figure A3.9 Results of the membrane integrity assays of *B. thuringiensis*. Error bars show standard deviation.

Fluorescence microscopy

Membrane integrity assay of *B. Thuringiensis* HD73.

B. thur HD73 was inoculated in 5 mL of fresh LB containing 125 μL of 20% (w/w) glucose which was grown overnight with agitation at 37 °C. Bacterial preculture (1 mL) was inoculated in 9 mL of fresh LB containing 175 μL of 20% (w/w) saccharose. Aliquots of 400 μL were distributed in 3 sterile 8-well chambered coverglasses and were incubated at 37 °C for 24 hours. Each well was rinsed twice with 200 μL of PBS (1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 , 0.2 g KCl and 8 g NaCl per L, pH = 7.4) followed by a slight agitation. Aliquots of 400 μL of

the following samples diluted in PBS with 0.8% (v/v) of DMSO in triplicate were added in PBS, β CD (80 μ M), CG (100 μ M), 4.1 (20 μ M), 4.1:(β CD)₂ (20 μ M and 80 μ M, respectively) or 4.1:(β CD)₂:CG (20 μ M, 80 μ M and 100 μ M, respectively). The chambered coverglasses were incubated at 37 °C for 3 hours. Each well was rinsed with 200 μ L of PBS followed by a slight agitation. Aliquots of 200 μ L of the nucleic acid stains, prepared as in *Calibration of the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*, were mixed with the samples and were incubated at room temperature in the dark for 15 minutes. Each well was rinsed with 200 μ L of PBS followed by a slight agitation and 200 μ L of PBS was added. The fluorescence was observed at 63X using a *Leica DMI6000 B* microscope equipped with a *DFC360 FX* digital camera.

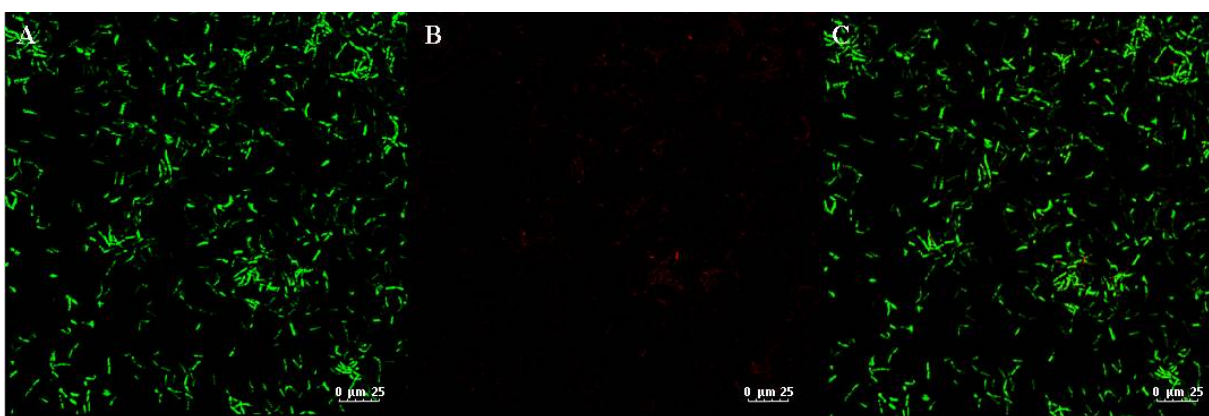


Figure A3.10 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* stained by *BacLight™* stains after incubation with NaCl 0.9%. A) Green fluorescence. B) Red fluorescence C) Merge of A and B.

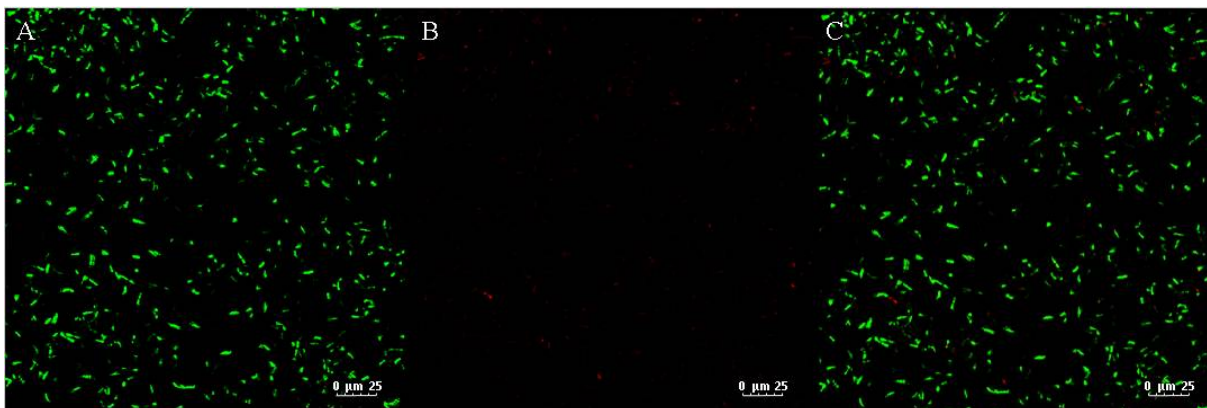


Figure A3.11 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* stained by BacLight™ stains after incubation with β CD (80 μ M). A) Green fluorescence. B) Red fluorescence C) Merge of A and B.

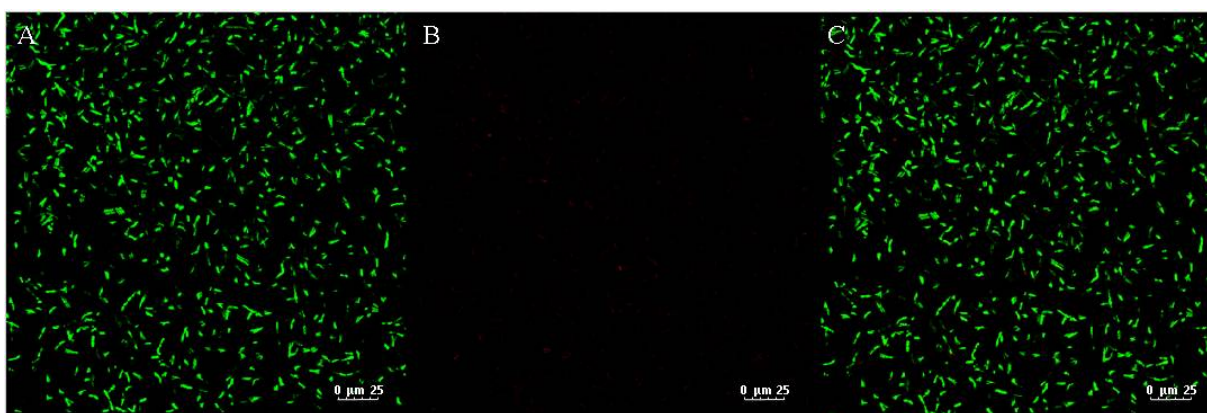


Figure A3.12 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* stained by BacLight™ stains after incubation with CG (100 μ M). A) Green fluorescence. B) Red fluorescence C) Merge of A and B.

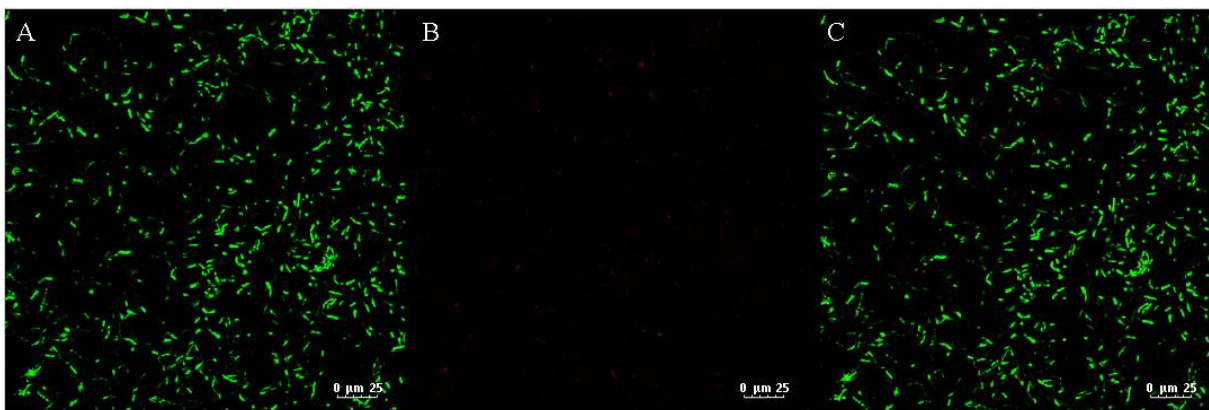


Figure A3.13 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* stained by *BacLight*[™] stains after incubation with **βCD** (80 μM) and **CG** (100 μM). A) Green fluorescence. B) Red fluorescence C) Merge of A and B.

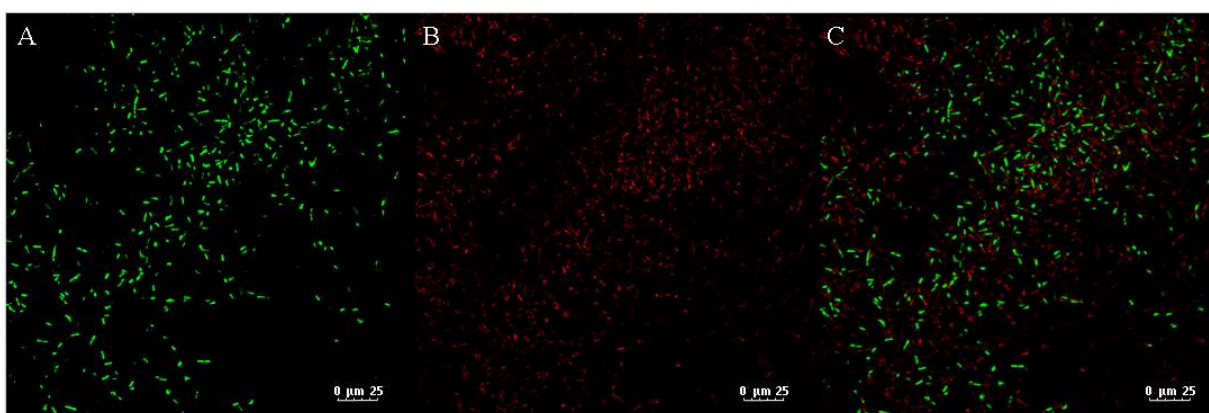


Figure A3.14 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* stained by *BacLight*[™] stains after incubation with **4.1** (20 μM). A) Green fluorescence. B) Red fluorescence C) Merge of A and B.

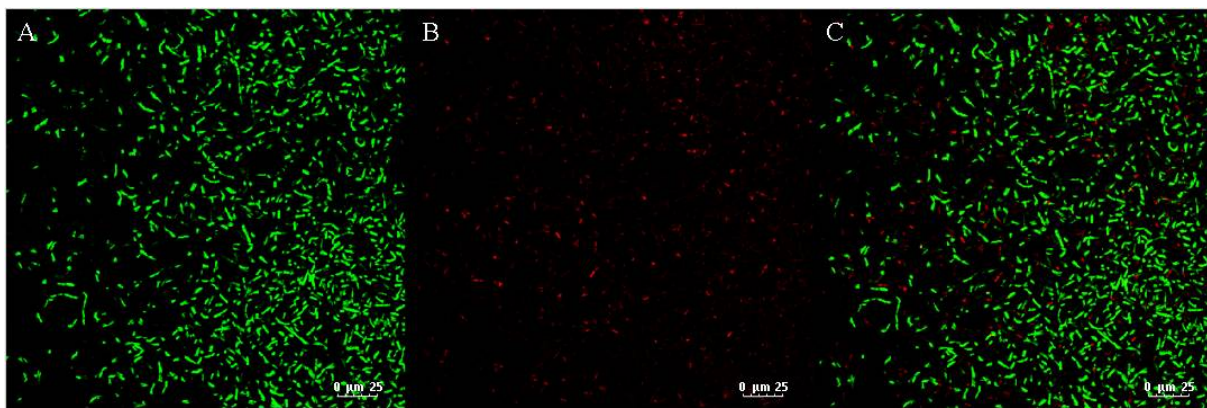


Figure A3.15 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* stained by BacLight™ stains after incubation with **4.1:(βCD)₂** (20 μM with respect to **4.1**). A) Green fluorescence. B) Red fluorescence C) Merge of A and B.

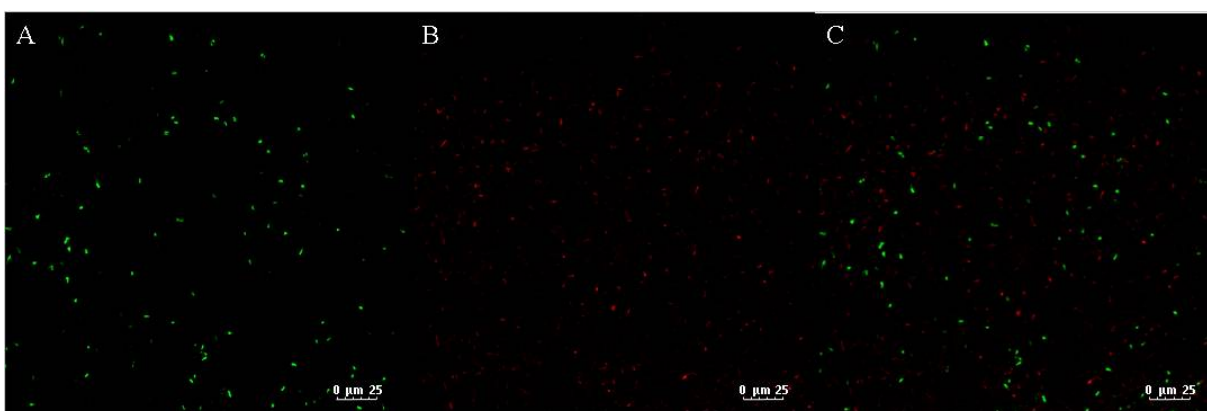


Figure A3.16 Fluorescence microscopy of *B. thuringiensis* stained by BacLight™ stains after incubation with **4.1:(βCD)₂:CG** (20 μM with respect to **4.1**). A) Green fluorescence. B) Red fluorescence C) Merge of A and B.

Hemolytic activity

Hemolytic activity was tested on erythrocytes from human blood. Mixture samples were prepared as for the MIC assay. Fresh human red blood cells (blood type O) were centrifuged for 10 minutes at $200 \times g$, washed three times with PBS, and diluted to a concentration of 2% (v/v) in PBS. Ten microliters of 2-fold serial dilutions of compounds solutions (**4.1**, **4.1:(βCD)₂**, **4.1:(βCD)₂:CG** or **CG**) in DMSO was added to 96-well plates, after which 190 μL of

erythrocyte suspension was added. After 1 or 24 h of incubation at 37 °C with gentle shaking, the plates were centrifuged for 10 minutes at 200 × g. A 50 μL amount of supernatant from each well was transferred to a fresh plate, and the release of hemoglobin was monitored by measuring the absorbance at 405 nm. The values for 0% and 100% hemolysis were determined by incubating erythrocytes with PBS or with 0.5% (v/v) Triton X-100. The hemolysis percentage was calculated using the following equation:

$$\text{hemolysis (\%)} = \frac{A - A_0}{A_{100} - A_0} \times 100\%$$

in which A is the absorbance of supernatant of compounds solutions (**1**, **1:(βCD)₂**, **1:(βCD)₂:CG** or **CG**), A_0 is the absorbance of supernatant with DMSO, and A_{100} is the absorbance of supernatant with 0.5% Triton X-100. Data are the mean of three separate experiments.

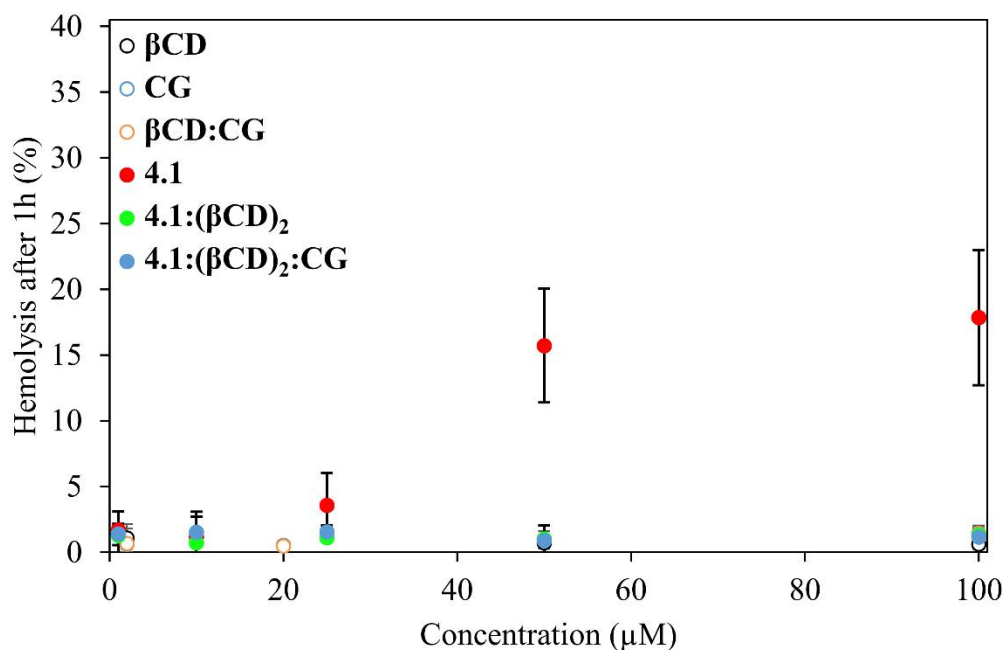


Figure A3.17 Hemolytic activity of **4.1**, **4.1:(βCD)₂** and **4.1:(βCD)₂:CG** at various concentrations, with respect to **4.1**, after 1 hour of incubation.

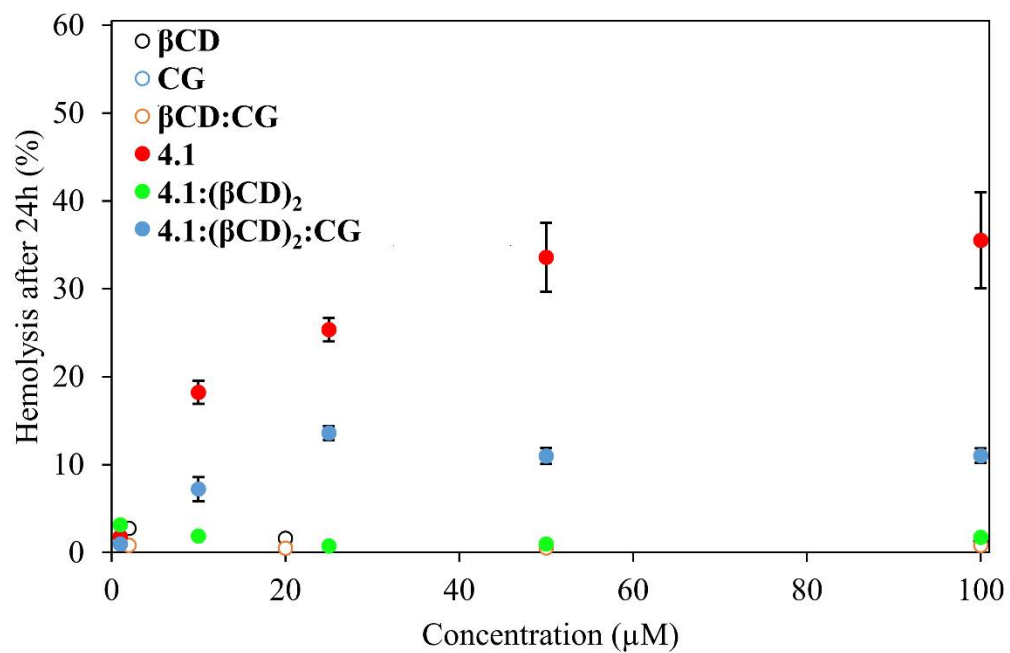


Figure A3.18 Hemolytic activity of **4.1**, **4.1:(βCD)₂** and **4.1:(βCD)₂:CG** at various concentrations, with respect to **4.1** after 24 hours of incubation.

**Annexe 4 : Informations supplémentaires de l'article 4
« Adaptation of a bacterial membrane permeabilization
assay for quantitative evaluation of benzalkonium chloride
as a membrane-disrupting agent »**

General

Instrumentation

Bacterial cell density ($OD_{600\text{nm}}$) was measured using a *Fisher Scientific cell density meter model 40*. UV-vis and fluorescence spectroscopy experiments were performed on a *Tecan Infinite M200* microplate reader. Bacterial cell lysis was performed by sonication using a *Sonics & Materials Inc. Vibra-Cells VCX-500 Ultrasonic Processor* (5 to 15 rounds of 30 seconds sonication until the $OD_{600\text{nm}} = 0$).

Experimental

Calibration of ortho-nitrophenol (ONP) absorption at different DMSO concentrations

Absorption of ONP at different concentrations (from 0 to 1.25 mM) in PBS buffer (prepared from 8 g NaCl, 0.2 g KCl 1.42 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 per L, pH adjusted to 7.4 with HCl) and containing different amounts of DMSO was measured by UV-vis spectroscopy at $\lambda = 420$ nm in a 96-well microtiter plate reader. Results are reported in figure A4.1.

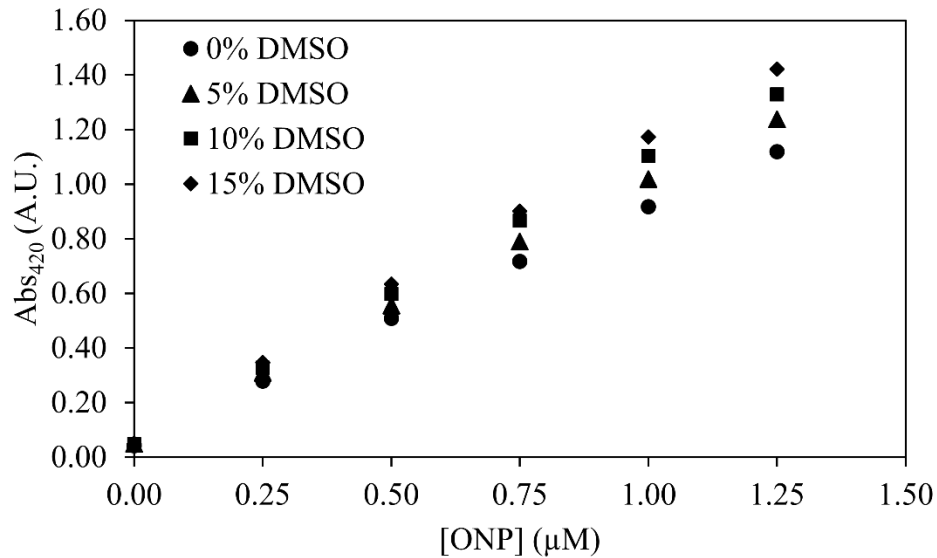


Figure A4.1 Absorption of ONP at $\lambda = 420$ nm. Each data point is the average of three separate acquisitions. Curve equations: 0% DMSO v/v (circles); $y = 0.86x + 0.06$, $R^2 = 0.9911$. 5% DMSO v/v (triangles) $y = 0.95x + 0.07$, $R^2 = 0.9991$. 10% DMSO v/v (squares) $y = 1.03x + 0.07$, $R^2 = 0.9983$. 15% DMSO v/v (diamonds) $y = 1.10x + 0.07$, $R^2 = 0.9991$.

Preparation of the bacterial cultures

A preculture was prepared by inoculating an isolated colony of wild type *Escherichia coli* (strain MG1655, *lacZ*⁺) in 1 mL of lysogeny broth (LB) medium containing 100 μ M of *iso*-propyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce *lacZ* expression. The preculture was grown overnight at 37 °C with agitation. The preculture (1 mL) was added to 50 mL of LB containing 100 μ M of IPTG and bacteria were grown at 37 °C with agitation to an optical density at 600 nm (OD_{600nm}) of 0.6. Bacterial cultures were centrifuged for 10 min at $1000 \times g$ at room temperature, rinsed twice with PBS (pH 7.4) and resuspended in PBS (pH 7.4) to the desired OD_{600nm} .

Viable count method

To estimate the number of bacterial cells for the *membrane permeabilization assays*, the viable count method was used. *E. coli* cells were grown as reported and resuspended to specific OD_{600nm} of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5. Each sample was further diluted according to Table A4.1.

Table A4.1 Viable count method dilutions.

OD_{600nm}	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4
0.1	1:50,000	1:100,000	1:200,000	1:500,000
0.2	1:50,000	1:100,000	1:200,000	1:500,000
0.3	1:25,000	1:50,000	1:100,000	1:200,000
0.4	1:20,000	1:30,000	1:40,000	1:50,000
0.5	1:20,000	1:30,000	1:40,000	1:50,000

A sample of 100 μ L of each dilution was then spread on LB-agar plates and incubated at 37°C overnight. The colonies formed were counted on each plate containing more than 30 and less than 300 colonies. Results are reported in figure A4.2.

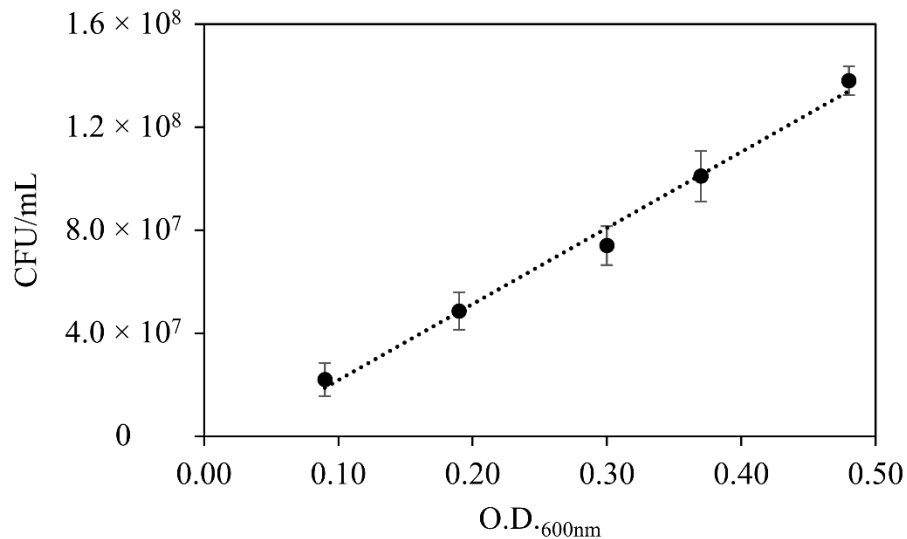


Figure A4.2 Viable count calibration for *E. coli* MG1655. Each data point is the average of three separate experiments. Error bars represent standard deviation. Calibration curve equation: $y = 2.95 \times 10^8 x - 7.65 \times 10^6$, $R^2 = 0.9911$.

Minimal inhibitory concentration (MIC)

E. coli cells were grown as reported and resuspended in fresh LB medium to an $OD_{600nm} = 0.1$. In a 96-well microtiter plate, the solutions were prepared in triplicates as follow: to 140 μ L of LB, 10 μ L of DMSO, PBS, BAC or Polymyxin B were added. Every experiment was performed in two sets of triplicates. The plates were stirred in a thermostated incubator at 37 °C for 24 h. The MICs were determined as the minimal concentration at which no bacterial growth was detected after 24 h.

Ortho-nitrophenolgalactoside (ONPG) membrane permeabilization assay

General. *E. coli* were grown as reported and resuspended in PBS (pH 7.4) to the desired OD_{600nm} . In a 96-wells microtiter plate, the solutions were prepared in triplicate as follow: to 125 μ L of PBS (pH 7.4) containing 1.25 mM of ONPG (final concentration), 10 μ L of a solution of a specific concentration of polymyxin B (in PBS pH 7.4) or benzalkonium chloride (BAC) in DMSO (7% DMSO v/v constant concentration) was added. Immediately before to the start of

data collection, 15 μL of *E. coli* bacteria suspended in PBS (pH 7.4) was added to each well. ONPG hydrolysis was followed by UV-vis spectroscopy at $\lambda = 420 \text{ nm}$ with a readout every 60 s and then converted to the *ortho*-nitrophenol (ONP) concentration. The same ONPG hydrolysis test was performed with 15 μL of a bacterial lysate of the same bacterial solution.

Influence of the IPTG concentration during the bacterial growth on the ONPG hydrolysis rate

During the preculture step, *E. coli* were grown in LB containing different concentrations of IPTG from 0 to 1000 μM . After the centrifugation step, bacteria were diluted in PBS (pH 7.4) to $\text{OD}_{600} = 0.1$ and then lysed. Bacterial lysate was added to the 96-well microtiter plate imminently prior to the start of data collection. Results are shown in figure A4.3.

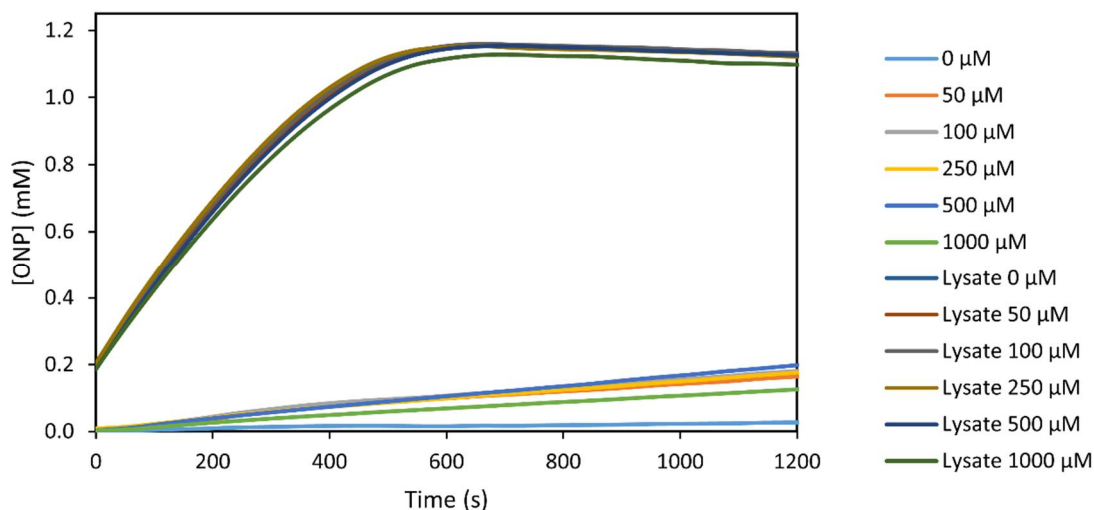


Figure A4.3 Influence of the IPTG concentration during the preculture growth on the ONPG hydrolysis rate of intact bacteria and bacterial lysate. Reported concentrations represent IPTG concentrations used during the preculture step. Each curve is the average of three different experiments.

These results show that 50 μM of IPTG is enough to induce the β -galactosidase expression and maximal ONPG hydrolysis. A concentration of 100 μM of IPTG was fixed for all the other experiments.

Influence of the DMSO concentration on the ONPG hydrolysis

E. coli cells were grown as reported. After the centrifugation step, *E. coli* were resuspended in PBS (pH 7.4) and adjusted to $\text{OD}_{600} = 0.1$ and then lysed. Bacterial lysate was added to the 96-well microtiter plate imminently prior to the start of data collection in solutions containing different concentrations of DMSO. Results are shown in figure A4.4.

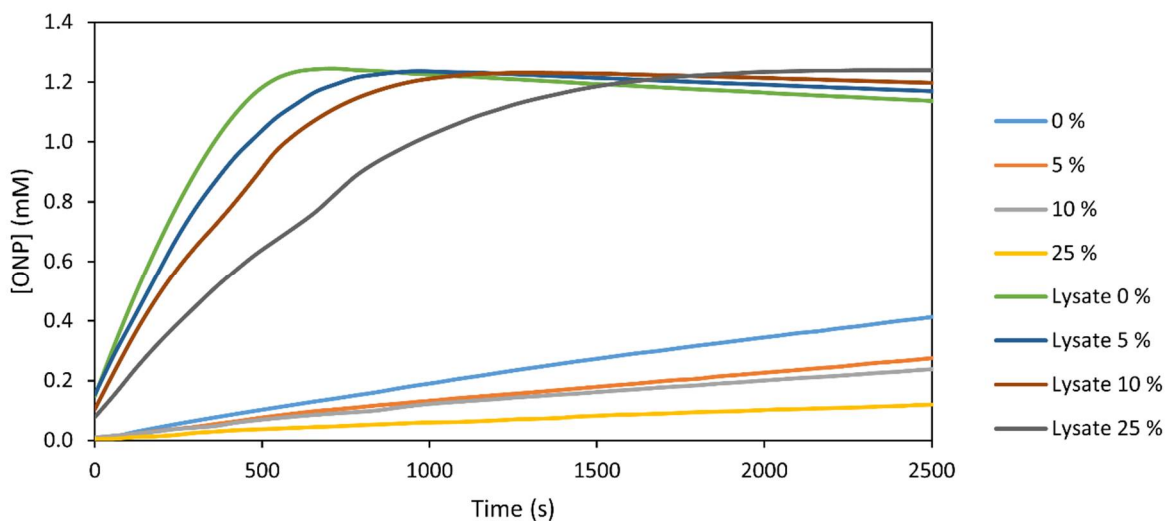


Figure A4.4 Influence of the DMSO concentration (% v/v) on the ONPG hydrolysis rate with intact bacteria and bacterial lysate. Reported concentrations represent DMSO content during the enzymatic reaction. Each curve is the average of three different experiments.

DMSO tends to slow down the rate of the enzymatic reaction. At a high concentration of DMSO (50%), the reaction is completely inhibited (figure A4.5). For this reason, DMSO was always used in a concentration below 10% for all the permeabilization assays.

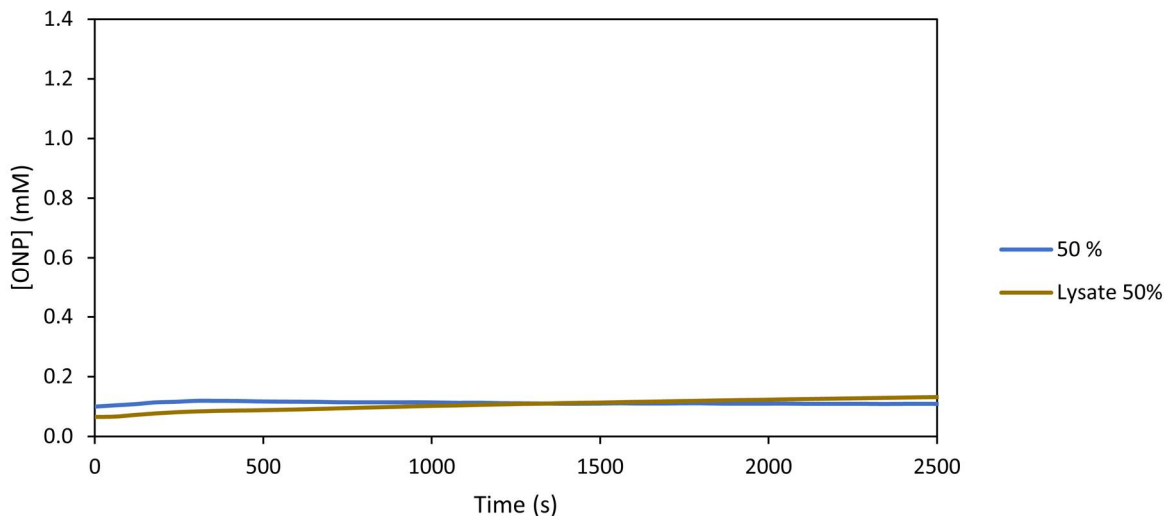


Figure A4.5 Influence of 50% concentration of DMSO on the ONPG hydrolysis reaction rate with solutions of intact bacteria and bacterial lysate. Each curve is the average of three different experiments.

Membrane permeabilization assays

Bacteria were grown as reported and resuspended in PBS (pH 7.4) to the desired OD_{600nm} (from = $0.1 \approx 10^7$ to $0.5 \approx 10^8$ CFU/mL). The rate of the ONPG hydrolysis at different concentrations of polymyxin B or **BAC** was monitored and compared to the rate obtained for the specific bacterial lysate. Results are reported in figures A4.6 – A4.11. In the case of polymyxin, the RRR was calculated using the ONPG hydrolysis between 500 and 1000 s and for BAC between 0 and 360 s. All these traces represent the crude data analyzed with the mathematical data treatment.

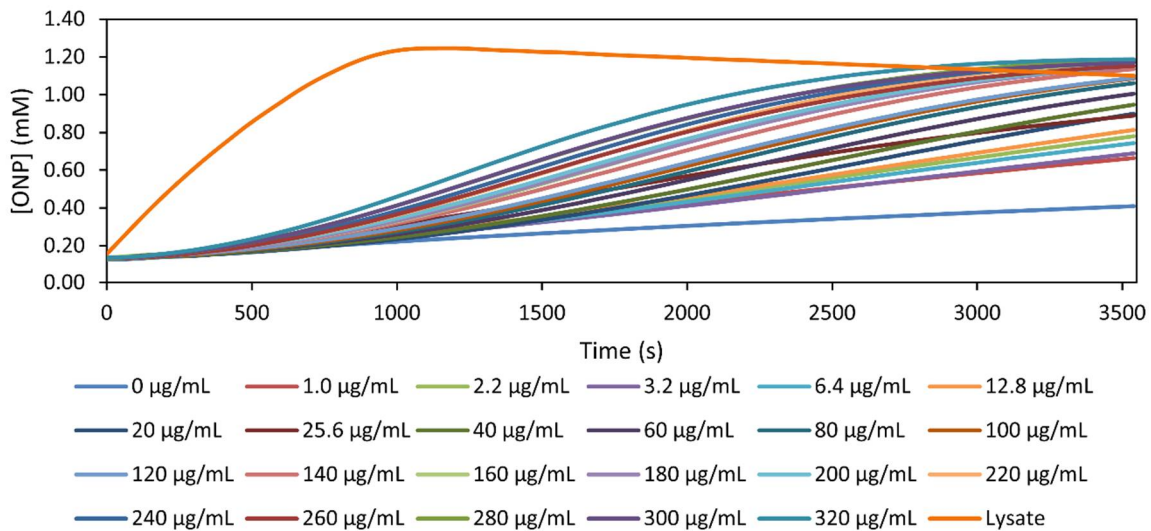


Figure A4.6 Membrane permeabilization induced by polymyxin B at a bacterial population of 7.2×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.27$). Each curve is the average of three different experiments.

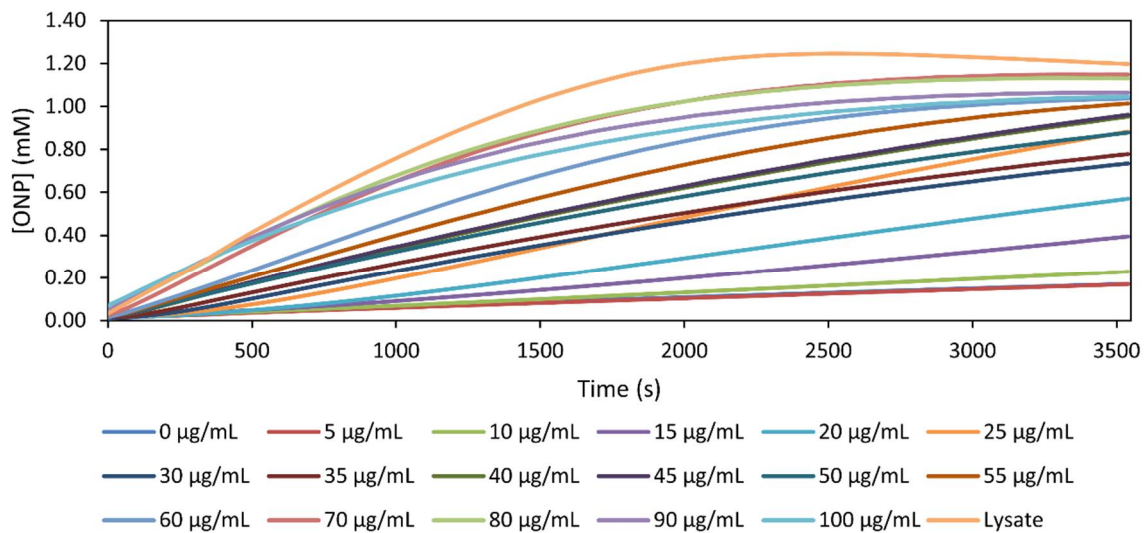


Figure A4.7 Membrane permeabilization induced by **BAC** at a bacterial population of 2.5×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.11$). Each curve is the average of three different experiments.

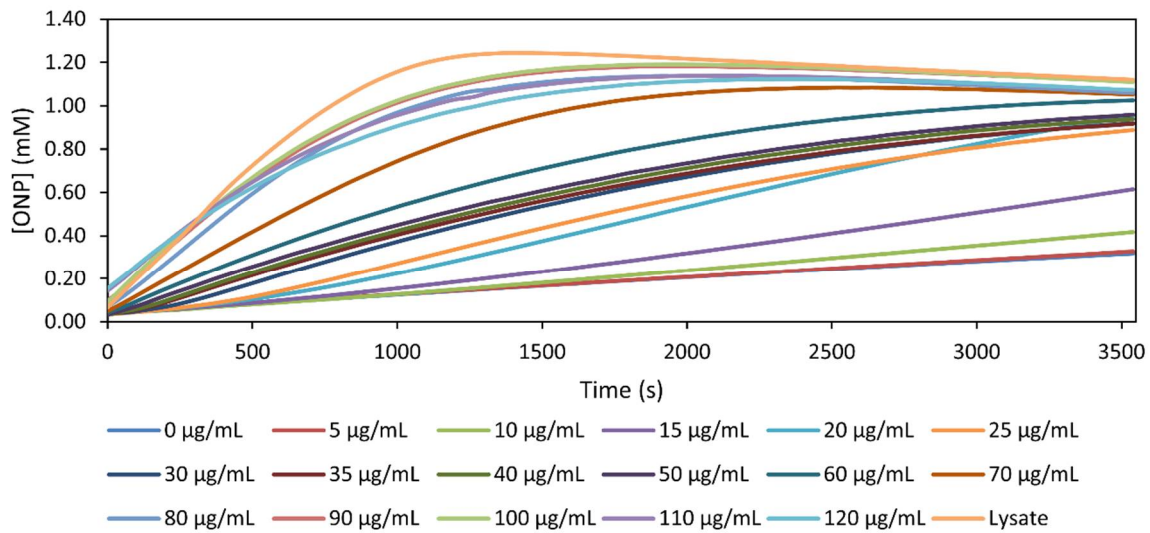


Figure A4.8 Membrane permeabilization induced by **BAC** at a bacterial population of 5.4×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.21$). Each curve is the average of three different experiments.

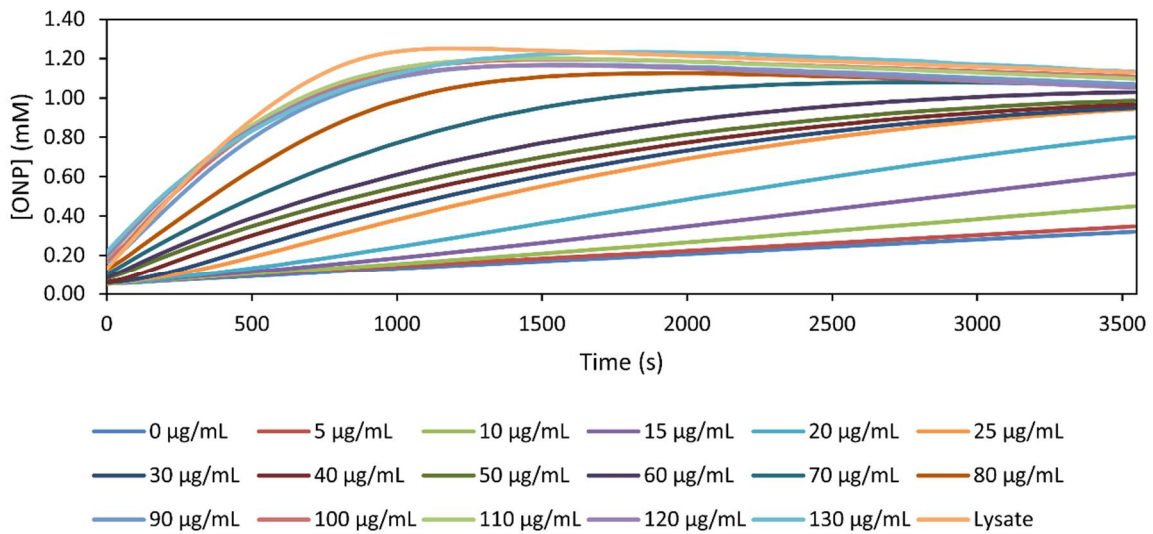


Figure A4.9 Membrane permeabilization induced by **BAC** at a bacterial population of 7.8×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.29$). Each curve is the average of three different experiments.

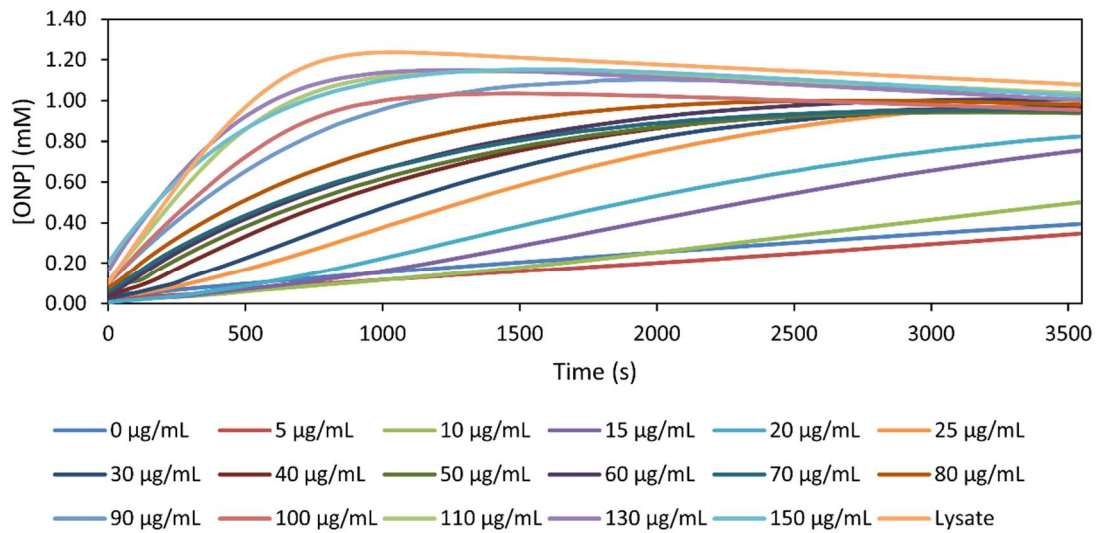


Figure A4.10 Membrane permeabilization induced by BAC at a bacterial population of 1.0×10^8 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.37$). Each curve is the average of three different experiments.

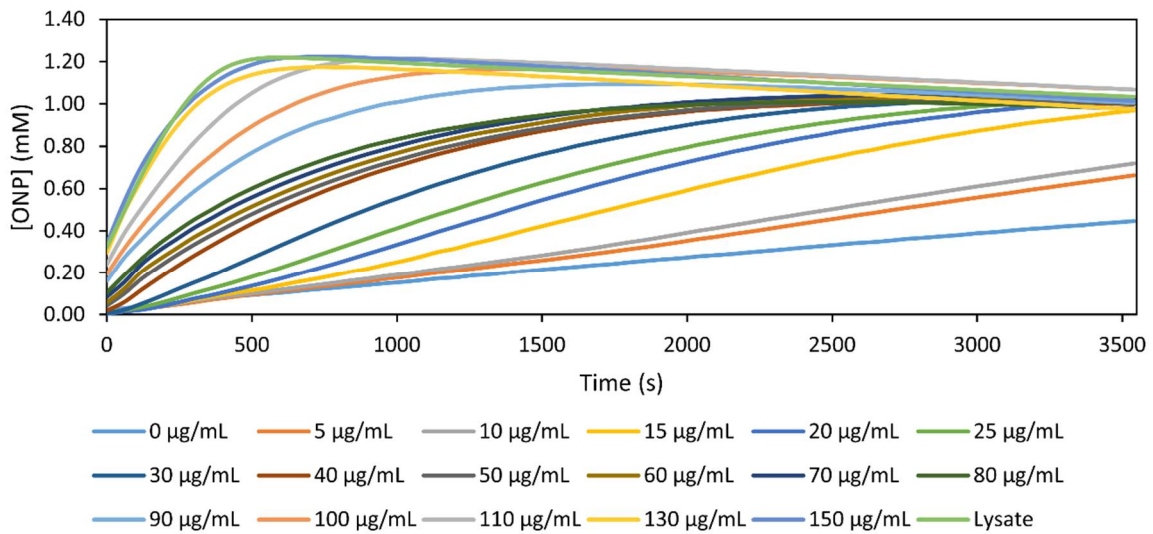


Figure A4.11 Membrane permeabilization induced by BAC at a bacterial population of 1.4×10^8 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.51$). Each curve is the average of three different experiments.

Figures A4.12 – A4.16 report the results of the mathematical treatment.

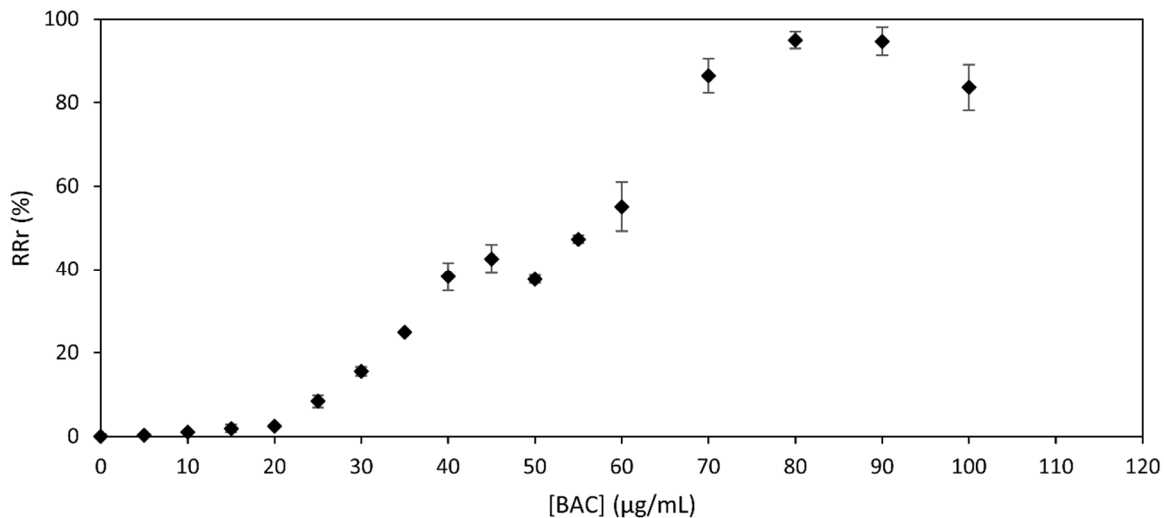


Figure A4.12 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 2.5×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.11$). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represent standard deviation.

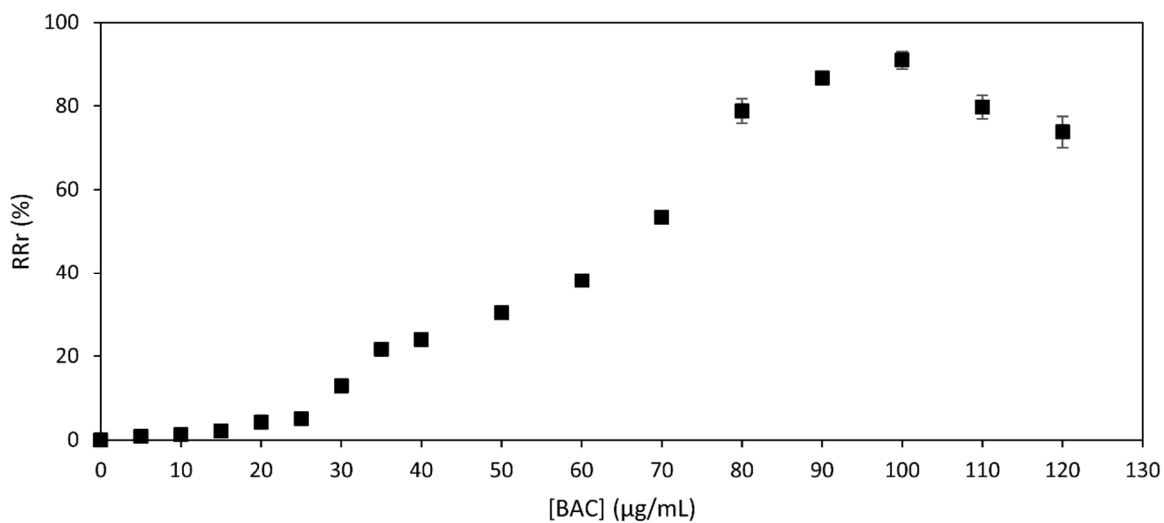


Figure A4.13 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 5.4×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.21$). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represent standard deviation.

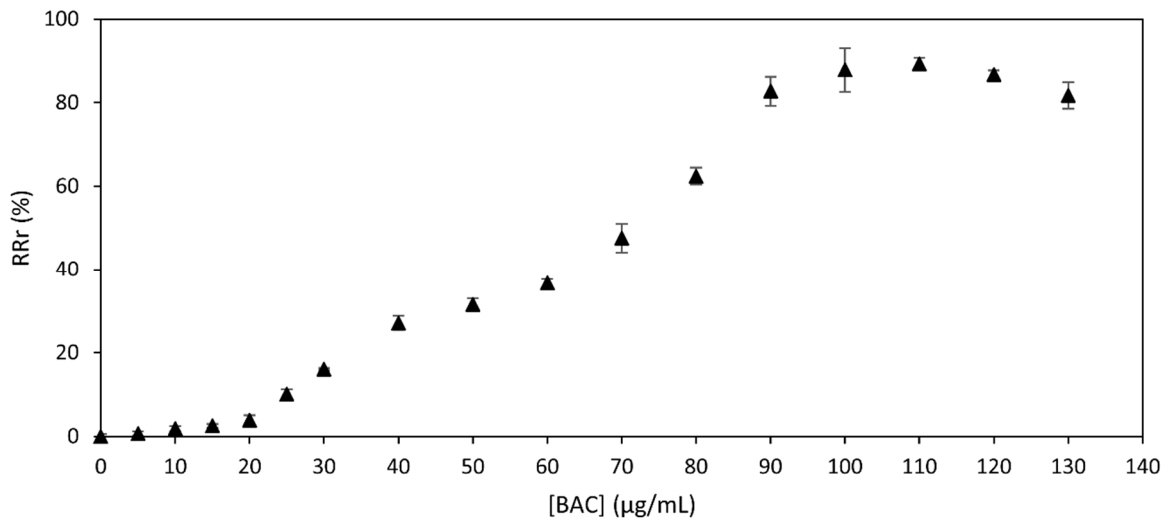


Figure A4.14 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 7.8×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.29$). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represent standard deviation.

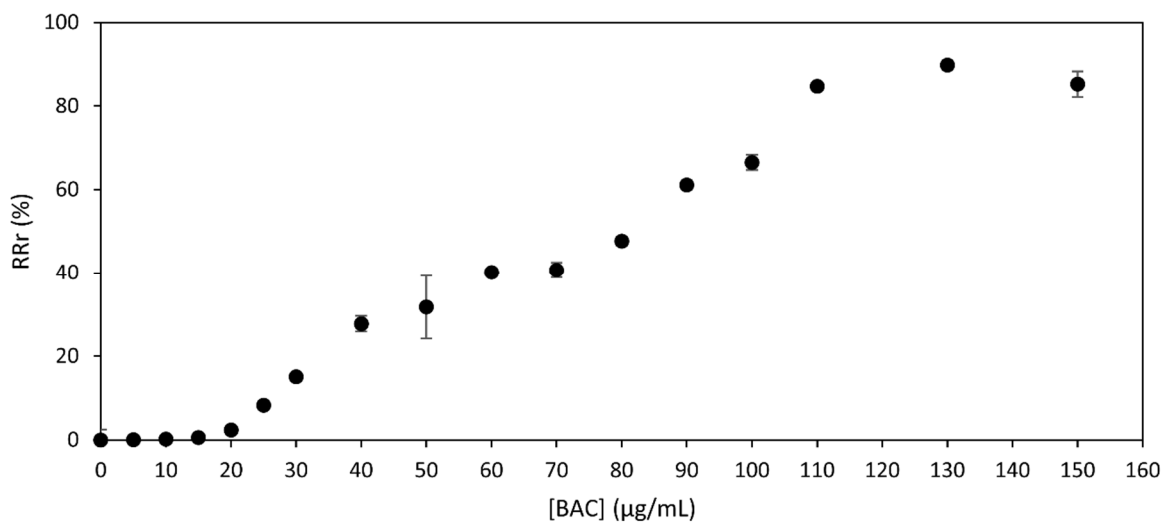


Figure A4.15 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 1.0×10^8 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.37$). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represent standard deviation.

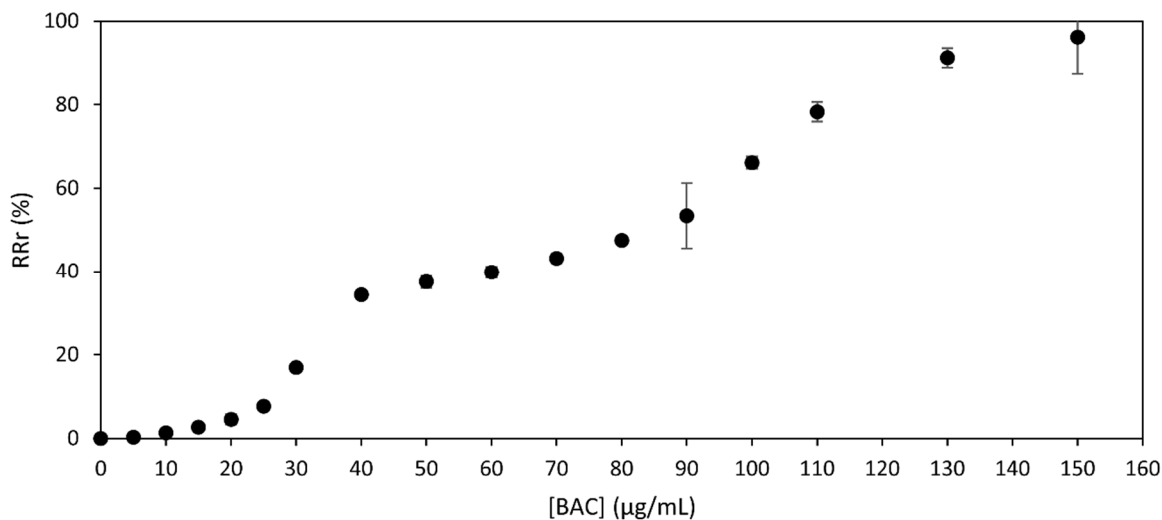


Figure A4.16 Dose-response curve for the membrane permeabilization at a bacterial population of 1.4×10^8 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.51$). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represent standard deviation.

N-phenyl-1-naphthylamine (NPN) insertion assay (insertion in the outer membrane)

E. coli bacteria were grown as described. After the centrifugation step, bacteria were resuspended in PBS (pH 7.4) and adjusted to the desired OD_{600nm} . In a 96-wells microtiter plate, the solutions were prepared in triplicate as follow: to 137 μ L of PBS (pH 7.4), 3 μ L of NPN (500 μ M in DMSO) was added. Imminently prior to the start of data collection, 10 μ L of different concentrations of a **BAC** solution in DMSO (7% DMSO v/v constant concentration) was added to each well. NPN insertion in the hydrophobic environment of the outer membrane was followed by fluorescence spectroscopy using a $\lambda_{ex} = 350$ nm and data were collected at $\lambda_{em} = 420$ nm. Results are shown in figures A4.17 – A4.20.

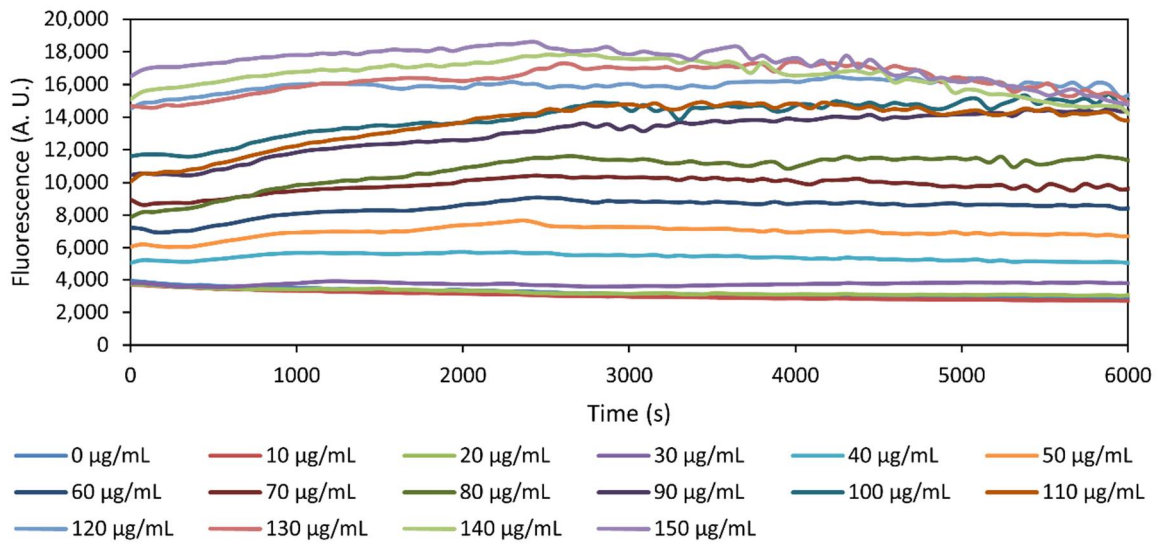


Figure A4.17 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC, for a bacterial population of 2.5×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.11$). Each curve is the average of three different experiments.

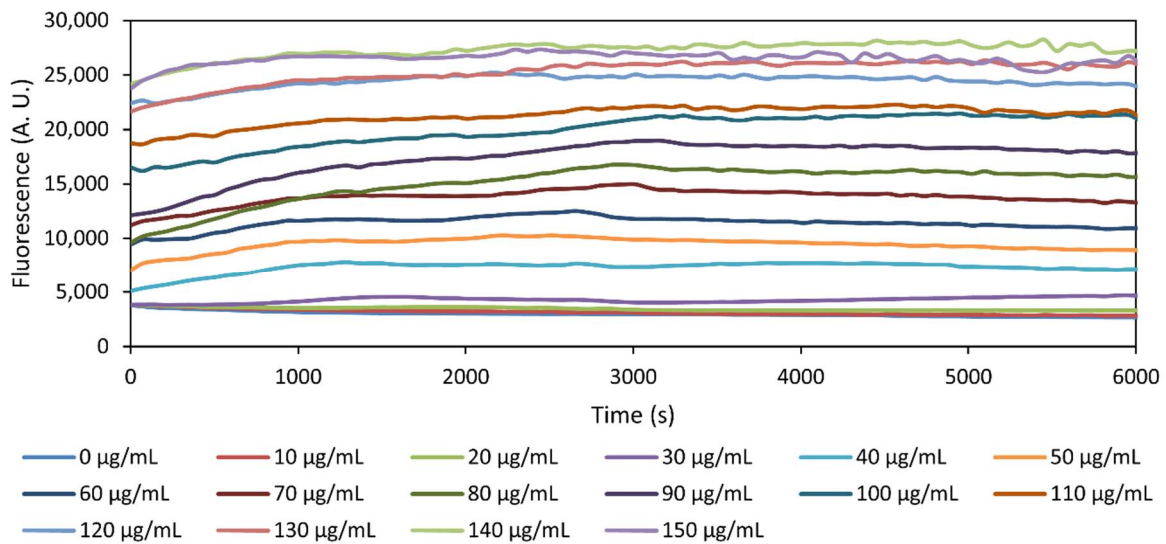


Figure A4.18 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC, for a bacterial population of 6.0×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.23$). Each curve is the average of three different experiments.

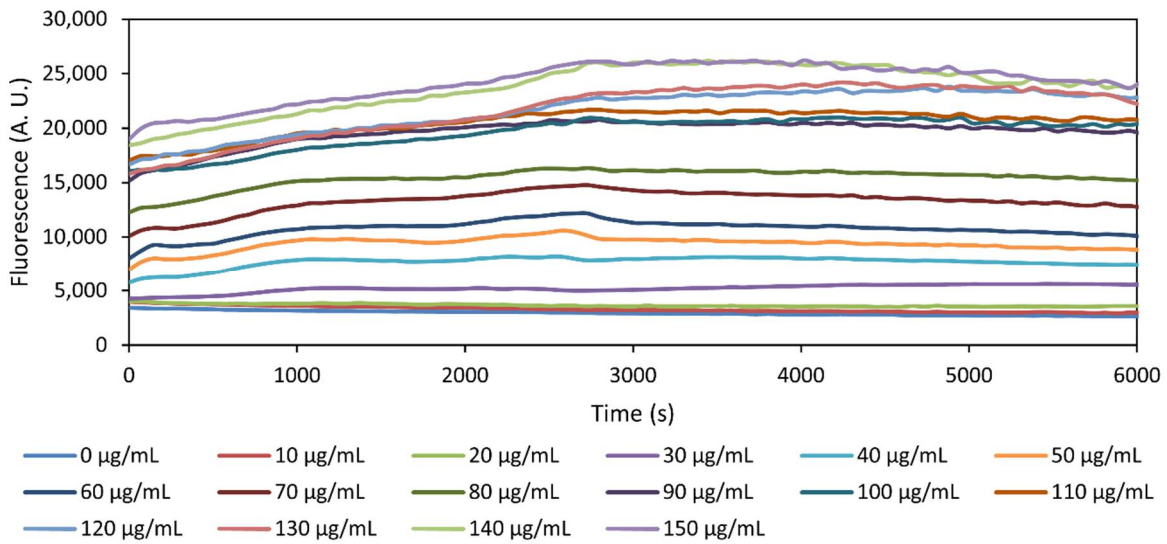


Figure A4.19 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC, for a bacterial population of 7.5×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.28$). Each curve is the average of three different experiments.

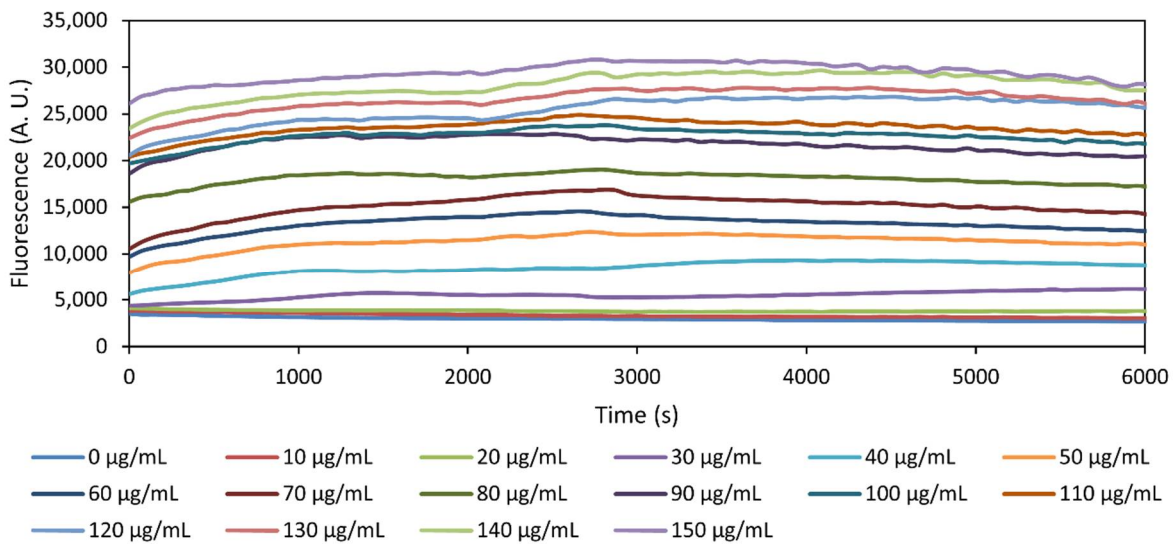


Figure A4.20 NPN insertion in the outer membrane induced by different concentrations of BAC, for a bacterial population of 1.1×10^8 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.41$). Each curve is the average of three different experiments.

Each curve represents the kinetics of the NPN insertion in the hydrophobic environment of the outer bacterial membrane. In the experimental conditions, NPN insertion is too fast to be properly monitored, because the time between the addition of the BAC solution and the 1st data collection was too long and agitation was not possible. Nevertheless, these curves represent the partition of the NPN between the aqueous solution and the hydrophobic membrane. For this reason, a dose-response curve was performed using the maximum of fluorescence at 3000 s, at which time the equilibrium was reached for all the experiments. Results are shown in figure A4.21.

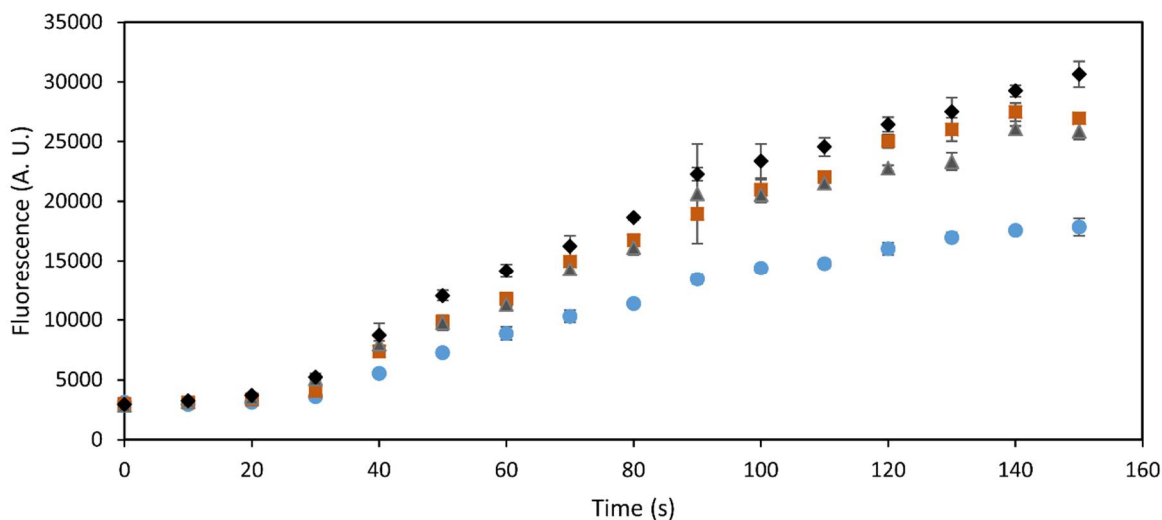


Figure A4.21 NPN fluorescence induced by different concentrations of BAC at 3000 s at a bacterial population of 2.5×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.11$, blue circles); 6.0×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.23$, red squares); 7.5×10^7 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.28$, green triangles); 1.1×10^8 CFU/mL ($OD_{600nm} = 0.41$, black diamonds). Each data point is the average of three different experiments. Error bars represent standard deviation.

Each experiment has been normalized in order to take into account the presence of different bacterial populations. All the experiments are in equilibria, such that the maximum of fluorescence was considered to be induced by a **BAC** concentration of 150 $\mu\text{g/mL}$ and the minimal response to be the one obtained in the absence of **BAC**. This treatment aims to

standardize the partition of NPN through all the possible hydrophobic environments. Each experiment was standardized using this equation.

$$RF (\%) = \frac{F_x - F_0}{F_{max} - F_0}$$

Where:

F_x : Fluorescence intensity of NPN at 3000 s induced by [BAC] = x .

F_0 : Fluorescence intensity of NPN at 3000 s in the absence of BAC.

F_{max} : Fluorescence intensity of NPN at 3000 s induced by [BAC] = 150 $\mu\text{g/mL}$.

RF : Relative fluorescence intensity (in %)

Effect of the PBS buffer on ONP UV-vis absorption

Absorption of ONP in PBS buffer at pH = 7.4 over time was monitored by UV-vis spectroscopy at $\lambda = 420 \text{ nm}$ in a 96-well microtiter plate reader. Results are reported in Figure A4.22.

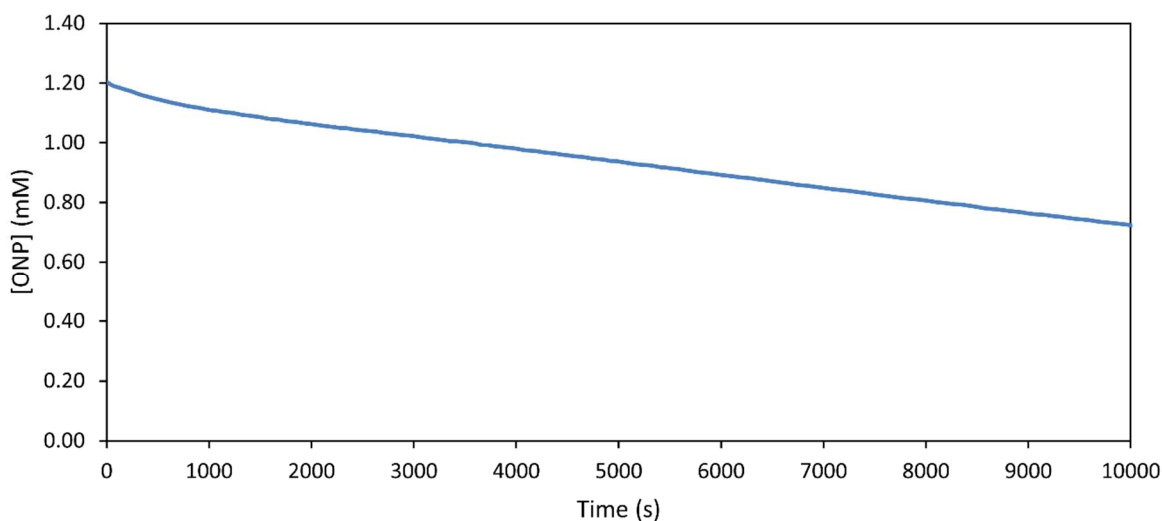


Figure A4.22 Decrease of ONP absorption in PBS buffer (pH = 7.4).

Références de la partie expérimentale

- (1) Shahane, S.; Toupet, L.; Fischmeister, C.; Bruneau, C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 54-60.
- (2) Belser, T.; Stohr, M.; Pfaltz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8720-8731.
- (3) Gokel, G. W.; Daschbach, M. M. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 886-902.
- (4) Gravel, J.; Schmitzer, A. R. *Supramol. Chem.* **2015**, *27*, 364-371.
- (5) Hynes, M. J. *J. Chem. Soc. Dalton* **1993**, 311-312.

