



HAL
open science

**Synthèse et évaluation biologique des activités
anti-biofilm d'analogues d'hémibastadine à noyau
1,2,3-triazole**

Alain Aka Kacou

► **To cite this version:**

Alain Aka Kacou. Synthèse et évaluation biologique des activités anti-biofilm d'analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole. Bactériologie. Université de Toulon; Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2019. Français. NNT: 2019TOUL0014 . tel-02502517

HAL Id: tel-02502517

<https://theses.hal.science/tel-02502517>

Submitted on 9 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par :

Alain Aka KACOU

soutenue le : **12 décembre 2019**

pour obtenir le grade de Docteur en Chimie

Spécialité : Chimie thérapeutique

**Synthèse et évaluation biologique des
activités anti-biofilm d'analogues
d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole**

THÈSE dirigée par : Pr Yves BLACHE
Pr Ag Ange Désiré YAPI

JURY :

Mme Carine MASQUEFA	Professeur, Université de Montpellier	Rapporteuse
M. Patrice VANELLE	Professeur, Aix-Marseille Université	Rapporteur
M. Michel NARCE	Professeur,	Examineur
Mme Dominique JAMET	Maître de conférences, Université de Toulon	Examinatrice
M. Yves BLACHE	Professeur, Université de Toulon	Directeur de thèse
M. Ange Désiré YAPI	Professeur agrégé, Université Félix Houphouët Boigny	Co-directeur

ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par :

Alain Aka KACOU

soutenue le : **12 décembre 2019**

pour obtenir le grade de Docteur en Chimie

Spécialité : Chimie thérapeutique

**Synthèse et évaluation biologique des
activités anti-biofilm d'analogues
d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole**

THÈSE dirigée par : Pr Yves BLACHE
Pr Ag Ange Désiré YAPI

JURY :

Mme Carine MASQUEFA	Professeur, Université de Montpellier	Rapporteuse
M. Patrice VANELLE	Professeur, Aix-Marseille Université	Rapporteur
M. Michel NARCE	Professeur,	Examineur
Mme Dominique JAMET	Maître de conférences, Université de Toulon	Examinatrice
M. Yves BLACHE	Professeur, Université de Toulon	Directeur de thèse
M. Ange Désiré YAPI	Professeur agrégé, Université Félix Houphouët Boigny	Co-directeur

Remerciements

Un travail de thèse est comparable au voyage d'un navire : parfois houleux, parfois calme, des petites avaries, des joies, etc. Quelle joie d'arriver à bon port !

Mais il a beau être un magnifique voyage personnel, que serait le voyage d'un navire, sans le chantier naval qui l'a construit, le port, les capitaines, navigateurs, membres d'équipage, passagers et autres ? Ce voyage, individuel, devient donc forcément un effort collectif. J'aimerais donc remercier tous ceux qui y ont participé.

Les universités tout d'abord. L'université Félix Houphouët-Boigny, mon « chantier naval », qui m'a « construit » L'université de Toulon, principal port d'attache et son magnifique quai : le laboratoire MAPIEM qui m'a accueilli à son bord pendant toutes ces années. Remerciements particuliers au directeur du laboratoire MAPIEM, M. CHAILAN Jean François, « commandant » disposé et paternel, (même lorsque je restais après les horaires normaux)

Remerciements à mes deux guides, mes deux « capitaines » : MM YAPI Ange Désiré et BLACHE Yves. M. YAPI, mon premier guide et capitaine. Depuis tant d'années, en tant qu'étudiant en pharmacie, interne, pharmacien et même au quotidien. Un livre de thèse ne saurait contenir tous les mots pour exprimer cette gratitude. Et à un moment donné, il a fallu aller plus loin, plus loin de la berge. Et alors, mon premier capitaine m'a confié à celui qui a été le sien : M. BLACHE Yves. Merci de m'avoir accueilli, de m'avoir encadré, formé de m'avoir tant appris.

Merci aux rapporteurs et examinateurs de cette thèse, indispensables pour une navigation sûre, dans des eaux sereines : Mmes Carine MASQUEFA et Dominique JAMET, MM. Patrice VANELLE, Michel NARCE. On a souvent peur des contrôles, audits. Pourtant, comment s'assurer qu'on ne vogue pas vers des récifs ou qu'on est arrivé à bon port, si des personnes faisant autorité ne vous le confirment ?

Ces années de thèse, j'ai navigué entre Abidjan et Toulon. Et c'était un voyage toujours chaud (dans le bon sens). Pas seulement à cause du beau climat tropical de la Côte d'Ivoire et du magnifique soleil du Var. Mais aussi et surtout, à cause des personnes, belles, chaleureuses que j'ai pu rencontrer et avec qui j'ai passé toutes ces années. Merci aux membres du MAPIEM et de l'université de Toulon en général. Chercheurs, techniciens, doctorants et post-doctorants. Quels beaux moments passés ensemble. Merci pour les moments passés au café, au repas à midi, aux barbecues, repas multiculturels etc. Merci également pour les moments en-dehors du labo. J'en oublierai certainement, mais je me lance quand même. Merci à Annick, Anthony, Aurélie et Aurélie, Benoît, Catherine, Christine, Clément, Damien, Elisa, Emmanuel, Gabriela, Gerald, François-Xavier, Isabelle, Isis, Jean-François, Marlène, Kinga, Laurie, Laure, Lucile, Mahmoud, Manar, Margaud, Mélanie, Nadja, Nesrine, Pascal, Richard, Thomas, Vitalys, William.

Si j'ai des raisons de dire merci à chacun individuellement, je vais quand même me permettre de « sélectionner » certains. Olivier, mon « partenaire » de la sorbonne de droite de la X512 (la seule chose de droite qu'il accepte) ; Raphaëlle pour l'appui au labo de bio ; Bruno pour le travail sur les analyses spectrales ; Maëlle, Claudine et Annick, qui aident à coordonner l'équipe de recherche. Et bien sûr à Sofyane, dont j'ai fait la continuité du travail et qui m'a bien aidé.

Enfin, merci particulier à ma famille.

*A mon père tout d'abord, qui n'est plus là physiquement, mais qui a tant fait pour que je sois là.
Ma chère mère, mes frères et sœurs.*

*Et enfin, merci particulier, tout particulier, à celles qui sont si chères à mon cœur. Franny !!! J'ai
été absent à ta naissance, pour tes premiers pas, et les premiers jours d'école. Mais tu m'as
quand même donné tellement d'amour ! Papa Alain te dit merci et sera toujours là pour toi. Et
maintenant Marielle. Les années de sacrifice, elles n'étaient pas que pour moi : elles ont aussi été
les tiennes. Ces années, je les ai passées loin de toi, mais tu étais toujours là pour moi. Merci
infiniment.*

*En définitive, ce voyage en solitaire qu'est la thèse, eh bien il a été le vôtre, à chacun de vous tous
et AVEC vous tous*

À tous, merci d'avoir vogué ces années avec moi !

Production scientifique

Publications

Kacou A., Ouvrard A., Jamet D., Jamet J.-L., Blache Y, Towards eco-friendly biocides: preparation, antibiofilmactivity of hemibastadin analogues, *Letters in Applied Microbiology*, 2019, 68, 360-8.

Communications orales

Kacou A., Koffi Y., Yapi A.D., Vangah-Bosson H., Kassi F., Angora E., Menan H., et Blache Y, Activités anti-biofilm d'analogues d'hémibastadine a noyau 1,2,3-triazole sur bactéries marines et *Candida albicans*, XIIIème colloque de biologie, santé publique et sciences pharmaceutiques, juillet 2019, Abidjan.

Kacou A., Yapi A.D., Blache Y, Vers de nouvelles molécules antibiofilm respectueuses de l'environnement : Etude des relations structures-activités de dérivés d'hémibastadine, Congrès de la Société Chimique de France, section PACA, avril 2017, France.

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre 1: Rappels bibliographiques

I-Les biofilms.....	4
I-1. Organisation du biofilm	4
I-1-1 Constituants d'un biofilm	4
I-1-2 Formation du biofilm.....	5
I-1-2-1 Pré-conditionnement de la surface	6
I-1-2-2 Adhésion.....	6
I-1-2-3 Croissance et maturation du biofilm	7
I-1-2-4 Dispersion du biofilm.....	7
I-1-3 Régulation du développement du biofilm	8
I-2 Biofilms dans leur environnement	8
I-2-1 Les microbiotes	9
I-2-2 Le Biofouling.....	9
I-2-3 Les microorganismes du sol	9
I-3- Biofilms et activités humaines.....	10
I-3-1 Biofilms d'intérêt.....	10
I-3-2 Problèmes engendrés par les biofilms	10
I-3-2-1 Impacts du biofouling.....	10
I-3-2-2 Biofilms dans le domaine de la santé	11
I-3-2-3 Autres domaines subissant l'impact des biofilms	13
I-4 Stratégies de lutte contre les biofilms	13

I-4-1 Stratégies de lutte antifouling en milieu aquatique	14
I-4-1-1 Historique des systèmes antifouling.....	14
I-4-1-2 Revêtements à base de biocides	14
I-4-1-3 Autres méthodes de lutte	15
I-4-2 Stratégies de lutte en milieu biomédical.....	15
II-Les hémibastadines, produits naturels marins anti-biofilm.....	17
II-1 Les produits naturels marins à activité anti-biofilm	17
II-2 Les bromotyrosines.....	18
II-2-1 Structures chimiques	18
II-2-1-1 Dérivé simples de bromotyrosines.....	18
II-2-1-2 Les oximes	19
II-2-1-3 Les bastadines	20
II-2-1-4 Les spirocyclohexadienylisoxazolines	20
II-2-2 Activités biologiques.....	21
III-Le noyau 1,2,3-triazole.....	22
III-1 Introduction	22
III-2- Noyau 1,2,3-triazole en tant que bioisostère d'autres fonctions chimiques	22
III-3 Accès au noyau 1,2,3-triazole	23
III-3-1 Obtention de dérivés 1,4-disubstitués.....	24
III-3-2 Obtention de dérivés 1,5 et 1,4,5 substitués	25
III-3-3 Méthodes sans catalyseur métallique.....	25
III-4 Activités de molécules à noyau 1,2,3-triazole.....	26
III-4-1 Molécules à activité anti-infectieuse.....	27
III-4-2 Cas des molécules à activité anti-biofilm et antifouling.....	31

Chapitre 2:

Activités des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole sur organismes marins

Introduction.....	35
I-Conception et synthèse des analogues d'hémibastadine.....	39
I-1 Structure générale des composés évalués	39
I-2 Rétrosynthèse de ces composés	39
I-3 Synthèse des composés	40
I-3-1 Synthèse des intermédiaires acide 1,2,3-triazole-4-carboxylique	40
I-3-2 Préparation des amines bromées	40
I-3-3 Réaction de couplage peptidique	41
I-3-3-1 Sélection du dérivé carbodiimide	41
I-3-3-2 Solvants	43
I-3-3-3 Purification des composés	44
I-3-4 Synthèse des composés à chaînes alkylamines	45
I-3-4-1 Voie A : Adjonction de chaîne N,N-diméthyléthylamine sur un des intermédiaires de synthèse.....	45
I-3-4-1 Voie B : adjonction de la chaîne alkylamine sur un analogue d'hémibastadine déjà synthétisé.....	47
II-Etude de l'activité anti-biofilm et impact environnemental d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole.....	48
III-Approfondissement des variations de structures des hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole et activité anti-biofilm.....	69
Introduction	69
III-1 Résultats	71
III-1-1 Analogues synthétisés.....	71
III-1-2 Essais biologiques anti-adhésion	72

III-2-2-2 Effet sur la croissance et la viabilité des bactéries	73
III-2-2-3 Activité sur biofilm multisouche	75
III-3 Discussion	80
Conclusion	82
IV- Analyse des relations structure-activités des analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole et dérivés.....	83
Introduction	83
IV-1 Méthode	86
IV-1-1 Variations de structures	86
IV-1-2 Critères de comparaison	86
IV-2 Analyse des relations structure-activités	87
IV-2-1 Présence d'un noyau aromatique à OH-phénolique et d'un méthoxyphényle	87
IV-2-1-1 Région « ouest » à noyau aromatique méthoxylé et OH-phénolique en région « est » ($R_1 = CH_3$; $R_2 = H$).....	87
IV-2-1-2 Région « ouest » à OH-phénolique et région « est » à noyau méthoxyphényle ($R_1 = H$, $R_2 = CH_3$).....	88
IV-2-2- Méthoxyphényle en régions « est » et « ouest »	89
IV-2-3 Présence d'OH phénoliques de part et d'autre du noyau 1,2,3 triazole.....	90
IV-2-4 Influence des atomes de brome	91
IV-2-5 R_1 ou $R_2 = CH_2CH_2N(CH_3)_2$: Influence de la présence de chaînes N,N-diméthyléthylamine	94
IV-2-6 Comparaison de l'activité des composés en fonction de la lipophilie.....	95
Conclusion	98

Chapitre 3:

Activité antibiofilm des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole sur *Candida albicans*

Introduction.....	101
I-Rappels bibliographiques sur <i>C. albicans</i> et son biofilm.....	103
I-1 Epidémiologie des infections à <i>C. albicans</i>	103
I-1-1 Taxonomie et morphologie.....	103
I-1-2 Pathologies et facteurs favorisants	103
I-1-2-1 Candidoses cutanéomuqueuses	103
I-1-2-2 Candidoses systémiques et profondes	104
I-1-3 Données en Côte d'Ivoire	104
I-2 Facteurs de virulence	105
I-3 Le biofilm de <i>C. albicans</i>	106
I-3-1 Morphologie et architecture du biofilm de <i>C. albicans</i>	106
I-3-2 Processus de développement	106
I-3-3 Le biofilm, facteur de virulence majeur de <i>C. albicans</i>	108
II-Evaluation de l'activité d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole sur biofilm de <i>C. albicans</i>	111
II-1 Méthodes	111
II-1-1 Composés évalués	111
II-2 Activités biologiques	112
II-2-1 Sélection de la souche	112
II-2-2 Test d'activité anti-biofilm.....	113
II-2-3 Observation des biofilms de <i>C. albicans</i>	113
II-2-3 Activité anti-fongique	113

II-3 Résultats.....	114
II-3-1 Sélection de la souche	114
II-3-2 Test d'activité anti-biofilm.....	116
II-3-3 Visualisation de l'effet du composé 3	117
II-3-4 Mesure de l'activité antifongique.....	118
II-4 Discussion.....	119
Conclusion.....	122
Conclusion générale et perspectives.....	123

Partie expérimentale

I-Voies d'obtention des composés.....	127
I-1 Réactifs et solvants	127
I-2 Purification des composés.....	127
I-3 Chromatographies	127
I-4 Caractérisation des composés et analyse spectrale	127
I-4-1 Spectroscopie RMN.....	127
I-4-2 Spectrométrie de masse	128
I-4-3 Détermination des points de fusion	128
I-5 Synthèse des composés	128
I-5-1 Synthèse du 2-bromo-4-(2-chloroethyl)-1-methoxybenzene	128
I-5-2 Synthèse du 2-bromo-4-(2-chloroethyl)phénol	128
I-5-3 Synthèse des dérivés azidoéthyles.....	128
I-5-4 Préparation des triazole à fonction acide.....	129
I-5-5 Synthèse des dérivés 4-(aminoalkyl)-2,6-dibromophenol.....	129
I-5-6 Procédure générale pour la réaction de couplage peptidique	130
I-5-7 Procédure générale pour l'alkylation des analogues d'hémibastadine.....	130

I-5-8 Composés obtenus	130
II- Bio-essais	135
II-1 Matériel utilisé.....	135
II-1-1 Solutions et milieux de culture.....	135
II-1-1-1 Väättänen Nine Salt Solution (VNSS) / VNSS Agar (224)	135
II-1-1-2 Eau de mer artificielle (ASW : Artificial Sea Water)	136
II-1-1-3. Solution de chlorure de sodium (NaCl)	136
II-1-1-4 Yeast Peptone Dextrose (YPD).....	136
II-1-1-5 RPMI 1640 + L-glutamine.....	136
II-1-1-6 Solution de tampon phosphate salin ou Phosphate Buffered Saline	137
II-1-2 Fluorochromes et réactifs de révélation	137
II-1-2-1 SYTO [®] RED 61	137
II-1-2-2 Cristal Violet.....	137
II-1-2-3 Résazurine.....	137
II-1-3 Matériel biologique : Souches.....	138
II-1-3-1 Souches bactériennes	138
II-1-3-2 Souches de <i>Candida albicans</i>	138
II-2 Méthodes	139
II-2-1 Bio-essais <i>in vitro</i> sur bactéries marines	139
II-2-1-1 Bio-essais anti-adhésion.....	139
II-2-1-2 Test d'inhibition de croissance/toxicité	142
II.2.1.3 Evaluation de l'effet des molécules par microscopie confocale	142
II-2-2 Evaluation de l'impact des molécules sur la viabilité d'organismes marins	146
II-2-2-1 Site d'étude et mode de prélèvement	146
II-2-2-2 Préparation des cultures zooplanctoniques	147

II-2-2-3 Préparation des cultures phytoplanctoniques.....	147
II-2-2-5 Suivi des populations pico- et nano-phytoplanctoniques et bactériennes	148
II-2-2-6 Indices de diversité.....	148
II-2-2-7 Analyses statistiques	148
II-2-3 Bio-essais sur <i>Candida albicans</i>	149
II-2-3-1 Test anti-biofilm.....	149
II.2.3.2 Test de sensibilité.....	149
Références bibliographiques.....	101
Annexe.....	101

Liste des abréviations

AcOEt Acétate d'éthyle
ADN Acide DésoxyriboNucléique
AHL AcylHomosérine lactone
ARN Acide RiboNucléique
ASW *Artificial Sea Water* (eau de mer artificielle)
CCM Chromatographie sur Couche Mince
CHCl₃ Chloroforme
CE₅₀ Concentration effective d'inhibition à 50%
CH₂Cl₂ Dichlorométhane
CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)
CMI Concentration minimale inhibitrice
CV Cristal violet
DAPI 4',6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride
DIPEA N,N-diisopropyléthylamine
DMF N,N-Diméthylformamide
DMSO Diméthylsulfoxyde
DO Densité Optique
EDC 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Eq. Équivalent molaire
ESI ElectroSpray Ionization (ionisation par électronébulisation)
HOBT 1-hydroxybenzotriazole
MeOH Méthanol
NBS N-bromosuccinimide
Nm nanomètre
NSS Nine-Salt Solution
PBS Phosphate Buffer Saline
Rdt Rendement
RMN Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI Roswell Park Memorial Institute
TBT Tributylétain
TBTO TriButylTin Oxide (Oxyde de tributylétain)
TC Toulon Collection (collection de Toulon)
TEA Triéthylamine
THF Tétrahydrofurane
TMS Tétraméthylsilane
VNSS Vääänen Nine Salt Solution
Zineb Zinc éthylène-bis-dithiocarbamate
CuAAC Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne et un azoture catalysée par le cuivre
OMI Organisation Maritime Internationale
PNM Produits naturels marins
RSA Relations structure-activité
DIPEA N,N-diisopropyléthylamine
CuSO₄.H₂O Sulfate de cuivre pentahydrate

EtOH Ethanol
QS quorum sensing
YPD Yeast Peptone Dextrose
 μM $\mu\text{mol/L}$

Liste des Figures

Figure 1: Etapes de formation d'un biofilm sur une surface inerte	5
Figure 2: processus de mise en place du biofouling.....	9
Figure 3: surfaces colonisées par le biofouling	10
Figure 4: exemples de pathologies à biofilm.....	13
Figure 5: exemples de dérivés simples bromotyrosines	18
Figure 6: exemples d'oximes-histamines	19
Figure 7: exemple d'oxime-disulfure.....	19
Figure 8: structure des aplysamines	19
Figure 9: a) bastadine 1 b) dibromohémibastadine 1.....	20
Figure 10: l'aeroplysine-1	21
Figure 11: comparaison entre (a) le noyau 1,2,3-triazole-1,4-disubstitués et la fonction Z-trans-amide d'une part et (b) le noyau 1,2,3-triazole-1,5-disubstitués et la fonction E-cis-amide d'autre part	22
Figure 12: régiosélectivité de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azide en fonction des conditions réactionnelles	23
Figure 13: mécanisme de catalyse de la CuAAC	24
Figure 14: schéma de la synthèse de 1,2,3-triazoles 1,4,5-trisubstitués par l'intermédiaire d'un organomagnésien	25
Figure 15: schéma général de la synthèse de composés à noyau 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués par réaction de N-tosylhydrazones avec des anilines en présence d'iode et de TBPB.....	25
Figure 16: schéma de synthèse de 1,2,3-triazole par réaction one pot couplée Knoevenagel-cycloaddition azide-alcyne et indole aldéhyde.....	26
Figure 17: réaction entre un aryle-azide et un alkylidène malonitrile.....	26
Figure 18: exemples de médicaments commercialisés à noyau 1,2,3-triazole: le tazobactam et la cefatrizine	26
Figure 19: structure générale des naamines et isonaamines et de leurs analogues à noyau 1,2,3-triazole 1,5 et 1,4 disubstitués.....	32
Figure 20: structures générales des terpénoïdes à noyau 1,2,3-triazole	32
Figure 21: structures générales des principaux analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazoles analogues de a) moloka'iamines b) psammapline A, c) hémibastadine	33

Figure 22: structure générale et principaux représentants naturels d'hémibastadines	35
Figure 23: structure de la dibromohemibastadine-1	35
Figure 24: structures d'analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazole	37
Figure 25 : structure de l'analogue d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole le plus actif.	37
Figure 26: structure générale des composés synthétisés indiquant les points de modulation chimique	39
Figure 27: analyse rétrosynthétique des analogues d'hemibastadine à noyau 1,2,3-triazole	39
Figure 28: schéma de synthèse des intermédiaires acide 1,2,3-triazole-4-carboxyliques .	40
Figure 29: schéma général de la bromation des amines aromatiques	40
Figure 30: schéma général de la réaction de couplage peptidique	41
Figure 31: spectres RMN du composé 2 après couplage peptidique avec du DCC (a) et de l'EDC (b)	42
Figure 32: spectre RMN du composé 2 montrant les traces de DMF après purification ...	43
Figure 33: analyse rétrosynthétique des composés à chaîne N,N-diméthyléthylamine montrant les deux voies de synthèse possibles.....	45
Figure 34 : analyse rétrosynthétique d'un intermédiaire de type triazole 1,2,3carboxylique à fonction N,N-diméthyléthylamine.....	45
Figure 35: étapes de l'alkylation d'une amine aromatique.....	46
Figure 36: schéma de la réaction d'alkylation des hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole	47
Figure 37: structure des composés de la première série évaluée.....	48
Figure 38: variations de structures entreprises pour l'étude des relations structure-activités des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole	70
Figure 39: courbes de croissance des bactéries en présence des composés Sélectionnés .	73
Figure 40: pourcentage de viabilité des différentes souches bactériennes en présence des molécules sélectionnées et d'éthanol à 50%	74
Figure 41: courbes de croissances des souches TC4, TC11 et TC10-pX5-GFP composés 5j et 5l en comparaison à un témoin sans composé et à l'éthanol	76
Figure 42: pourcentages de viabilité des souches bactériennes en présence des analogues d'hémibastadines.....	77

Figure 43: image par microscopie confocale des biofilms multiscouches de TC4, TC11 et TC10-PX5-GFP sans composé et avec les composés 5j et 5l	78
Figure 44: biovolumes comparés des souches TC4, TC10-pX5-GFP et TC11 sans ajout de composés anti-biofilm et avec l'ajout des molécules 5j et 5l	79
Figure 45: variations de structures étudiées pour l'établissement des relations structure-activités des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole	86
Figure 46: Comparaison des CE_{50} des composés en fonction de leur lipophilie	96
Figure 47: différents aspects morphologiques de <i>C. albicans</i>	103
Figure 48: processus de formation du biofilm de <i>C. albicans</i>	107
Figure 49: principales infections à biofilm de <i>C. albicans</i>	108
Figure 50: structure générale des molécules testées.....	111
Figure 51: valeur comparée des D.O. des biofilms des 3 souches de <i>C. albicans</i>	114
Figure 52: biofilm de la souche <i>C. albicans</i> n°17649 observé en microscopie optique grossissement x40	115
Figure 53: images en microscopie confocale de la souche de <i>C. albicans</i>	115
Figure 54: activité comparée des molécules testées en fonction de la concentration	116
Figure 55: biofilm de <i>C. albicans</i> en présence du composé 3 en microscopie confocale	117
Figure 56: biovolumes(a) et épaisseurs moyennes (b) de la souche test de <i>C. albicans</i> en présence ou non du composé 3	117
Figure 57 : Schéma d'ensemencement des microplaques pour le bio-essai anti-adhésion.	140
Figure 58: schéma d'ensemencement des microplaques pour le marquage des souches bactériennes.....	143
Figure 59: carte représentant la situation de la rade de Toulon avec S1, point de prélèvement	146
Figure 60: schéma du plan de plaque pour la détermination de la CMI.....	150

Liste des tableaux

Tableau 1 : stratégies anti-biofilm en milieu biomédical (82)	16
Tableau 2: exemples de molécules à activités anti-infectieuses possédant le noyau 1,2,3-triazole	27
Tableau 3: comparaison des résultats du couplage peptidique avec de l'EDC et du DCC pour l'obtention du composé 2	41
Tableau 4: conditions expérimentales pour l'alkylation du composé 2	47
Tableau 5: caractéristiques des composés de la première série.....	49
Tableau 6: analogues d'hémibastadines obtenus	71
Tableau 7: activités anti-adhésion des composés évalués.....	72
Tableau 8: activités anti-adhésion des composés 5j et 5l sur les souches TC4, TC11 et TC10-pX5-GFP	75
Tableau 9: analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole antérieurement synthétisées	83
Tableau 10: activités anti-biofilm de la première série d'analogues d'hémibastadines (10)	83
Tableau 11: analogues de cinnamides à noyau 1,2,3-triazole évaluées	84
Tableau 12: activités anti-adhésion d'analogues de cinnamides à noyau 1,2,-triazole.....	85
Tableau 13: logP et CE ₅₀ des composés.....	95
Tableau 14: molécules testées et leurs performances CE ₅₀ en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sur souches bactériennes marines TC14, TC8 et 4M6, avec les écart-types des moyennes établies.....	112
Tableau 15: activité des molécules en $\mu\text{M} \pm$ exprimant les écart-types)	116
Tableau 16: préparation pour les marquages monospécifiques	145
Tableau 17: préparation pour les marquages multisouches	145
Tableau 18: estimation de la vitalité en fonction de la proportion d'individus en état de fonctionnement ou non altéré.....	148

Introduction générale

Introduction générale

La croissance des microorganismes est classiquement décrite selon 2 modalités : des cellules isolées indépendantes ou des agrégats sessiles. Le premier, mieux connu correspond au mode planctonique, le second au biofilm. Le biofilm peut être défini comme une communauté de microorganismes attachés à un support immergé et entourés d'une matrice extra-cellulaire auto-induite (1).

Les microorganismes organisés en biofilm vont présenter des propriétés particulières. Il s'agit de particularités en termes d'expressions de gènes, de persistance que de tolérance aux facteurs délétères. De ce fait, les conséquences de ce mode de vie vont se manifester dans des domaines aussi divers et variés que le milieu aquatique, le domaine industriel, ou encore le secteur biomédical (2).

Ainsi, en milieu aquatique, la formation de biofilm sur des surfaces immergées conduit au phénomène dit de biofouling ou biosalissure. Il correspond à la colonisation de surfaces inertes ou immergées par des organismes vivants. Ce phénomène peut avoir des conséquences négatives tant sur le plan économique qu'environnemental : augmentation de la consommation en carburant des navires, accélération de la corrosion, introduction d'espèces invasives, diminution de la production en aquaculture etc (3). Dans le secteur biomédical, les impacts sont également nombreux. En effet, si les infections aiguës sont classiquement considérées comme dues au mode de vie planctonique des microorganismes, les infections chroniques et récidivantes seraient principalement dues à la formation de biofilms (1). De plus, par la colonisation du matériel et des dispositifs médicaux, la formation des biofilms va être une cause importante d'infections nosocomiales (4). La production industrielle, les réseaux d'adduction d'eau potable ne sont pas en reste en ce qui concerne les conséquences de la formation de biofilms.

Face aux problèmes posés sur les activités humaines, il est apparu nécessaire de développer des stratégies de lutte efficaces contre les biofilms. Dans la mesure du possible, il serait opportun que celles-ci soient non toxiques aussi bien pour l'homme que pour l'environnement, et ce, tant en ce qui concerne leur processus de préparation que leur mécanisme d'action. Si, dans le milieu maritime, il a existé des solutions antifouling avec des peintures à base d'étain, celles-ci sont maintenant interdites du fait de leur impact négatif sur l'environnement (5). Dans le domaine médical, les anti-infectieux classiques s'avérant peu efficaces en cas de formation d'un biofilm, il existe peu de solutions adaptées à ce phénomène

(6). Le besoin se fait également sentir dans le milieu industriel et de façon générale, dans toutes les activités humaines pouvant subir l'impact de ce phénomène.

Dans ce contexte, l'une des stratégies les plus en vue est le recours à des molécules présentant une action anti-biofilm stricte. Dans cette perspective, les produits naturels marins peuvent présenter de l'intérêt (7,8). En effet, le milieu marin est un milieu de compétition intense entre organismes et le biofouling y est un phénomène naturel. De fait de nombreux organismes ont développé des stratégies visant à s'en protéger. Toutefois, ces molécules produites peuvent l'être en quantité faible, s'avérer toxiques, ou ne pas être stables. De plus, la production visant à satisfaire les besoins en prélevant directement les ressources naturelles entraînerait une surexploitation des écosystèmes. Il serait donc utile de développer des analogues de synthèse ou d'hémisynthèse de ces molécules, avec une activité anti-biofilm optimisée, une toxicité faible pour les êtres vivants en général et exerçant une faible pression de sélection de micro-organismes résistants. Tout ceci, se faisant idéalement selon des voies de préparation respectueuses de l'environnement.

Dans cette perspective, de précédents travaux ont montré l'intérêt de composés dérivés d'hémibastadines. Il s'agit de molécules appartenant à la grande famille des bromotyrosines, extraites d'éponges de mer du genre *Verongula* et présentant de nombreuses activités biologiques : antiparasitaires, antibactériennes, anticancéreuses et antifouling (9). Le remplacement du linker central de type oxime par un noyau de type 1,2,3-triazole dans ces molécules a ainsi présenté l'avantage de conduire à des composés ayant une activité inhibitrice stricte d'adhésion bactérienne, sans activité anti-bactérienne. Elles sont obtenues par l'intermédiaire de réaction dites de chimie click de type cyclo-addition de Huisgens, utilisant des réactifs et des solvants peu toxiques pour l'environnement (10).

La présente thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux visant à mettre au point des molécules à activité anti-biofilm stricte mais étendue à tous types de microorganismes, sans activité antimicrobienne et non toxiques pour l'homme et l'environnement. Les travaux décrits concernent plus spécifiquement l'extension de l'étude de l'impact des variations de structure en série des analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole permettant un approfondissement des études de relations structure-activités dans cette série de composés à visée anti-biofilm. Ce travail a également permis d'évaluer les composés dans des conditions plus proches du réel, d'une part en vérifiant leur capacité à inhiber des biofilms multispécifiques et d'autre part en évaluant leur toxicité sur organismes marins. Enfin, il a également permis d'évaluer la capacité de ces analogues de produits naturels marins à être utilisées sur des biofilms autres que ceux

constitués de bactéries marines, en l'occurrence des biofilms fongiques formés par *Candida albicans*.

Cette thèse comporte trois chapitres.

- Le premier est une synthèse bibliographique portant sur les éléments suivants :
 - Le phénomène de biofilm et ses conséquences diverses, avec les principales stratégies de lutte développées en fonction des secteurs.
 - Les produits naturels marins, en particulier les hémibastadines, alcaloïdes de la famille des bromotyrosines.
 - La chimie des 1,2,3-triazoles, notamment le mode d'obtention.
- Le deuxième est consacré à l'approfondissement de l'étude de l'activité de ces analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole sur organismes marins. Il se subdivisera lui-même en 3 parties :
 - Une première portant sur l'impact d'une modulation ponctuelle de la structure, en l'occurrence la réduction du nombre d'atomes de carbone de chaîne carbonée. Elle a également permis d'évaluer l'activité de ces composés sur un plus grand nombre de souches bactériennes, leur capacité à inhiber la formation de biofilms constitué de plusieurs souches et un premier niveau de toxicité en milieu naturel
 - La deuxième traitera d'un approfondissement des variations de structure afin de sélectionner des composés à activité plus étendue
 - La dernière partie a consisté, en combinant les présents travaux aux précédents à réaliser une analyse des relations structure-activités sur cette famille de composés.
- Le troisième porte sur l'évaluation de l'activité anti-biofilm de ces composés sur biofilm fongique, en l'occurrence sur biofilm de *C. albicans*. Il est ainsi subdivisé :
 - Rappels bibliographiques sur *C. albicans*, son épidémiologie et les particularités de son biofilm
 - L'évaluation à proprement parler de l'activité anti-biofilm d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole sur le biofilm de *C. albicans*.

Chapitre 1 : **Rappels bibliographiques**

I- Les biofilms

Un biofilm est une structure complexe constituée de microorganismes et d'une matrice extra-cellulaire auto-induite. Ce mode de vie est connu depuis très longtemps. En effet, dès le XVII^{ème} siècle, Van Leeuwenhoek décrivait des bactéries sessiles grâce à l'observation de la plaque dentaire (11). Si le terme biofilm est apparu pour la première fois en 1961 en URSS (12), les recherches sur la question sont longtemps restées relativement peu développées, portant uniquement sur des questions environnementales et sur l'odontologie et encore, de façon relativement limitée. L'évolution des techniques a permis de comprendre qu'il s'agit à la réalité du mode de vie préférentiel des microorganismes et qu'il est rencontré dans tous les environnements. Elle a également permis de mieux appréhender les processus spécifiques liés à ce mode de vie et comment il est impliqué dans divers phénomènes ayant un impact sur les activités humaines (biofouling, infections chroniques et récidivantes entre autres). Ces 20 dernières années ont ainsi connu une importante croissance du nombre de travaux sur cette thématique (1,13,14).

Il a de fait été possible de connaître plus en détail la constitution de ces biofilms, comment ils s'établissent et quelles sont les propriétés particulières conférées par ce mode de vie aux microorganismes qui le constituent. Ces propriétés peuvent parfois être exploitées, mais sont aussi à l'origine de problèmes spécifiques nécessitant la mise en place de stratégies de lutte adaptées.

I-1. Organisation du biofilm

I-1-1 Constituants d'un biofilm

Un biofilm est essentiellement constitué de microcolonies de microorganismes entourées d'une matrice extracellulaire, celle-ci constituant environ 85% du biofilm.

Différents types de microorganismes peuvent former un biofilm : bactéries, mais également levures ou encore archées. (12, 13) Ces biofilms peuvent être monospécifiques (avec une seule espèce de microorganismes) ou multispécifiques.

La matrice extracellulaire quant à elle est constituée de différents éléments : eau, exopolysaccharides, acides nucléiques extra-cellulaires, protéines. Leurs proportions relatives varient en fonction de paramètres aussi divers que les microorganismes en présence, la maturité du biofilm, l'environnement, le support (15–17).

I-1-2 Formation du biofilm

Bien que le mode de vie planctonique soit le plus étudié et permette un taux de croissance plus élevé (17), les biofilms seraient prédominants dans l'environnement. En effet, les conditions de laboratoire, favorables au développement rapide des microorganismes faciliterait le mode de vie planctonique. Mais en environnement non contrôlé, la formation de biofilms serait favorisée pour 4 raisons essentielles (13) :

- Défense : la formation de biofilm serait une réponse aux stress environnementaux (flux sanguin, salive, courants marins etc.)
- Colonisation : en biofilm, les microorganismes peuvent atteindre des niches plus favorables, riches en nutriments et s'y maintenir durablement
- Le mode de vie sessile serait le mode de développement par défaut de certaines bactéries, du fait de conditions particulièrement défavorables de leur niche écologique naturelle (cas des streptocoques oraux) (18)
- La recherche de la vie en communauté, avec à la clé, les avantages suivants
 - o Répartition des fonctions métaboliques
 - o Facilitation du transfert de gènes
 - o Coopération

Le processus de formation d'un biofilm est classiquement décrit en 5 étapes, comme décrit dans la figure 1 (12, 18, 19).

- Pré-conditionnement de la surface colonisée
- Adhésion des micro-organismes
- Croissance et prolifération des cellules
- Maturation du biofilm
- Détachement des cellules

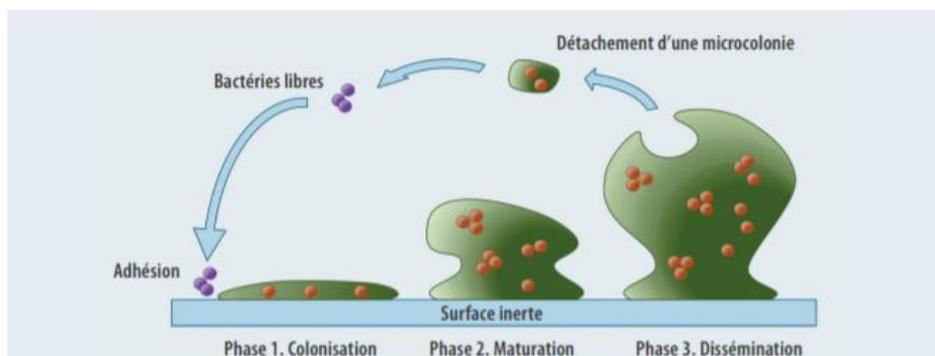


Figure 1: Etapes de formation d'un biofilm sur une surface inerte (21)

I-1-2-1 Pré-conditionnement de la surface

La formation du biofilm nécessite une préparation physico-chimique de la surface à coloniser par adsorption de molécules organiques et inorganiques du milieu, formant un film primaire. Elles apportent ainsi une plus grande concentration en nutriments et facilite l'attachement ultérieur des micro-organismes à la surface. Pour cette étape, les caractéristiques physico-chimiques de la surface concernée, mais également la nature des substances adsorbées sont prépondérantes. En effet, si certaines sont favorables, d'autres peuvent inhiber cette adhésion ultérieure. Ainsi, la présence de protéines, de polysaccharides, de sels minéraux favoriserait l'adhésion de microorganismes (22,23). En revanche, une concentration de lait écrémé inférieure à 1% (donc appauvrie en protéines) réduirait l'adhésion de spores et cellules végétatives de bacilles thermophiles. (24).

Une fois les conditions adéquates réunies, les microorganismes peuvent adhérer à la surface.

I-1-2-2 Adhésion

Les microorganismes vont adhérer à la surface cible (ou entre eux) par des mouvements passifs (mouvements browniens, convections) et actifs (par l'intermédiaire de flagelles) (20,25,26). Ce chimiotactisme va être favorisé par la présence de conditions favorables au niveau de la surface : présence de nutriments, absence de toxines (26). Divers autres facteurs comme le pH du milieu, les charges ioniques, l'osmolarité, la température à la surface à coloniser influencent l'adhésion.

L'adhésion est d'abord réversible : les microorganismes peuvent alors se détacher facilement et revenir à un état planctonique libre. L'adhésion fait à ce stade intervenir des forces de van der Waals et les effets ioniques entre la bactérie et la surface. Le lien entre la bactérie et la surface se fait par l'intermédiaire de pont intermoléculaires, mais la bactérie peut encore facilement se détacher sous l'influence de mouvement browniens ou des contraintes du milieu (27). Après cette phase d'adhésion réversible va s'établir une adhésion irréversible. Elle se fait grâce à la production de diverses structures exopolymériques, variant en fonction des microorganismes. Pour les bactéries GRAM Négatif par exemple, il s'agira notamment des pili ou fimbriae pour *Pseudomonas aeruginosa* (20) de curli pour les *Enterobacteriaceae* (28), des protéines de la capsule et du glycocalyx. La production d'exopolysaccharides (EPS) participe également à cette liaison irréversible à la surface colonisée.

I-1-2-3 Croissance et maturation du biofilm

Une fois les microorganismes liés de façon irréversible, le biofilm va accélérer sa maturation. Elle va consister en une multiplication plus active des microorganismes et une accélération de la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire. Le biofilm va augmenter en épaisseur tout en se remodelant en permanence en fonction des conditions du milieu. Cette phase va également être marquée par d'importantes modifications phénotypiques, liées à l'expression de gènes spécifiques au mode de vie en biofilm (20). Les facteurs extérieurs mais également les communications intercellulaires, notamment le quorum sensing (QS), vont participer à la croissance et la maturation du biofilm. Les polysaccharides présents à la surface des bactéries participent également fortement à cette maturation. Au cours de cette phase, les microcolonies vont croître, séparées par des éléments de la matrice extracellulaire. Il existe également des phénomènes d'autolyse ou de « cannibalisme/fratricide ». Il permet de fournir du matériel génétique pouvant être transféré aux autres bactéries de la communauté. Il enrichit également la matrice extracellulaire en nutriments et acides nucléiques extracellulaires (29).

I-1-2-4 Dispersion du biofilm

Le processus de dispersion du biofilm fait totalement partie du métabolisme du biofilm. En effet, il participe à sa réorganisation permanente (lui permettant de s'adapter aux conditions du milieu) et permet également aux microorganismes constituant la communauté de se détacher pour aller coloniser de nouvelles niches écologiques plus favorables (29,30).

Le détachement consiste en une réduction globale de la masse totale du biofilm. Il peut s'agir de phénomènes passifs (érosion, relargage) ou de phénomènes actifs. L'érosion correspond à un détachement de cellules individuelles ou d'une faible portion de biofilm, tandis que l'abrasion correspond à un détachement d'une masse importante. Ces phénomènes passifs sont dus aux forces de cisaillement causées par les conditions hydrodynamiques. (25,30). Dans le cas du détachement actif, il s'agit du résultat de l'activation de mécanismes génétiques de régulation du biofilm avec départ d'une ou plusieurs cellules bactériennes qui reviennent en mode planctonique. Toutefois, celles-ci vont tout de même garder certaines caractéristiques de la vie en biofilm, comme par exemple l'antibiorésistance ou la tolérance aux actions du système immunitaire de l'hôte dans le cas de bactéries pathogènes (31,32).

I-1-3 Régulation du développement du biofilm

La régulation du biofilm est sous le contrôle de nombreux gènes, spécifiques ou non. Ils participent aux différentes étapes de sa formation et à différentes fonctions telles que l'attachement, la production de la matrice extra-cellulaire, la dispersion etc. L'activation ou l'inhibition de ces différents gènes va être sous l'influence de différents facteurs.

La composition physico-chimique de l'environnement immédiat du biofilm est l'un des plus importants. Ainsi, la concentration en oxygène (33,34), en oxyde nitrique (30,35,36) peuvent intervenir dans le métabolisme du biofilm. De même, la concentration en divers sels (NaCl, CaCl₂, MgCl₂) chélateurs de métaux (tels que l'EDTA), le pH du milieu peuvent également influencer sur la formation du biofilm.

Le biofilm étant une communauté de microorganismes, les communications intercellulaires jouent également un rôle clé dans le métabolisme. Elles permettent aux microorganismes de coordonner leur adaptation aux contraintes du milieu. Différents systèmes de communications peuvent intervenir. Le quorum sensing (QS) est un système de communication basé sur des molécules signal appelées auto-inducteur. On note les auto-inducteurs de type 1 (AI-1), de type acylhomosérine lactone (AHL) et les auto-inducteurs de type 2 (AI-2) et le *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS), spécifique à *Pseudomonas aeruginosa*. Le QS, outre le biofilm, intervient également dans divers autres mécanismes tels que l'expression de facteurs de virulence ou la bioluminescence.

Outre les molécules du QS, d'autres molécules interviennent dans les échanges intercellulaires, tels que l'indole ou l'antraniolate (37,38).

Enfin, le C-di-GMP est un second messenger intra-cellulaire jouant un rôle important dans le passage du mode planctonique au mode sessile, dans la production de la matrice extracellulaire ainsi que dans la dispersion du biofilm (39).

I-2 Biofilms dans leur environnement

Le mode de vie sessile est le mode de vie préférentiel de la plupart des bactéries. De ce fait, les biofilms vont être des éléments constitutifs de nombreux écosystèmes. Ainsi, on va les retrouver, entre autres, en milieu immergé, dans les sols, mais également chez l'homme et les animaux où ils constituent des microbiotes commensaux.

I-2-1 Les microbiotes

Les microbiotes sont constitués de microorganismes, nombreux et diversifiés vivant en symbiose avec l'organisme humain et localisés dans divers organes. Le microbiote intestinal par exemple contient entre 500 et 1000 espèces bactériennes, mais également des archées, fungi et virus (40–42). Les microorganismes sont également présents au niveau oral, la plaque dentaire étant historiquement le premier site d'étude des biofilms (1,11). On peut également citer le microbiote vaginal (43–45). Même le tractus urinaire, longtemps considéré comme stérile serait à la réalité colonisé par de nombreuses bactéries (46,47). Ces différents microorganismes commensaux jouent un rôle important dans l'homéostasie.

I-2-2 Le biofouling

Les surfaces immergées (mais également l'interface entre l'air et l'eau), constituent un milieu favorable pour la mise en place du biofouling ou biosalissure marine. Il s'agit de l'agrégation d'organismes vivants sur ces surfaces. Il débute par un microfouling, qui est la formation d'un biofilm de divers microorganismes, créant un environnement favorable pour le macrofouling, l'adhésion d'organismes macroscopiques (Fig. 2). Ce phénomène, naturel, peut se réaliser aussi bien sur des surfaces vivantes que sur des surfaces inertes.

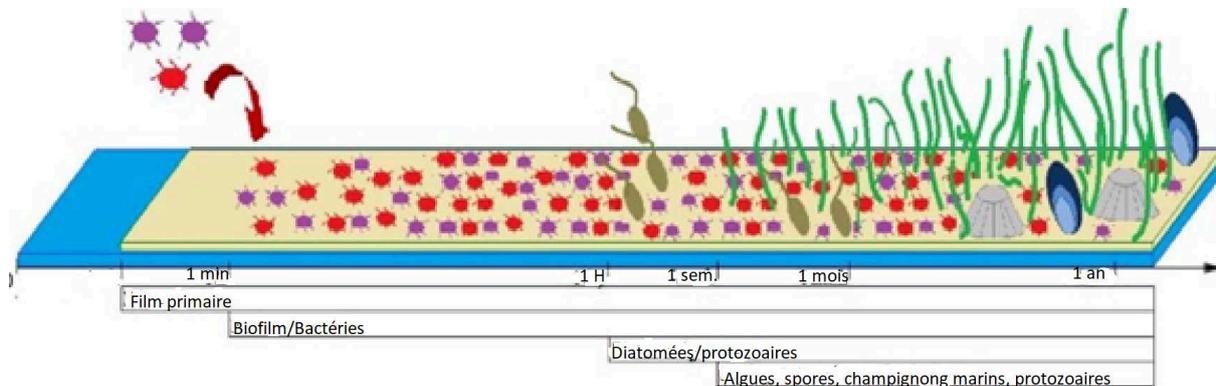


Figure 2: processus de mise en place du biofouling (5)

I-2-3 Les microorganismes du sol

Le sol est un environnement riche en microorganismes. Ceux-ci sont notamment à l'interface avec les minéraux du sol qui peuvent constituer une surface permettant la formation du biofilm (48). Il s'agit également d'une grande variété de microorganismes, particulièrement présents dans les rhizosphères, ces fines couches de sol entourant les racines et par leurs interactions avec les racines des plantes. Ces rhizosphères, notamment grâce à ces microorganismes, jouent un rôle important dans la vie des écosystèmes terrestres (49,50).

I-3- Biofilms et activités humaines

La formation d'un biofilm est un phénomène naturel, retrouvé dans d'innombrables niches écologiques. Ce phénomène va donc interférer avec de nombreuses activités humaines. Leurs propriétés pourront s'avérer utiles dans certains cas et être exploitées. Mais il arrive également des situations où la formation des biofilms peut avoir des conséquences néfastes, tant sur les activités en milieu aquatique, en santé ou dans le domaine industriel.

I-3-1 Biofilms d'intérêt

Les biofilms peuvent représenter un intérêt dans divers domaines. Ils peuvent être utilisés en bioremédiation, pour éliminer tant les polluants organiques que les métaux lourds (51,52). De même, les exopolysaccharides et autres substances constitutives de la matrice extracellulaire peuvent avoir des applications. C'est par exemple le cas des exopolymères de microorganismes extrémophiles (53). Des travaux ont permis de mettre en évidence leurs propriétés antitumorales (54,55), immunomodulatrices (56), antioxydantes (57) et également leur intérêt dans l'industrie alimentaire, notamment comme bio-émulsifiants (58,59). Il a également été démontré leur capacité à être utilisés pour de la micro-encapsulation (60).

I-3-2 Problèmes engendrés par les biofilms

Si les biofilms sont étudiés pour les intérêts qu'ils présentent et qui peuvent éventuellement être exploités, ils le sont également pour les problèmes qu'ils posent dans divers domaines : milieu marin, domaine de la santé, industrie etc.

I-3-2-1 Impacts du biofouling



Figure 3: surfaces colonisées par le biofouling:(a) coque d'un navire (61); (b) filet colonisé (5)

Le biofouling est un phénomène naturel, lié à la richesse en microorganismes du milieu aquatique. Cependant, il peut également se mettre en place sur des surfaces artificielles immergées (pipelines, coques de navires, plate-forme pétrolière, installations d'aquaculture, etc.) comme le montre la figure 3, avec pour conséquences :

- L'accélération de la corrosion (2, 61, 62), particulièrement face aux bactéries sulforéductrices
- La perturbation de l'hydrodynamique des navires : en se formant sur les coques de navires, le biofouling entraîne une perturbation de l'écoulement hydrodynamique. Cette perturbation va avoir pour conséquences un ralentissement des navires, une augmentation de la consommation en carburant (d'où l'augmentation de l'émission de gaz à effet de serre). A noter que dès le stade de microfouling cette perturbation apparaît déjà.
- L'introduction d'espèces invasives, avec risque de perturbation des écosystèmes
- La perturbation de l'aquaculture. Celle-ci va subir l'impact du biofouling de plusieurs manières. Le biofouling en s'attaquant aux filets et grilles de protection, rend difficile leur maniement (64). Il va également perturber l'apport en nutriment et oxygène pour les poissons (65,66). Il peut enfin favoriser le développement de microorganismes pathogènes pour les espèces d'élevage (67).

I-3-2-2 Biofilms dans le domaine de la santé

Les biofilms vont avoir un impact important en santé. En effet, s'il est classiquement considéré que les infections aiguës sont dues au mode planctonique, les infections chroniques seraient principalement liées au mode de vie sessile (5, 60).

L'une des principales caractéristiques des organismes en biofilm est leur faible susceptibilité face aux anti-infectieux comparé aux microorganismes en mode planctonique (1). Plusieurs mécanismes permettent de l'expliquer (20).

- Faible pénétration des molécules à l'intérieur du biofilm, liée aux propriétés physico-chimiques de la matrice extra-cellulaire
- Différents stades métaboliques à l'intérieur du biofilm, notamment métabolismes altérés
- Présence de cellules persistantes
- Surexpression de mécanismes de résistance et de gènes spécifiques
- Tolérance à la phagocytose et au système immunitaire

Les infections à biofilm posent ainsi d'importants problèmes thérapeutiques, mais également des problèmes de diagnostic, car les techniques classiques de microbiologie sont principalement adaptées au mode de vie planctonique (1,68). Ces infections peuvent être de divers types et être à la base de pathologies variées, parfois graves voire mortelles.

La plaque dentaire étant l'un des premiers sites d'étude du biofilm, les infections liées aux biofilms oraux sont des modèles assez souvent rencontrés et étudiés. Elles concernent aussi bien les caries, les périodontites ou encore le développement de microorganismes sur le matériel implanté, pouvant aller jusqu'à sa destruction (1, 68). Les plaies chroniques constituent un autre cas d'infection à biofilm fréquent. Le pied diabétique constitue un exemple typique (70). Les infections récurrentes à *Pseudomonas aeruginosa* constituent également un problème récurrent d'infections à biofilms chez les malades atteints de mucoviscidose (68,70).

La capacité de certains pathogènes à former des biofilms en milieu aquatique favoriserait leur survie dans l'environnement constituant ainsi un facteur de dissémination. Cette capacité permettrait ainsi à *Vibrio cholerae* de persister dans des réservoirs naturels, entretenant des foyers épidémiques (71). C'est également le cas d'une maladie telle que l'ulcère de Buruli. Maladie nécrosante de la peau, elle est causée par *Mycobacterium ulcerans* qui va former des biofilms dans l'environnement et qui serait transmise à l'homme par l'intermédiaire de punaises d'eau. Cette mycobactérie va également former un biofilm cutané, avec production de mycolactones ayant un effet nécrosant et suppresseur des cellules immunitaires (72–74).

Les infections à biofilm sont également retrouvées dans les infections ostéo-articulaires chroniques, que celles-ci soient liées à du matériel implanté, consécutives à une diffusion hématogène ou par contiguïté. Associé au fait que l'os est déjà un organe où la diffusion des antibiotiques est difficile, le traitement de ces pathologies va s'avérer particulièrement compliqué (75).

On peut enfin noter l'implication des biofilms dans les échecs de traitement des infections gynécologiques, pouvant être cause d'infertilité (76).

La figure 4 permet d'observer des exemples de pathologies à biofilm.

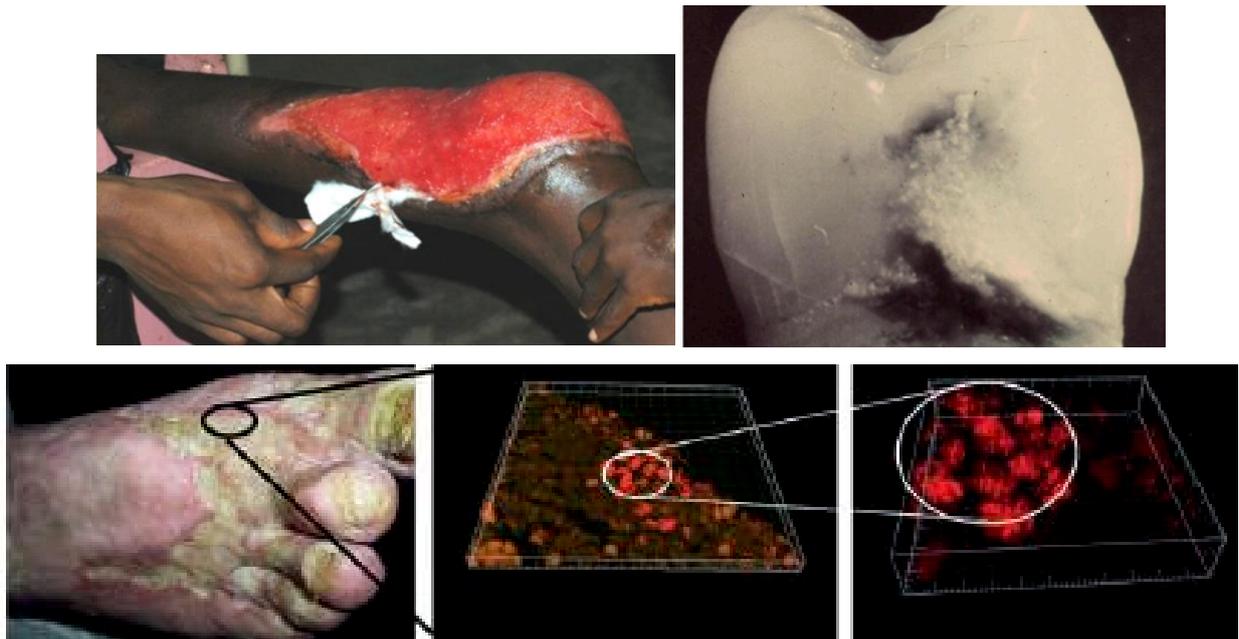


Figure 4: exemples de pathologies à biofilm a) l'ulcère de buruli; b) carie dentaire; c) plaie chronique à biofilm de *P. aeruginosa* visualisée en microscopie confocale

I-3-2-3 Autres domaines subissant l'impact des biofilms

L'impact des biofilms en industrie s'avère non négligeable. Dans l'industrie agro-alimentaire, ils favorisent le périssement des denrées alimentaires et entraînent des risques sanitaires pour les consommateurs (76, 77). Ils vont aussi être à l'origine de la dégradation des infrastructures (63).

Un autre secteur où les biofilms représentent un danger potentiel est celui de l'exploration spatiale. En effet, les micro-organismes peuvent se développer dans les canalisations et systèmes de ventilation ou d'apport d'eau. Vivant en circuit fermé, les spationautes se retrouvent particulièrement exposés aux risques d'infection (79).

I-4 Stratégies de lutte contre les biofilms

Au regard des problèmes posés par les biofilms, différentes stratégies de lutte ont été envisagées et expérimentées dans les différents domaines concernés. Quel que soit le domaine, les stratégies adoptées visent 2 buts : d'une part prévenir l'adhésion des microorganismes et/ou éliminer ceux-ci, et ce, d'autre part, tout en prenant en compte la contrainte de limiter voire annihiler les effets adverses sur l'environnement et l'homme.

I-4-1 Stratégies de lutte antifouling en milieu aquatique

I-4-1-1 Historique des systèmes antifouling

Le biofouling est un phénomène dont les inconvénients sont inhérents à l'activité de navigation. De fait, de tout temps, des solutions plus ou moins efficaces ont été développées (61). L'utilisation de goudron, d'asphalte, de poix, de cire, de gaines de plomb ou de clous de cuivre ont été successivement utilisées par les grecs, les phéniciens, les romains ou encore les vikings. Les revêtements à base de cuivre ont, eux été testés dès le XVII^{ème} siècle, mais les premières véritables peintures antifouling ont fait leur apparition au XIX^{ème} siècle en Angleterre. Elles pouvaient intégrer divers métaux ou composés toxiques. Ces peintures peuvent être constituées de matrices insolubles, (ne s'érodant pas ou n'étant pas polies en cas d'immersion) ou solubles en milieu aquatique.

I-4-1-2 Revêtements à base de biocides

Du fait du large éventail d'espèces sur lesquelles ces composés se montrent actifs, les TBT, dérivés à base d'étain, ont été largement utilisés. Ils le sont soit sous forme d'oxyde (TBTO) soit sous forme de fluorure (TBTF), intégrés dans des revêtements auto-polissants : les TBT-SPC (TBT self polishing coating) (80). Le TBTO est formulé dans des copolymères acryliques (méthacrylate d'éthyle) auquel il est directement greffé par des liaisons esters hydrolysables. Après immersion, la couche externe est hydrolysée et le biocide est libéré. La couche externe, une fois hydrolysée, est remplacée par une nouvelle couche, avec libération continue du biocide. L'efficacité de ces revêtements leur a permis de largement s'imposer dans le domaine de la protection contre les bio-salissures marines.

L'impact environnemental de ces peintures s'est toutefois avéré particulièrement néfaste, et ce, sur quasiment tous les organismes marins : algues, invertébrés, poissons et mammifères (5). Les conséquences tant environnementales qu'économiques furent telles que l'organisation maritime internationale a proposé une limitation de leur utilisation dès 2003 conduisant à une interdiction définitive en 2008.

D'autres composés ont ensuite été également développés avec pour objectifs de déployer leur activité en ayant un impact moindre sur l'environnement. Ce sont la pyrithione de zinc ou de cuivre, l'irgarol 1051, le diuron, le Sea Nine 211TM et le Zineb. Mais aucun ne s'est avéré présenter aucun effet néfaste sur l'environnement (5,81).

I-4-1-3 Autres méthodes de lutte

Différentes stratégies ont pu être adoptées comme techniques antifouling .

- Les Fouling Release Coatings (FRC) : revêtements hydrophobes dont les performances antifouling reposent sur la minimisation de l'énergie de surface, avec des propriétés ultra-lissantes. Leurs propriétés se manifestent en conditions dynamiques.
- Méthodes biologiques : par l'utilisation d'enzymes notamment
- Méthodes physiques : nettoyage mécanique, utilisation de surfaces microtopographiques empêchant l'adhésion

I-4-2 Stratégies de lutte en milieu biomédical

Les problèmes posés par les infections à biofilm poussent à mettre en place des stratégies thérapeutiques spécifiques, tant en traitement curatif qu'en prévention. Elles viennent compléter les méthodes classiques d'antiseptie. Toutefois de nombreuses limites ont pu être rencontrées dans la pratique. La meilleure connaissance des mécanismes de formation et de survie du biofilm permet cependant d'envisager des stratégies plus efficaces (1, 67, 81).

Les infections à biofilm posent des problèmes thérapeutiques importants. Peu d'antibiotiques conservent leur efficacité face aux microorganismes en biofilm, même lorsque les résultats de l'antibiogramme sont favorables. En effet, celui-ci étant réalisé sur des bactéries en mode planctonique, les résultats sont difficilement transposables au mode de vie sessile. La rifampicine et les fluoroquinolones conserveraient toutefois une relative efficacité, grâce à une bonne pénétration à l'intérieur du biofilm (83). Le linézolide, la daptomycine et la tigécycline pourraient également être envisagés notamment dans les infections ostéo-articulaires (83, 84). Les polymyxines, notamment la colistine, pourraient également être toujours actives. Dans tous les cas, il s'avère généralement nécessaire face à une infection à biofilm, d'augmenter les doses, d'allonger la durée de traitement antibiotique et de recourir à combinaisons thérapeutiques. Cependant, ces stratégies s'avèrent dans la pratique d'une efficacité limitée. (1, 75, 83, 85). Le recours à une intervention locale, chirurgicale (exérèse chirurgicale, traitement chirurgical de la plaie, etc.), s'avère souvent nécessaire lorsque cela est possible (1, 71, 83, 84).

Dans le cas d'infections sur matériel, l'ablation est généralement la solution la plus adaptée (87). Une autre stratégie, lorsque l'ablation n'est pas nécessaire ou indispensable, consiste au verrou d'antibiotiques. Il s'agit de l'administration d'antibiotique à très forte dose, avec ou sans anticoagulant dans la lumière du cathéter (87,88). Cette stratégie des verrous peut

également être envisagée à titre préventif, toujours en recourant à des antibiotiques ou en utilisant des solutions anti-microbienne ou anti-adhésion sans activité antibiotique, telles que l'éthanol, l'EDTA tétrasodique, le citrate ou encore la taurolidine (89).

Une connaissance plus poussée des mécanismes de l'adhésion bactérienne et de régulation des biofilms permet toutefois aujourd'hui d'envisager des stratégies plus efficaces de prévention ou de traitement des infections à biofilm. Ainsi, différentes stratégies sont envisageables :

Tableau 1 : stratégies anti-biofilm en milieu biomédical (82)

STRATEGIE	ACTIVITE ANTI-BIOFILM	APPLICATION	REF
Surfaces antimicrobiennes	Prévention de l'attachement cellulaire sur surfaces artificielles	Matériel médical (cathéters, pacemakers, implants, etc.)	(90)
DNases, protéases, glycosidases	Dispersion du biofilm par destruction de la matrice extracellulaire, en combinaison avec des anti-infectieux	Biofilms cutanés, plaies chroniques, infections pulmonaires dans la mucoviscidose	(91)
Application de peptides antimicrobiens	Dispersion de biofilms établis et prévention de la formation de biofilm sur surfaces artificielles	Surfaces artificielles telles que cathéters urinaires	(91,92)
Thérapie photodynamique	Ciblage des composés photo-réactifs pour créer des radicaux libres	Biofilms cutanés, plaies infectées	(93)
Plasmas froids	Peroxydes et autres radicaux libres vont cibler lipides, protéines et autres macromolécules	Plaies chroniques	(94)
Thérapie à ultrasons	Dispersion de biofilms par action physique, en combinaison avec des anti-infectieux	Plaies infectées, infections ostéo-articulaires	(95,96)
Acide acétique	Activité anti-infectieuses	Plaies, infections sur prothèses, otites moyennes chroniques	(97)
Oxyde d'azote (NO)	Induit une dispersion du biofilm	Par inhalation, pour le traitement des infections pulmonaires à <i>P. aeruginosa</i> dans la mucoviscidose	(35,98)
Acide hypochloreux	Molécule produite par les peroxydases des cellules immunitaires	Plaies infectées	(99)

En résumé, l'une des stratégies majeures, quel que soit le domaine apparaît être le recours à des molécules à activités anti-biofilm (100). Celles-ci peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. Parmi les produits naturels, les substances naturelles marines peuvent constituer une source de choix de composés à activité antibiofilm.

II- Les hémibastadines, produits naturels marins anti-biofilm

Les hémibastadines sont des composés d'origine naturelle marine. Ils appartiennent à la grande famille des bromotyrosines, des alcaloïdes extraits de divers organismes marins.

II-1 Les produits naturels marins à activité anti-biofilm

Le milieu marin est une source importante de substances d'intérêt. Le développement des méthodes d'exploration a permis d'intensifier la recherche dans ce milieu. Les mers et océans recouvrent 70% de la surface terrestre mais restent relativement peu explorées, du fait de difficultés d'accès à certaines zones (grand large, fosses marines, etc). Pourtant, les écosystèmes marins contiendraient plus de 80% de toutes les espèces animales et végétales de la planète (101). Mais malgré les difficultés, l'exploration se développe. Ainsi, en 2017, ce sont 1490 nouveaux composés qui ont été décrits, contre 1277 en 2016 (102,103). Les sources de produits naturels marins (PNM) sont variées. Aussi bien des fungi, bactéries, cyanobactéries, microalgue, macroalgues, éponges, coraux, étoiles de mer ou poissons en sont pourvoyeurs et ce, dans toutes les zones : littoral, mangrove, récifs coraliens, fosses marines.

Ces molécules assurent des fonctions métaboliques variées au sein de ces organismes (défense chimique, communication) et leur permettent ainsi de survivre dans cet environnement complexe (101,104). Elles sont également d'une grande diversité chimique. Elles peuvent ainsi être exploitées pour leurs propriétés biologiques et biopharmaceutiques :

- Cytotoxiques et anticancéreuses (105–108)
- Antidiabétique (109,110)
- Antivirales (110, 111)
- Antiparasitaires (113)
- Antifongiques (114)
- Antibactériennes (115)
- Antifouling (7, 115, 116)

Le biofouling étant un phénomène naturel du milieu aquatique, de nombreux organismes marins ont été dotés par l'évolution de mécanismes protecteurs. L'un des principaux

est la biosynthèse de molécules appartenant à des familles chimiques diverses et variées, dont les alcaloïdes (7, 116). Nous nous intéresserons à une famille particulière, les bromotyrosines, plus spécifiquement aux hémibastadines.

II-2 Les bromotyrosines

Les bromotyrosines sont des métabolites secondaires extraits de divers organismes marins. Ces molécules possèdent une grande variété de structures et présentent de nombreuses propriétés biologiques, d'où l'intérêt qu'ils suscitent dans le domaine de la recherche de produits naturels marins bioactifs. Ces composés sont classés en plusieurs catégories, en fonction de l'enchaînement des unités bromotyrosines entre elles et des structures chimiques auxquelles elles sont liées : dérivés simples bromotyrosine, les spirocyclohexadienylisoxazolines, les spirooxepinisoxazolines, les oximes, les bastadines et diverses autres structures aux fonctions chimiques variées (9).

II-2-1 Structures chimiques

II-2-1-1 Dérivé simples de bromotyrosines

Les dérivés simples contiennent une seule sous-unité bromotyrosine ou bromotyramine.

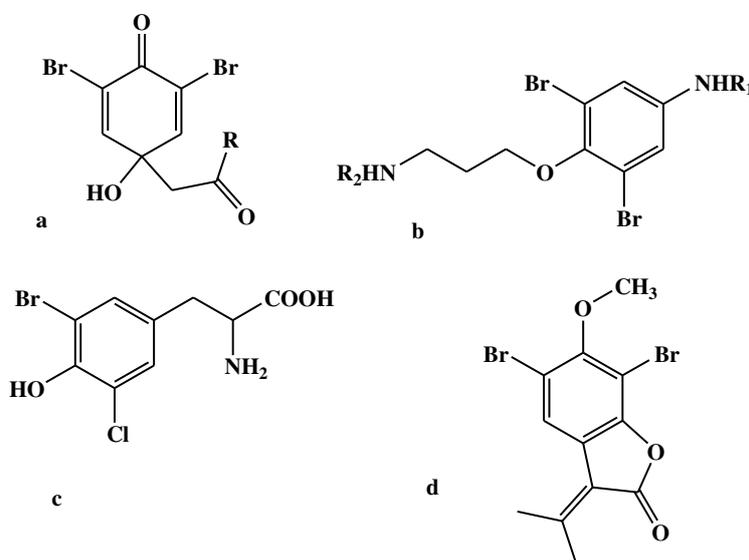


Figure 5: exemples de dérivés simples bromotyrosines : a) 2,6-dibromo-4-acétamide-4-hydroxycyclohexadiénone (118); b) structure générale des moloka'iamines (119) ; c) 3'-Chloro-5'-bromotyrosine (120) ; d) aplysinolide (121)

II-2-1-2 Les oximes

Elles résultent d'une oxydation de la fonction amine et se distinguent en oxime-histamine, oxime-disulfures et oxime tyramines selon la fonction ou le groupement auquel la fonction oxime est liée.

- Oxime-histamines

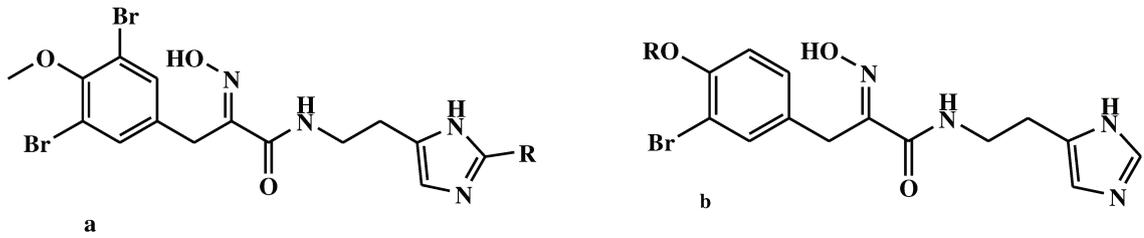


Figure 6: exemples d'oximes-histamines : a) ianthellines (122) ; b) verongamines (123)

- Oxime-disulfures

Il s'agit de composés généralement binaires, dont les 2 sous-unités, généralement identiques, sont reliées par un pont disulfure

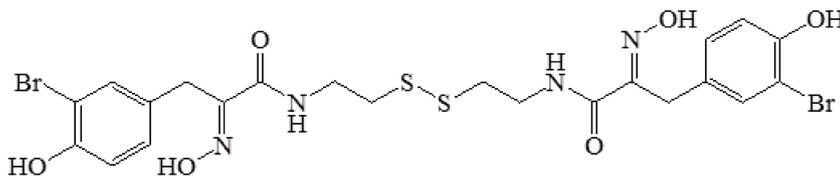


Figure 7: exemple d'oxime-disulfure: la (E,E)-psammaline A (124)

- Oxime-bromotyramine : leur structure est proche de celle des hémibastadines

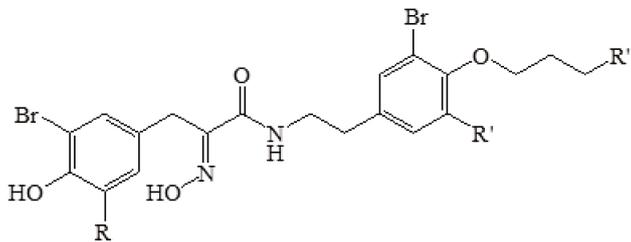


Figure 8: structure des aplysamines

II-2-1-3 Les bastadines

Elles se distinguent en bastadines vraies et en hémibastadine. Les bastadines sont constituées de quatre sous-unités bromotyrosines assemblées par des liaisons amides et éthers d'aryles. Les hémibastadines sont des composés caractérisés par une structure constituée de dimères de bromotyrosines reliées par une fonction amide et avec une fonction oxime.

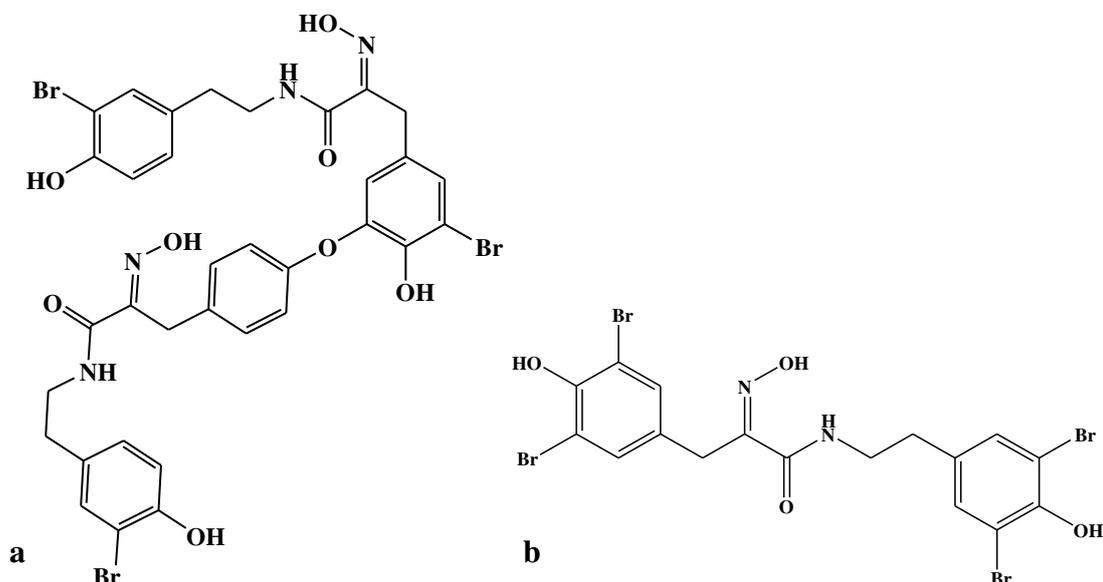


Figure 9: a) bastadine 1 (125) b) dibromohémibastadine 1

II-2-1-4 Les spirocyclohexadienylisoxazolines

Dans les dérivés spirocyclohexadienylisoxazoline de bromotyrosines, une ou deux unités bromotyrosines sont transformées en une spirocyclohexadienylisoxazoline via une oxydation biosynthétique du noyau aromatique. Cette classe d'alcaloïdes est généralement constituée d'une à trois unités de dérivés bromotyrosines ainsi que d'autres groupes fonctionnels, tels que l'histamine ou la bromotyramine.

II-2-1-5 Autres structures

Il s'agit de composés ne contenant pas de relations structurelles entre eux, ou avec les autres classes.

II-2-2 Activités biologiques

Les bromotyrosines présentent une grande diversité d'activités biologiques. Elles possèdent ainsi un large éventail d'activités anti-infectieuses : antibactériennes (126), antivirales (127), antifongiques(114), antiparasitaires (128). Certaines d'entre elles possèdent également des activités anticancéreuses (104, 106, 128).

Mais elles sont particulièrement intéressantes pour leurs activités antifouling. En effet, nombre de ces molécules possèdent cette propriété.

On peut citer comme exemple l'aerophysine-1, extraite d'éponges du genre *Verongida*, qui est ainsi capable d'inhiber l'adhésion de nombreux organismes, aussi bien des bactéries que des microalgues et des mollusques (130).

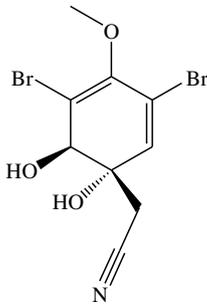


Figure 10: l'aerophysine-1

La moloka'iamine, les psammaplysines A et E, extraites de l'éponge *Pseudoceratina purpurea*, ainsi que les cératinamides A et B, des bastadines extraites de la même éponge inhibent l'adhésion de larves de balanes avec des CE_{50} variant de 0,1 à 4,3 $\mu\text{g/mL}$ (124, 130). C'est également le cas de la 5-bromovérongamine, également extraite d'une *Pseudoceratina* sp, capable d'inhiber l'adhésion de larves de barnacles avec une CE_{50} de 1,03 mg/ml sans effet toxique (123).

Afin d'obtenir des molécules facilement accessibles par synthèse en recourant à des réactifs peu polluants, le remplacement de l'oxime par un noyau 1,2,3-triazole s'est avéré être une voie intéressante (10). En effet, ce noyau présente de nombreux avantages, tant au niveau de sa facilité de synthèse que de ses propriétés biologiques et pharmacochimiques.

III- Le noyau 1,2,3-triazole

III-1 Introduction

La synthèse d'analogues de motifs moléculaires biologiquement actifs est une voie de recherche souvent explorée. Elle vise plusieurs objectifs : contourner les mécanismes de résistance microbiologiques, diminuer la toxicité et/ou améliorer l'activité, optimiser les performances pharmacocinétiques. Elle permet également d'optimiser les voies d'obtention, soit par des synthèses moins dispendieuses en moyens et/ou réactifs, soit pour simplement éviter d'épuiser les ressources naturelles dans le cas de substances extraites d'organismes rares voire menacés ou difficiles d'accès. La substitution bioisostérique permet d'atteindre ces objectifs. Et le noyau 1,2,3-triazole permet ainsi la substitution de nombreuses fonctions chimiques actives (132). Facilement accessible par réaction de chimie click, ce motif se retrouve ainsi dans de nombreuses molécules de synthèse présentant une activité biologique.

III-2- Noyau 1,2,3-triazole en tant que bioisostère d'autres fonctions chimiques

Les caractéristiques du noyau 1,2,3-triazole (polarité, rigidité, capacité à réaliser des liaisons hydrogènes aussi bien en tant que donneur ou accepteur) lui permettent de mimer différents groupes fonctionnels, avec en plus la stabilité à l'hydrolyse, l'oxydation ou la réduction (132). Si sa capacité à remplacer la fonction amide a été largement explorée et démontrée, ce noyau se montre capable également de remplacer d'autres fonctions, telles que les noyaux hétérocycliques, les fonctions ester ou acide carboxylique.

Malgré quelques différences, le noyau 1,2,3-triazole est assez proche d'une fonction amide, comme le montre la figure 11. Les 1,2,3-triazole-1,4-disubstitués vont assez bien mimer les Z-trans-amide isostère (Fig. 11a), tandis que les dérivés 1,5-disubstitués peuvent être considérés comme isostères de la fonction E-cis-amide (132).

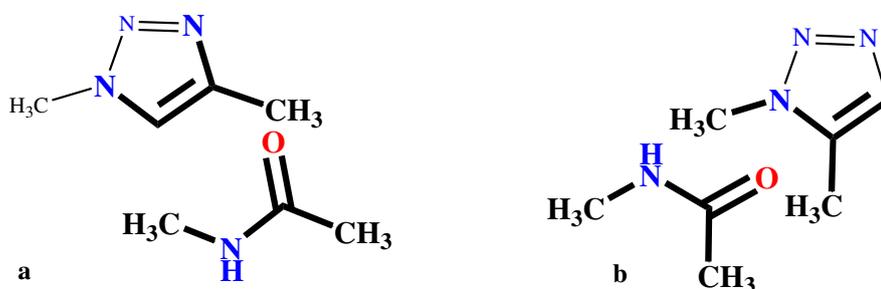


Figure 11: comparaison entre (a) le noyau 1,2,3-triazole-1,4-disubstitués et la fonction Z-trans-amide d'une part et (b) le noyau 1,2,3-triazole-1,5-disubstitués et la fonction E-cis-amide d'autre part

En dehors de la fonction amide, les caractéristiques du noyau 1,2,3-triazole sont utiles pour mimer d'autres fonctions. Ainsi, dans le cas de la fonction ester, son remplacement par un noyau triazole permet de conserver l'activité tout en assurant une meilleure stabilité en milieu biologique, la fonction ester étant facilement hydrolysée sous l'action des estérases. Cette résistance à l'hydrolyse est également recherchée lors du remplacement des alcènes par un noyau triazole plus rigide. Sa structure lui permet également de mimer les noyaux hétérocycliques, notamment les hétérocycles pentagonaux.

III-3 Accès au noyau 1,2,3-triazole

Ce noyau est facilement accessible par réaction de chimie click, notamment les réactions de cyclo-addition 1,3 dipolaire entre un alcyne et un azide (Fig. 12). Celles-ci ont été initialement étudiées par Huisgens, puis optimisées par Sharpless et Meldal dans le but d'obtenir une meilleure régiosélectivité, afin d'accéder à des composés 1,4 ou 1,5 disubstitués. (133–137)

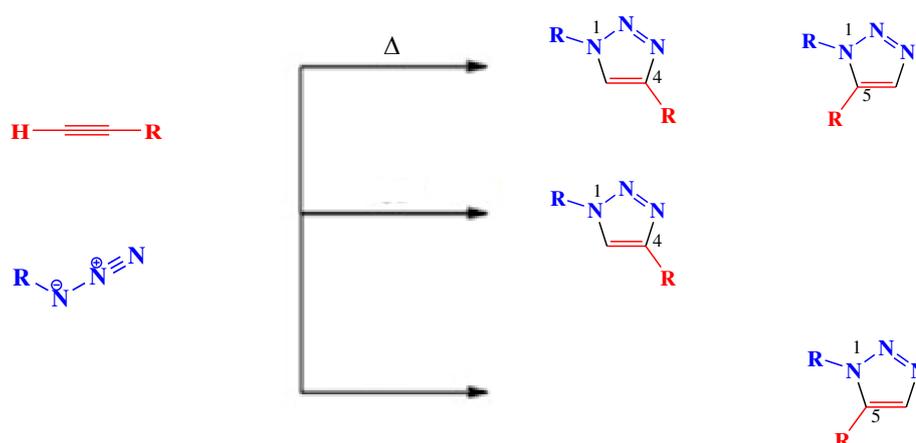


Figure 12: régiosélectivité de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne et un azide en fonction des conditions réactionnelles (133)

L'obtention des régioisomères 1,4-disubstitués se fait par l'intermédiaire de réaction catalysées par le cuivre (Cu-AAC), tandis que les réactions catalysées au ruthénium permettent d'obtenir des régioisomères 1,5 (Ru-AAC).

III-3-1 Obtention de dérivés 1,4-disubstitués

Il s'agit des réactions les plus étudiées et les plus utilisées (134).

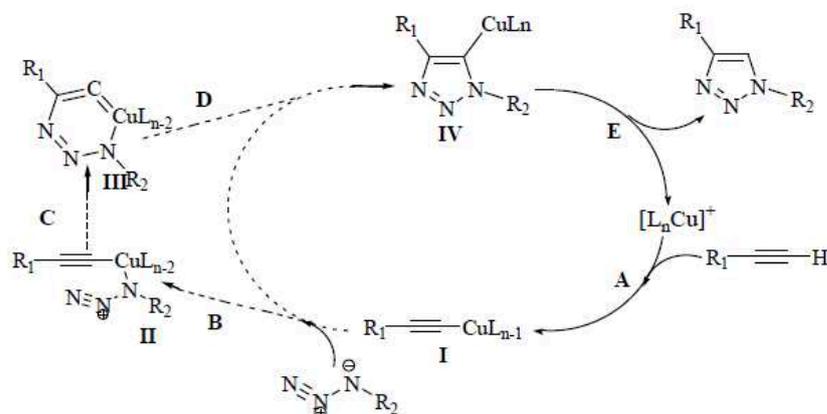


Figure 13: mécanisme de catalyse de la CuAAC (138)

Cette réaction est catalysée par des sels de cuivre II tel que le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄, 5H₂O), avec comme réducteur, de l'acide ascorbique ou de l'ascorbate. Ces réactifs permettent d'obtenir, en 6 à 36 heures et à température ambiante, une grande variété de 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués avec un haut rendement. Associés aux faibles coûts des réactifs, ces caractéristiques font de ce type de réactions une méthode de choix pour la synthèse de tels composés. D'autant qu'elles ont un autre avantage, celui de pouvoir être réalisées dans une grande variété de solvants, notamment de l'eau associée à un alcool ou à un autre solvant.

Le mécanisme (Fig. 13) débute par la formation d'un complexe π entre l'alcyne et le Cu^I (obtenu par réduction du Cu^{II} en Cu^I sous l'action de l'ascorbate). Ce complexe se réarrange en un cycle à 6 sommets qui évolue vers le cycle pentagonal. La protonation de ce dernier entraîne la libération du dérivé 1,4 et la régénération du cuivre. Ce mécanisme explique la régiosélectivité de cette réaction.

Des mécanismes utilisant comme catalyseur des sels d'argent ont également été décrites (139).

III-3-2 Obtention de dérivés 1,5 et 1,4,5 substitués

Le mécanisme le mieux connu est celui catalysé par le ruthénium, permettant d'obtenir des dérivés 1,5-disubstitués(136). Elle est toutefois limitée dans certaines conditions, conduisant soit au recours à des réactions utilisant des micro-ondes ou au remplacement du ruthénium par d'autres composés tel qu'un organomagnésien (Fig. 14), préparé de façon extemporanée (140).

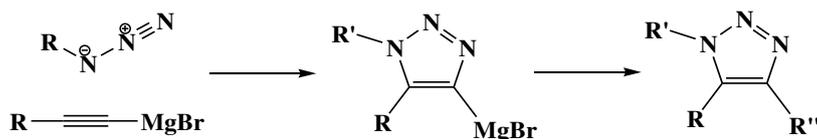


Figure 14: schéma de la synthèse de 1,2,3-triazoles 1,4,5-trisubstitués par l'intermédiaire d'un organomagnésien (140)

Diverses autres réactions avec comme catalyseurs, le zinc, l'iridium ou le samarium ont également été proposées (141–143).

III-3-3 Méthodes sans catalyseur métallique

Des méthodes utilisant des catalyseurs autres que les métaux existent et ont été découvertes, permettant d'accéder, en fonction des conditions à des composés substitués en 1,4, 1,5 ou 1,4,5. Des benzotriazoles peuvent ainsi être obtenus grâce à une méthode recourant à des catalyseurs organiques (de type pyrrolidine) suivie d'une aromatisation oxydative par du 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (144).

Le noyau 1,2,3-triazole peut également être obtenu sans formation préalable d'un azide, en faisant réagir des N-tosylhydrazones (NNHT) avec des anilines en présence d'iode et de peroxybenzoate de tertiobutyle (TBPB) dans du 1,4-dioxane (145).

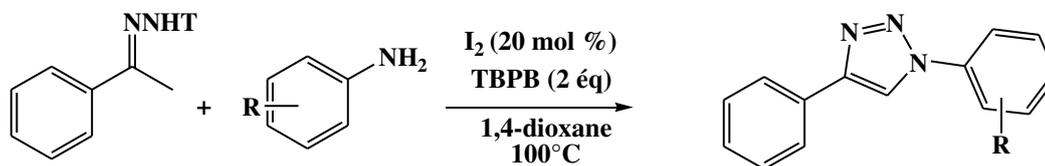


Figure 15: schéma général de la synthèse de composés à noyau 1,2,3-triazoles-1,4,-disubstitués par réaction de N-tosylhydrazones avec des anilines en présence d'iode et de TBPB (145)

Une réaction en tandem « one-pot » mêlant réaction de Knoevenagel et cycloaddition azide-alcyne entre un indole, un pyrazole ou un aryl avec une fonction aldéhyde et un phényl azide en présence d'acétate de pipéridinium dans du méthanol permet d'obtenir un composé polycyclique à noyau 1,2,3-triazole (146).

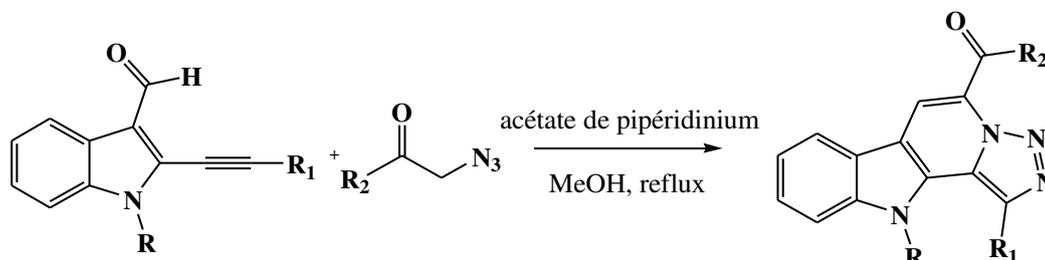


Figure 16: schéma de synthèse de 1,2,3-triazole par réaction one pot couplée Knoevenagel-cycloaddition azide-alcyne et indole aldéhyde (146)

Des dérivés 1,4-triazoles peuvent également être obtenus en faisant réagir des composés de type alkyldène malonitrile et des aryl azides en conditions basiques (147).

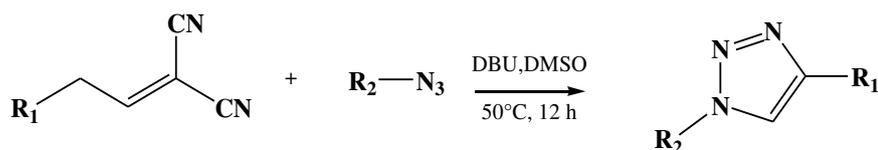


Figure 17: réaction entre un aryle-azide et un alkyldène malonitrile (147)

Des dérivés 1,5-disubstitués peuvent également être obtenus par différentes voies : réaction entre une aryl ou une alkylvinylsulfone et un aryl ou un alkyl azide en milieu aqueux à reflux.

III-4 Activités de molécules à noyau 1,2,3-triazole

Le noyau 1,2,3-triazole est présent dans quelques composés commercialisés, tels que la cefatrizine (antibiotique de la classe des céphalosporines) et le tazobactam (inhibiteur de bêtalactamase).

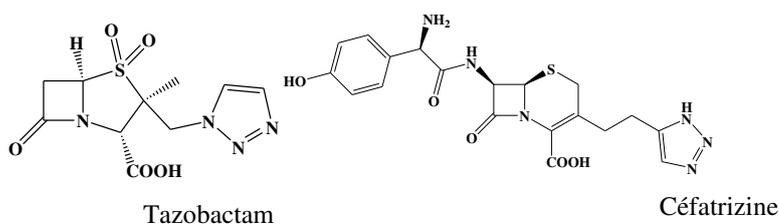


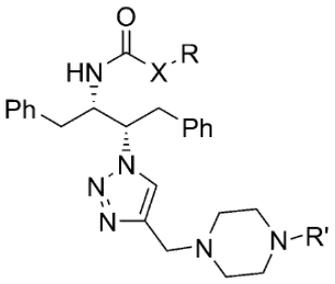
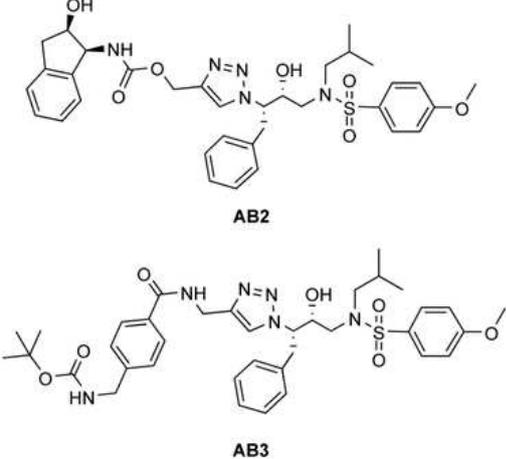
Figure 18: exemples de médicaments commercialisés à noyau 1,2,3-triazole: le tazobactam et la cefatrizine

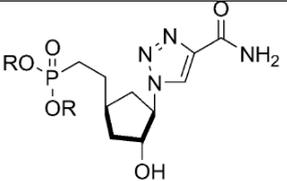
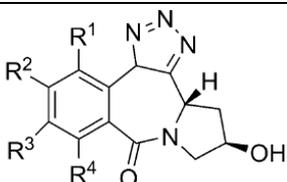
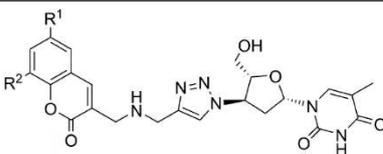
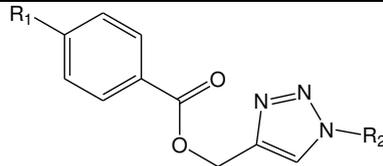
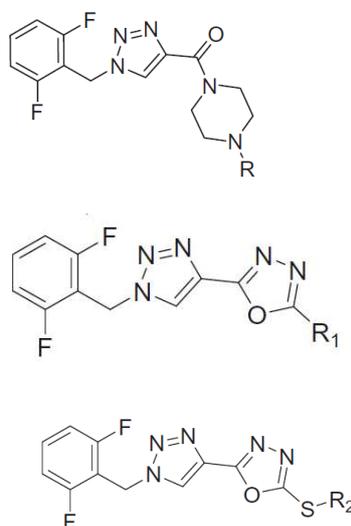
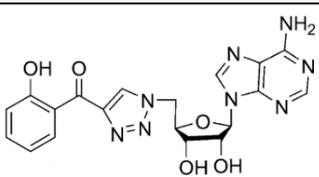
Du fait de sa capacité à remplacer de nombreuses fonctions chimiques et de sa facilité d'accès, le noyau 1,2,3-triazole a été intégré à de nombreuses structures permettant d'avoir une grande diversité d'action : propriétés anticancéreuses, anti-inflammatoire, inhibition de la monoamine oxydase, activité anti-hypertensive, action sur la maladie d'Alzheimer et surtout, anti-infectieuse (131, 147)

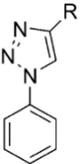
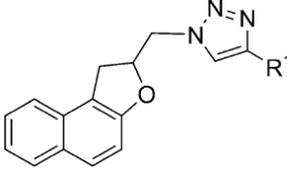
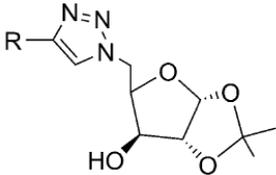
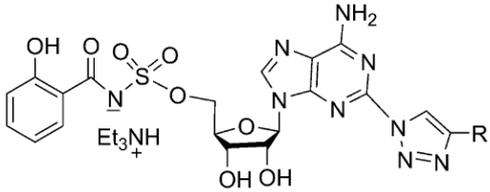
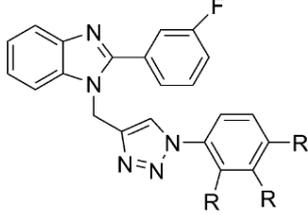
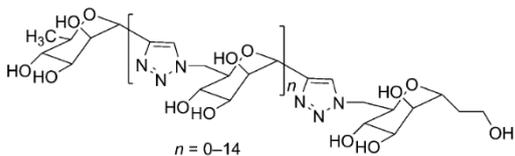
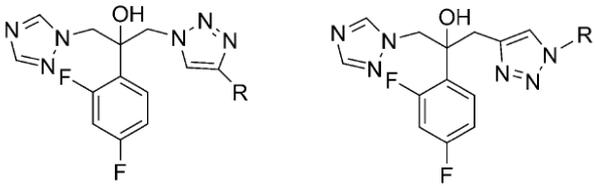
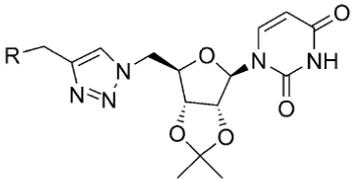
III-4-1 Molécules à activité anti-infectieuse

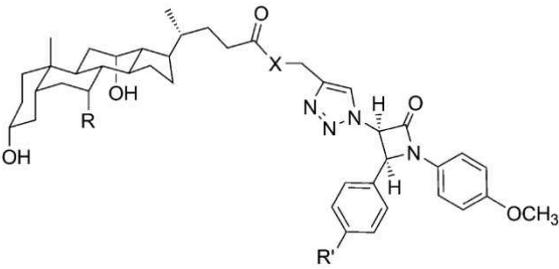
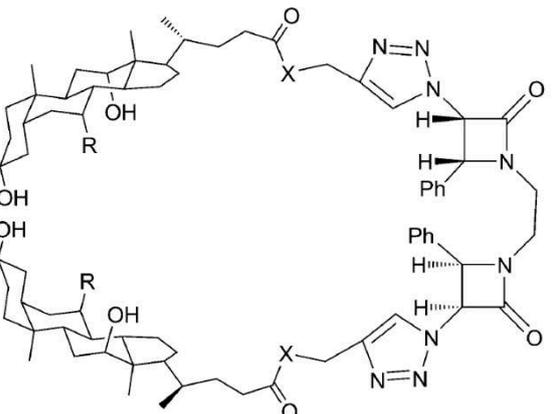
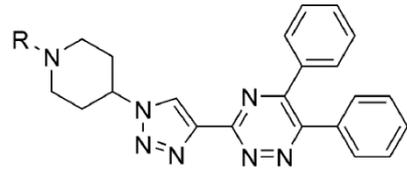
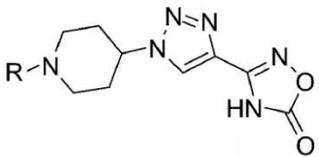
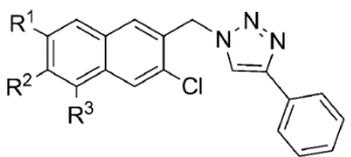
De nombreux composés possédant ce noyau ont été développés à cette fin. Il s'agit autant d'analogues de molécules à activité déjà connues voire commercialisées (antibiotiques, antimycosiques, antiviraux) que de molécules issues de recherche plus ou moins avancées pouvant être actives sur plusieurs types de microorganismes. Le tableau 2 présente quelques un de ces composés et les microorganismes sur lesquels ils se sont montrés actifs.

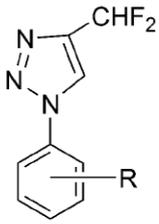
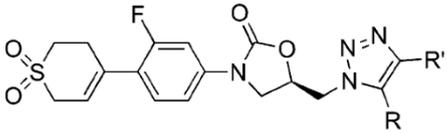
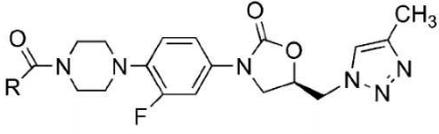
Tableau 2: exemples de molécules à activités anti-infectieuses possédant le noyau 1,2,3-triazole

Composé	Microorganismes cibles	Réf
 <p>X = O, NH, CH, CH₂, etc R = Alk, c-alkyl, Ar, het-Ar R' = c-alkyl, het-Ar, aly, etc.</p>	VIH-1 (protéase)	(149)
 <p>AB2</p> <p>AB3</p>	VIH-1	(150,151)

	<p>VIH-1 (protéase) Virus de l'hépatite C</p>	<p>(152)</p>
	<p>VIH-1 (protéase)</p>	<p>(153)</p>
	<p>VIH-1 (transcriptase inverse)</p>	<p>(154)</p>
	<p><i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Candida albicans</i></p>	<p>(155)</p>
	<p><i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>S. pyogenes</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>S. aureus</i>, <i>C. albicans</i>, <i>T. viride</i>, <i>A. flavus</i>, <i>A. brasiliensis</i></p>	<p>(156)</p>
	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(157)</p>

	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(158)</p>
	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(159)</p>
	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(160)</p>
	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(161)</p>
	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(162)</p>
 <p style="text-align: center;">$n = 0-14$</p>	<p><i>M. tuberculosis</i></p>	<p>(163)</p>
 <p>R= H, acide biliaire, chaîne alkyle à longue chaîne</p>	<p><i>C. albicans</i></p>	<p>(164)</p>
 <p>R = COOMe, Ar</p>	<p><i>C. albicans</i>, <i>Cryptococcus neoformans</i></p>	<p>(165)</p>

 <p>X= O/NH ; R = H/OH, R' = H/Cl</p>	<p><i>C. albicans</i>, <i>C. neoformans</i>, <i>Benjamniella poitrasii</i>, <i>Yarrowia lipolytica</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>E. coli</i>, <i>S.aureus</i></p>	<p>(166)</p>
 <p>X= O/NH ; R = H/OH, R' = H/Cl</p>	<p><i>C. albicans</i>, <i>C. neoformans</i>, <i>Benjamniella poitrasii</i>, <i>Yarrowia lipolytica</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>E. coli</i>, <i>S.aureus</i></p>	<p>(166)</p>
 <p>R = H, Me, Et, Pr, Boc, Bn, etc</p>	<p><i>C. albicans</i>, <i>A. niger</i>, <i>C. neoformans</i>, <i>F. oxysporum</i>,</p>	<p>(167)</p>
 <p>R = Me, Et, COMe, COEt, COPh, etc</p>	<p><i>C. albicans</i>, <i>A. niger</i>, <i>C. neoformans</i>, <i>F. oxysporum</i>,</p>	<p>(168)</p>
	<p><i>B. subtilis</i>, <i>E. coli</i>, <i>C. albicans</i>, <i>A. niger</i></p>	<p>(169)</p>

	<p><i>Leishmania amazonensis</i></p>	<p>(170)</p>
	<p><i>S. pneumoniae</i></p>	<p>(171)</p>
	<p><i>S. aureus</i> sensible à la méthicilline (SASM), <i>S. aureus</i> méthicillino-résistant (SARM), Entérocoques sensibles et résistants à la vancomycine, Staphylocoques à coagulase négative (SCN) sensibles et résistants à la méthicilline, <i>S. pneumoniae</i></p>	

III-4-2 Cas des molécules à activité anti-biofilm et antifouling

Le noyau 1,2,3-triazole, par ses propriétés, a été intégré dans des molécules possédant une activité antibiofilm. Certaines de ces molécules sont des inhibiteurs de mécanismes spécifiques de régulation de la formation du biofilm, tel que le quorum sensing ou la C-di-GMP. Ainsi, des analogues d’AHL à noyau 1,2,3-triazole ont été synthétisées (172).

Dans ce domaine de recherche, les travaux antérieurs du laboratoire MAPIEM ont permis la synthèse et l’évaluation de composés à activité anti-biofilm à noyau 1,2,3-triazole bio-inspirés de composés naturels d’origine marine à visée antifouling.

Les naamines et isonaamines A, des alcaloïdes à noyau imidazole extraits d’éponges *Leucetta sp.* ont ainsi servi de modèle (173). Le remplacement du noyau imidazole par un noyau 1,2,3-triazole a permis d’évaluer une série de composés 1,5 (analogues de naamines) et 1,4-

disubstitués (analogues d'isonaamines), dont relativement peu étaient actifs à 200 μM . Ceux qui l'étaient présentant des CE_{50} de 37,2 μM et 41,2 μM sur souches tests *Pseudoalteromonas* sp D41 et *Parococcus* 4M6.

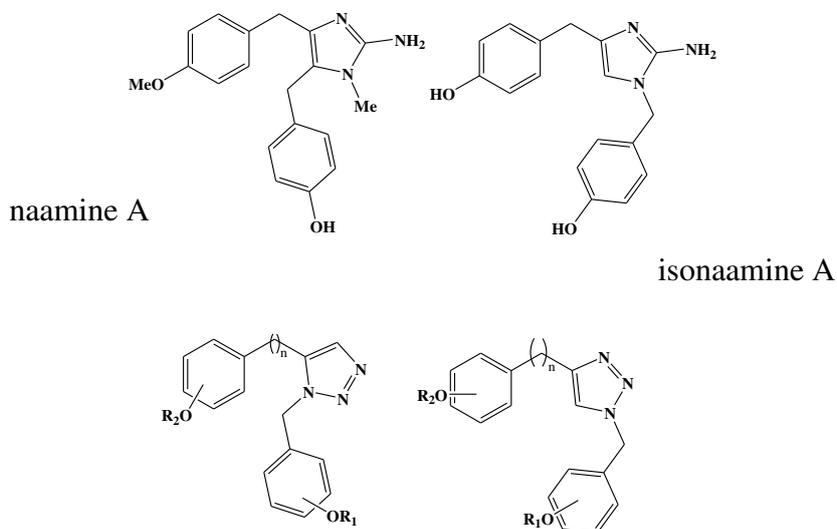


Figure 19: structure générale des naamines et isonaamines et de leurs analogues à noyau 1,2,3-triazole 1,5 et 1,4 disubstitués

Des analogues de terpénoïdes ont également été synthétisés et évalués (174). Les CE_{50} les plus faibles calculées étaient de 74 μM sur souches *Pseudoalteromonas* sp D41.

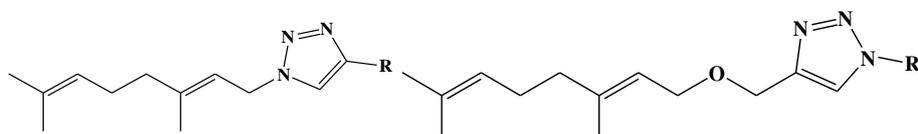


Figure 20: structures générales des terpénoïdes à noyau 1,2,3-triazole à visée anti-biofilm

Toutefois, les composés qui se sont montrés les plus actifs sont les analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazole. Les structures générales des différentes séries préparées sont représentées en figure 21.

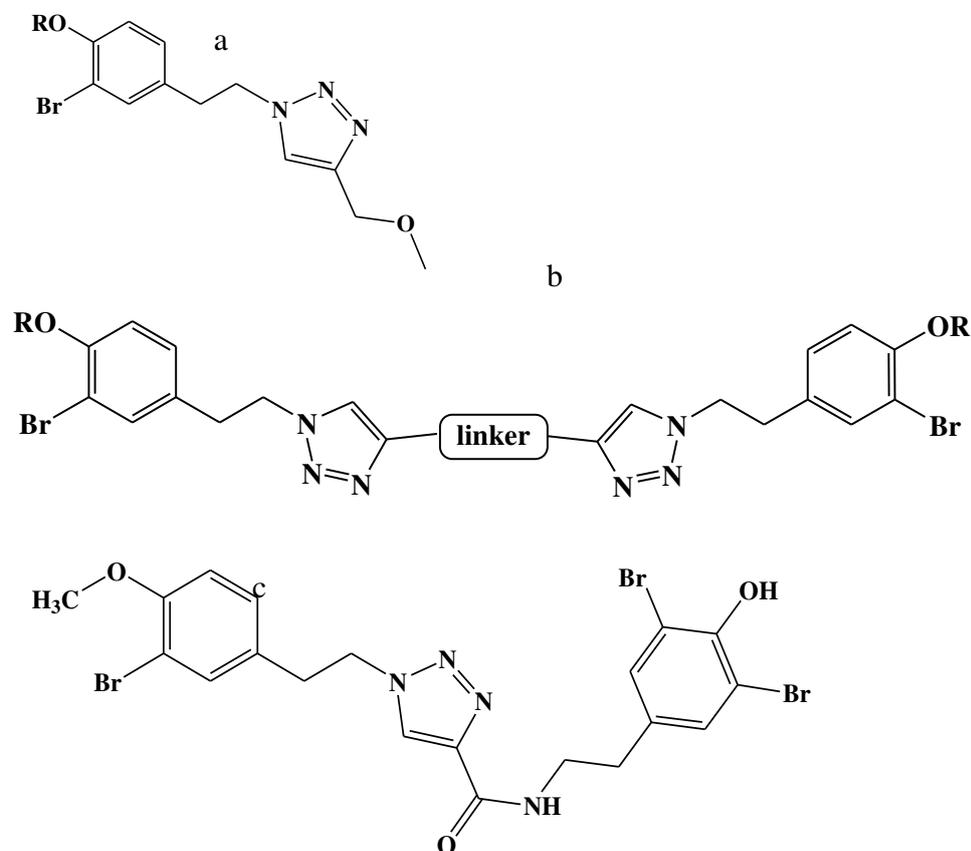


Figure 21: structures générales des principaux analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazoles analogues de a) moloka'iamines b) psammapline A, c) hémibastadine

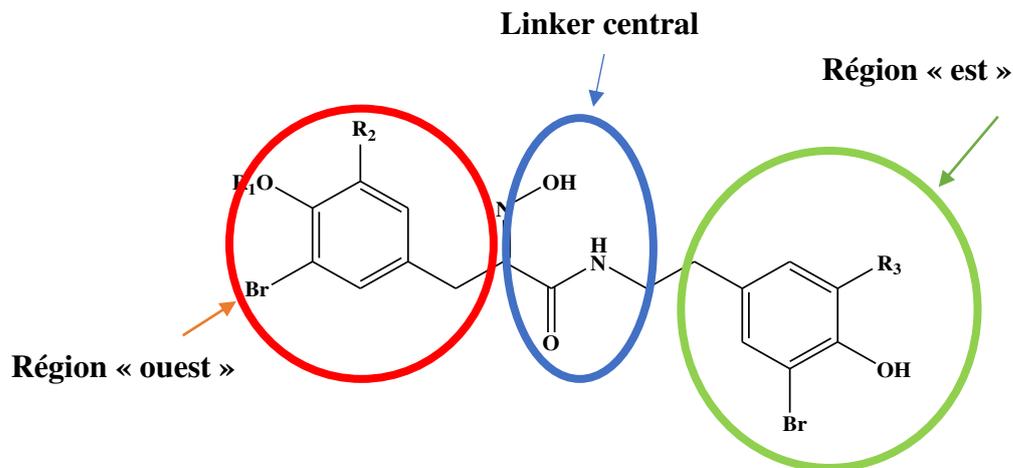
Conclusion

Le biofilm, mode de vie préférentiel de nombreux microorganismes, a un fort impact sur bon nombre d'activités humaines. La meilleure connaissance des mécanismes de sa régulation a permis d'optimiser la recherche pour lutter efficacement contre les conséquences de son développement. L'une des stratégies de lutte consiste à développer des molécules à activité anti-biofilm spécifiques, non toxiques pour l'environnement et sans activité antimicrobienne. Les produits naturels marins s'avèrent être des sources de molécules d'intérêt dans cette perspective. Des travaux ont montré le potentiel des hémibastadines, des bromotyrosines extraites d'éponges de mer. La reproduction de ces motifs par synthèse est une base de recherche intéressante. L'introduction dans leur structure un noyau 1,2,3-triazole, bioisostère de nombreuses fonctions chimiques facile d'accès s'est avérée être une stratégie prometteuse. Approfondir les études de relations structure-activités sur les hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole pourrait donc permettre d'aboutir à des molécules à activité anti-biofilm stricte respectueuses de l'environnement.

Chapitre 2 :
Activités des analogues d'hémibastadine à
noyau 1,2,3-triazole sur organismes marins

Introduction

Les hémibastadines sont des métabolites secondaires retrouvés chez les éponges du genre *Ianthella*. A l'état naturel, leur structure chimique peut se subdiviser en trois parties : une région « est » et une région « ouest », toutes 2 porteuse d'un noyau aromatique, les deux régions étant reliées par un linker central de type oxime (9).



$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$: Hémibastadine 1

$R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Br}$: 1'-méthoxyhémibastadine 1

$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Br}$: Hémibastadine-3

Figure 22: structure générale et principaux représentants naturels d'hémibastadines

Également reproduits par synthèse, ces composés présentent plusieurs propriétés biologiques, notamment des activités antifouling et antibiofilm. Des travaux ont ainsi mis en évidence celles de la dibromohémibastadine.

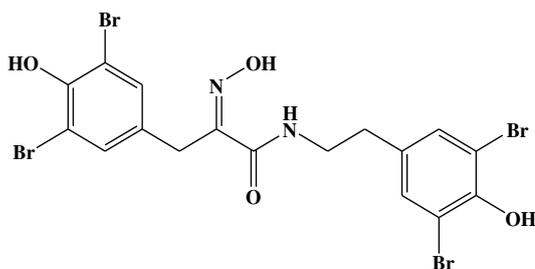


Figure 23: structure de la dibromohémibastadine-1

Cette molécule et ses dérivés ont démontré les activités suivantes :

- Inhibition de la formation de biofilms de bactéries tant terrestres que marines, mais sans action sur leur croissance ou leur viabilité (177). L'effet anti-biofilm était constaté à partir de concentrations de 16 à 32 μM pour *P. aeruginosa* PA01 et de 2 à 8 μM pour des bactéries marines *Paracoccus* sp 4M6 et *Pseudoalteromonas* sp 4M6. Cette molécule a également montré sa capacité à dégrader un biofilm préformé en flux continu.
- Activité anti- QS par interaction avec les acyl-homoserine lactone (AHL) mais sans action sur leur production et leur synthèse (177)
- Inhibition de l'adhésion de microalgues *Cylindrotheca closterium* (AC-170) (*Bacillariophyceae*) à des concentrations de 80 μM (178)
- Inhibition de la phénoloxydase de moules, enzyme indispensable à leur adhésion à 0,81 μM (179,180)
- Capacité à être intégrée dans des revêtements tout en maintenant une activité antifouling (181). Ces revêtements ont montré leur activité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et se sont avérés efficaces pour inhiber l'adhésion aussi bien de microalgues que de bactéries.

Les hémibastadines sont produites naturellement, mais peuvent être également obtenues par synthèse. Reproduire ces molécules par synthèse pourrait permettre d'en obtenir suffisamment pour les besoins des activités humaines sans avoir à épuiser les ressources naturelles. L'avantage pour l'environnement nécessite cependant de recourir à des voies de synthèse possédant un faible impact environnemental aussi bien par les solvants utilisés que les réactifs. Un autre avantage de reproduire les molécules par synthèse est de permettre la réalisation d'études de relations structure-activités. Le but serait dans ce cas-ci d'aboutir à des molécules à activité anti-biofilm exaltée tout en ne possédant pas d'impact environnemental nocif. Dans cette perspective, le remplacement de l'oxime par un autre linker s'est avéré opportun et comme signifié plus haut, le choix s'est porté sur le noyau 1,2,3-triazole, bioisostère de nombreuses fonctions chimiques, notamment la fonction oxime (132) et facilement accessible par réaction de chimie click, avec des solvants peu polluants (133,148). L'étude comparant divers analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazole et se distinguant par la région « est » (vérongamine, pseudocéramines, clavatidines et hémibastadines) a montré que seules les analogues d'hémibastadines montraient une activité inhibitrice de formation de biofilm.

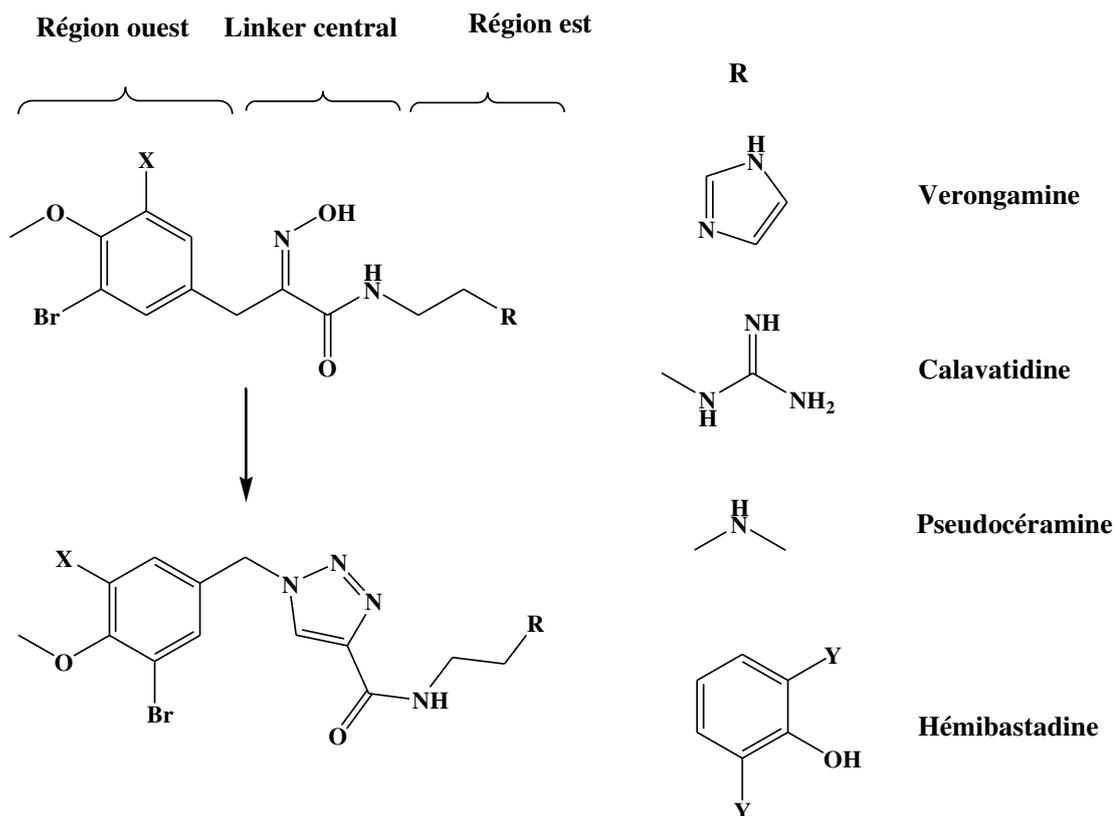


Figure 24: structures d'analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazole

Un premier niveau d'étude de relation structure-activité sur analogues d'hémibastatine à noyau 1,2,3-triazole a permis de montrer que l'hyperbromation de la molécule en région « est », avec en région « ouest », un noyau aromatique porteur d'une fonction méthoxy, d'un seul atome de brome et avec une chaîne carbonée à 2 atomes de carbone permettait d'obtenir l'activité anti-biofilm la plus importante (CE_{50} de 8,8 μ M sur TC14, 67,8 μ M sur TC8 et 40,7 μ M sur 4M6), sans activité antibactérienne (Fig. 25).

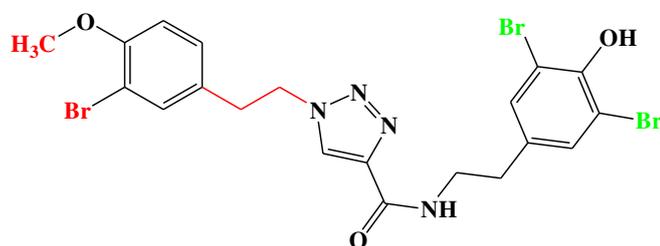


Figure 25 : structure de l'analogue d'hémibastatine à noyau 1,2,3-triazole le plus actif, avec les éléments établis comme favorisant l'activité en région « ouest » (rouge) et en région « est » (vert)

Au vu de ces résultats, et afin d'aboutir à des composés d'intérêt, chefs de file potentiels pour l'obtention de composés à visée antifouling, il est apparu opportun de poursuivre les travaux sur cette série d'analogues de produits naturels marins, notamment en ce qui concerne :

- L'approfondissement des études de relations structures-activités anti-biofilm
- L'évaluation de l'étendue de leurs activités biologiques

Afin d'atteindre ces objectifs, ce chapitre sera subdivisé en différentes parties

- Une première partie qui résume la conception et la synthèse des composés évalués
- La deuxième partie, sous forme d'article, portera sur une première série de composés, résultant de variations de structure relativement simples : la réduction de la longueur de la chaîne carbonée de la région « est », avec une région « ouest » fixe de type 3-bromo-4-méthoxyphényl.
- La troisième partie traitera de l'évaluation de l'impact de variations de structures plus approfondies sur l'activité antibiofilm
- La quatrième partie compilant les données provenant de l'évaluation de l'activité des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole et composés apparentés consistera en une analyse des relations structures-activités dans cette série de composés

I- Conception et synthèse des analogues d'hémibastadine

I-1 Structure générale des composés évalués

Les composés évalués sont des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole dont les noyaux aromatiques sont porteurs en para d'un oxygène soit sous forme phénolique, soit méthoxylé ou porteur d'une chaîne alkylamine. La chaîne carbonée de la région « ouest » a été choisie fixe, avec un seul atome de carbone, seule variant la longueur de celle de la région « est » (0,1,2, atomes de carbone). Le noyau aromatique de la région « ouest » a été systématiquement porteur d'un seul atome de carbone, celui de la région « est » porteur de 2 ou d'aucun atome de carbone.

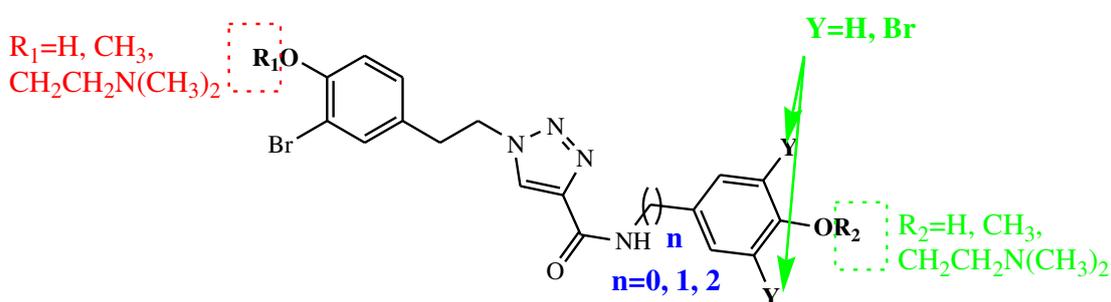


Figure 26: structure générale des composés synthétisés indiquant les points de modulation chimique

I-2 Rétrosynthèse de ces composés

Comme préalablement établi, l'analyse rétrosynthétique de ces composés montre qu'ils peuvent être obtenus par couplage peptidique entre une amine aromatique et un triazole-acide (Fig. 27). Cette dernière est elle-même obtenue par réaction de chimie-click entre un azide et l'acide propiolique (10).

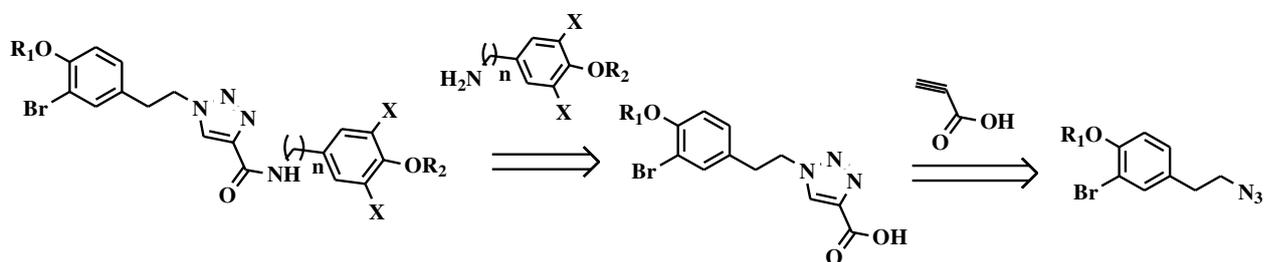


Figure 27: analyse rétrosynthétique des analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole

L'accès à ces composés se fait donc par synthèse en plusieurs étapes, détaillées ci-dessous.

I-3 Synthèse des composés

I-3-1 Synthèse des intermédiaires acide 1,2,3-triazole-4-carboxylique

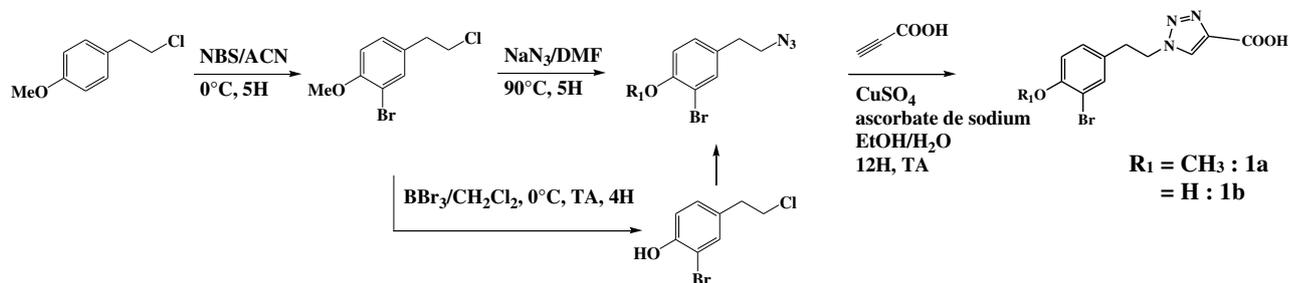


Figure 28: schéma de synthèse des intermédiaires acide 1,2,3-triazole-4-carboxyliques

2 intermédiaires de ce type ont été synthétisés, selon les méthodes préalablement mises au point : l'acide **1a** à noyau aromatique porteur d'un groupement méthoxylé et l'acide **1b** porteur lui d'un hydroxyle phénolique.

Le point de départ de la synthèse est toujours le 1-(2-chloroéthyl)-4-méthoxybenzène qui va subir une réaction de bromation par le N-bromosuccinimide (NBS). A ce stade, pour obtenir l'acide **1b**, le composé subit l'action du tribromure de bore (BBr_3). Le choix de faire la réaction de bromation avant la réaction de déméthylation est fait dans l'optique de pouvoir obtenir un composé monobromé, pour pouvoir répondre aux objectifs d'étude de relation structure-activités ultérieurs.

Dans les deux cas, le composé subit l'action de l'azidure de sodium (NaN_3), avant de subir la réaction de chimie click qui conduit à la formation des acides carboxyliques souhaités.

I-3-2 Préparation des amines bromées

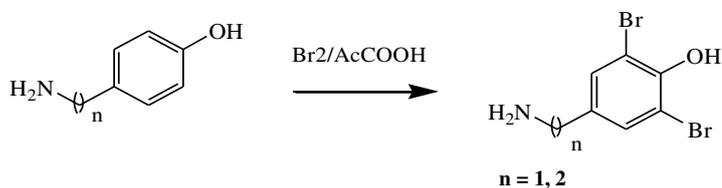


Figure 29: schéma général de la bromation des amines aromatiques

La bromation des amines a été réalisée en soumettant les amines aromatiques à l'action du dibrome. L'option de faire la réaction de bromation avant de réaliser la réaction de couplage peptidique (plutôt qu'après comme réalisé par Andjouh) a été choisie de façon à pouvoir obtenir des composés monobromés en région « ouest ». Ceci permet de compléter les données

permettant de réaliser une étude de relation structure-activité anti-biofilm. Cependant, ce choix contraint à recourir au Br₂ plutôt qu'au NBS. En effet, ce dernier composé, en présence d'amine réagit avec la fonction amine, ce qui empêche la réaction de bromation sur le noyau aromatique.

La réaction a été réalisée avec les amines aromatiques à OH-phénoliques, conduisant à des dérivés dibromés : le 4-(aminométhyl)-2,6-dibromophénol (n=1) et le 4-(aminoéthyl)-2,6-dibromophénol (n=2).

I-3-3 Réaction de couplage peptidique

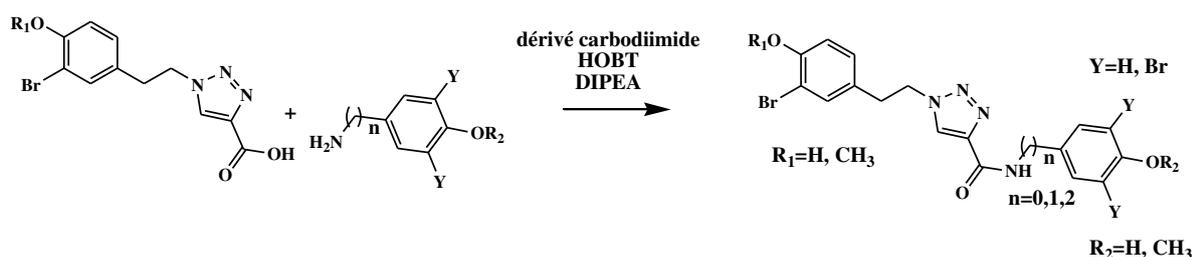


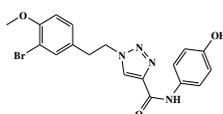
Figure 30: schéma général de la réaction de couplage peptidique

La réaction de couplage peptidique, déjà mise en œuvre par Andjouh pour conduire aux analogues d'hémibastadine, consiste à faire réagir un intermédiaire de type triazole à fonction acide carboxylique avec une amine aromatique, en présence d'un dérivé carbodiimide, de 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) et de diisopropyléthylamine (DIPEA). Trois principaux points d'optimisations ont été évalués : la sélection du dérivé carbodiimide, le choix du solvant, la méthode de purification.

I-3-3-1 Sélection du dérivé carbodiimide

Le carbodiimide permet d'activer la fonction acide carboxylique pour former la liaison amide. Deux dérivés carbodiimides ont été utilisés comme activateurs : le N,N-dicyclohexylcarbodiimide et le 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), conduisant aux résultats consignés dans le tableau 3.

Tableau 3: comparaison des résultats du couplage peptidique avec de l'EDC et du DCC pour l'obtention du composé 2



Carbodiimide	Rdt (%)	Commentaire
DCC	48	Traces d'impureté
EDC	68	Absence d'impureté

Le DCC produit un dérivé de type O-urée insoluble et difficile à éliminer, qui laisse toujours des traces (fig. 31a) contrairement à l'EDC (fig. 31b).

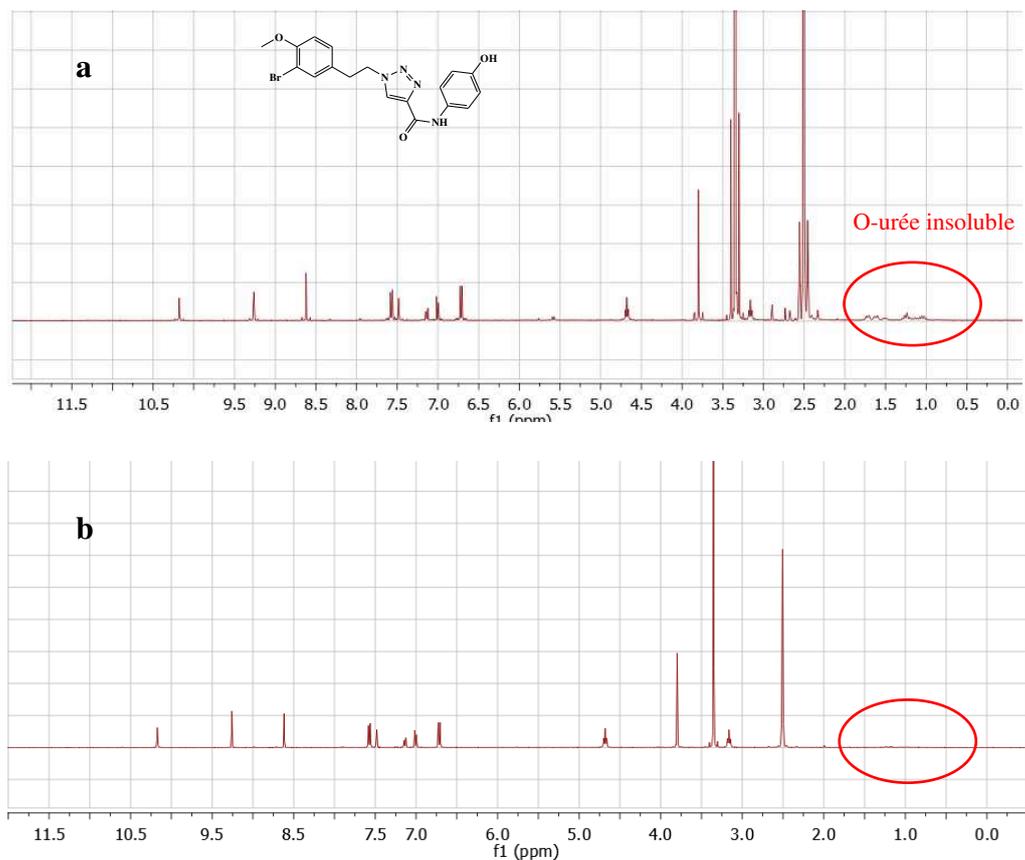


Figure 31: spectres RMN d'un composé **2** après couplage peptidique avec du DCC (a) et de l'EDC (b)

La purification demande plus d'étapes et réduit ainsi le rendement. De plus, la présence de traces de ce composé peut perturber les résultats biologiques. C'est donc finalement l'EDC qui a été utilisé comme agent de couplage pour toutes les réactions.

I-3-3-2 Solvants

Deux mélanges de solvants ont été évalués pour la synthèse : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ et $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$

Le DCM permet de solubiliser le HOBT, certaines des amines, et le DIPEA, mais faiblement l'intermédiaire à fonction acide carboxylique, du fait de la présence du noyau 1,2,3-triazole. Pour ce faire, la présence d'un co-solvant est nécessaire. C'est le rôle du DMF et du MeOH.

Le DMF est celui qui a été principalement utilisé, y compris dans les précédents travaux. Cependant, il a l'inconvénient d'être difficile à éliminer, nécessitant souvent le recours à la lyophilisation pour en éliminer toutes traces (fig. 32). En effet, le DMF est toxique pour les bactéries et sa présence dans le composé pourrait fausser les résultats.

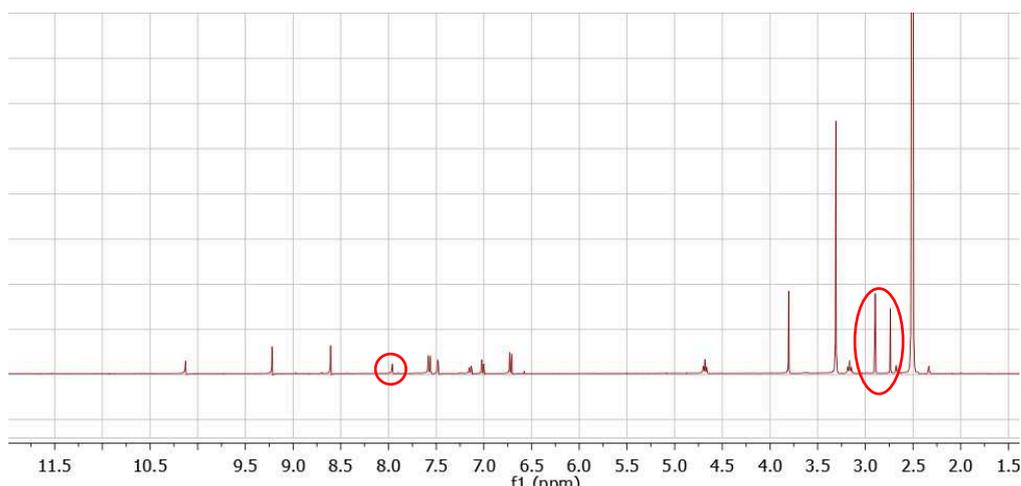


Figure 32: spectre RMN du composé **2** montrant les traces de DMF après purification

Les résultats obtenus avec le MeOH sont comparables à ceux obtenus avec le DMF (75-80% pour les composés où la synthèse a été menée). Son avantage par rapport au DMF est donc d'être plus facile à éliminer. Il s'agit d'un avantage pratique, qui en fait une alternative intéressante pour la synthèse.

I-3-3-3 Purification des composés

Deux méthodes de purification ont été utilisées : par chromatographie sur gel de silice et par précipitation.

- Chromatographie sur gel de silice

L'utilisation de mélange CH₂Cl₂/MeOH ou CH₂Cl₂/AcOEt n'avait pas d'influence sur les résultats en termes de rendement. Cependant, le mélange avec de l'acétate d'éthyle présente un temps de rétention moins long. Il s'agit là encore d'un avantage pratique, car cela permet d'avoir une bonne séparation avec une consommation moindre de solvant.

- Précipitation

La purification par précipitation peut se faire en recourant au diéther ou à l'acétate d'éthyle. Il permet d'éliminer le DMF (lorsque celui-ci est utilisé) et les autres impuretés formées. Elle permet donc d'obtenir un gain de temps. Cependant, lorsque la masse de composé synthétisée est faible, les pertes sont importantes, conduisant à un rendement réduit parfois de 50%. Par contre, pour des volumes plus importants (> 1 g, surtout à partir de 5 g), les pertes sont alors négligeables par rapport à la masse (réduction de moins de 5% du rendement). Cette méthode est donc intéressante en cas de synthèse de masses relativement importantes. En cas d'utilisation de DMF, une lyophilisation s'avère nécessaire. En somme, cette méthode présente des avantages en termes de gain de temps et de consommation moindre de solvant, mais est intéressante surtout pour des quantités importantes de composé.

I-3-4 Synthèse des composés à chaînes alkylamines

Comme le montre le schéma rétrosynthétique (fig. 33), deux voies de synthèses peuvent être envisagées pour obtenir ces composés : réaliser la réaction sur l'un des intermédiaires de synthèse d'analogue d'hémibastadine (voie A) ou fixer la chaîne sur un des analogues synthétisés (voie B).

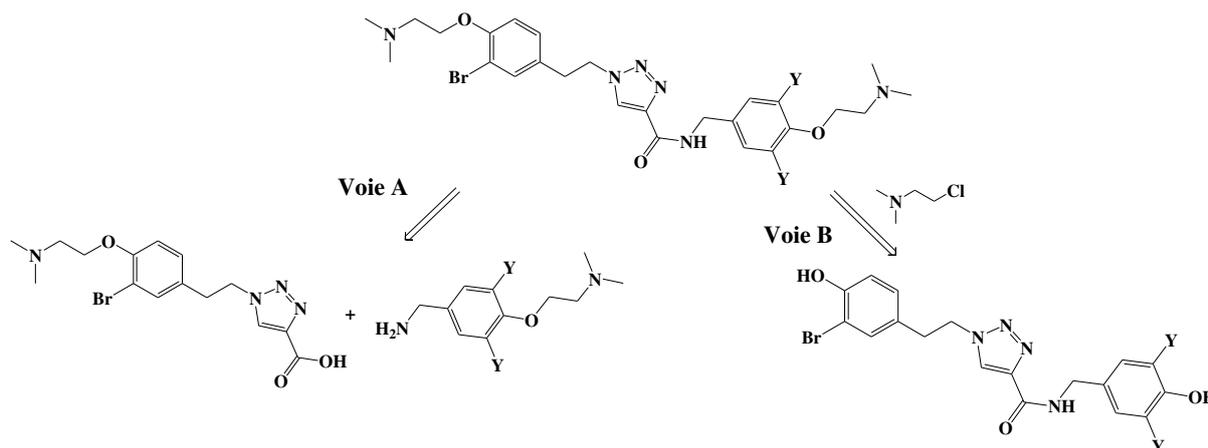


Figure 33: analyse rétrosynthétique des composés à chaîne N,N-diméthyléthylamine montrant les deux voies de synthèse possibles

I-3-4-1 Voie A : Adjonction de chaîne N,N-diméthyléthylamine sur un des intermédiaires de synthèse

Il peut s'agir de l'intermédiaire acide carboxylique ou de l'amine, les contraintes étant différentes.

- Intermédiaire acide carboxylique à chaîne N,N-diméthyléthylamine

La préparation de ce composé peut être envisagée après alkylation de l'intermédiaire de type azide (Fig. 34)

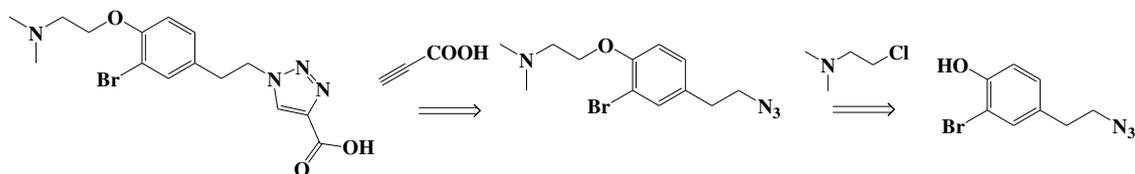


Figure 34 : analyse rétrosynthétique d'un intermédiaire de type triazole 1,2,3carboxylique à fonction N,N-diméthyléthylamine

La synthèse d'un tel composé n'a pas été réalisée. Sa purification aurait été compliquée par son caractère amphotère (du fait de la présence simultanée de fonctions acide et amine).

- **Amine aromatique à chaîne N,N-diméthyléthylamine**

La synthèse d'un tel composé nécessite au préalable une protection de la fonction amine (pour éviter que la réaction se passe à ce niveau), suivie de l'alkylation proprement dite et enfin de la déprotection sous l'action de l'acide trifluoroacétique (TFA). Ces étapes ont été expérimentées avec le 4-(aminométhyl)-2,6-dibromophénol et le 4-(aminoéthyl)-2,6-dibromophénol (cf fig. 35).

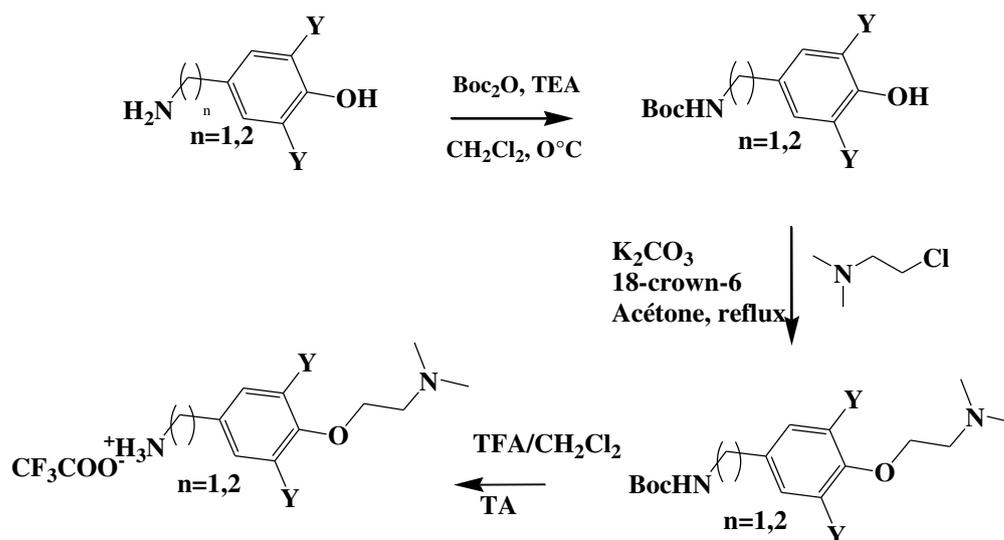


Figure 35: étapes de l'alkylation d'une amine aromatique

L'étape de protection a bien été réalisée, (rendement de l'ordre de 75%). L'alkylation cependant a conduit à des composés difficilement purifiables et finalement, la déprotection s'est effectuée avec un très faible rendement (<10%) et le produit souhaité n'a pas pu être isolé. Cette voie a également été abandonnée.

I-3-4-1 Voie B : adjonction de la chaîne alkylamine sur un analogue d'hémibastadine déjà synthétisé

Cette méthode a été expérimentée avec le composé **2** selon différentes modalités (solvants, température de réaction) telles que résumées dans le tableau 4.

Tableau 4: conditions expérimentales pour l'alkylation du composé **2**

Solvant	Température	Résultat (Rdt)
Acétone	Reflux	0
DMF	90°C	Composé avec impureté impossible à séparer
DMF	70°C	95%

Le recours à l'acétone n'a pas permis de réaliser la réaction, probablement du fait de la non solubilité de l'hémibastadine dans ce solvant.

L'utilisation du DMF a permis d'obtenir le composé souhaité. Cependant, à 90°C, on observe la présence de nombreuses impuretés impossibles à éliminer. Par contre, à une température n'excédant pas 70°C, le composé a bien été obtenu avec de bons rendements. C'est donc cette méthode qui a été retenue. La figure 36 décrit les conditions de cette synthèse.

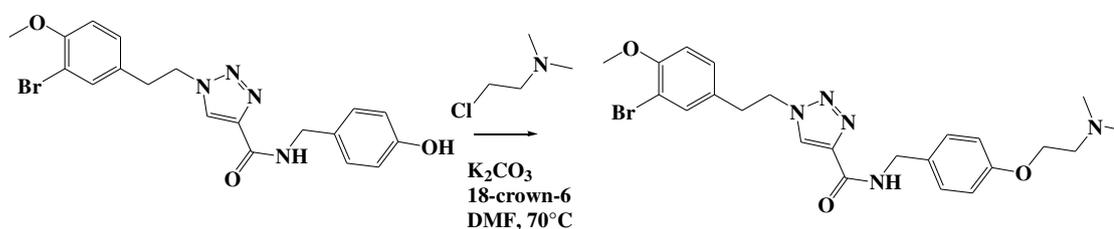


Figure 36: schéma de la réaction d'alkylation des hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole

II- Etude de l'activité anti-biofilm et impact environnemental d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole

Les analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole ont montré leur efficacité en tant qu'inhibiteurs de formation de biofilm par des bactéries marines. Les composés évalués l'avaient été sur 3 souches marines modèles : *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 et *Paracoccus* sp 4M6. Les composés ont montré leur capacité à inhiber la formation de biofilm sans toutefois avoir d'activité antibactérienne. Cependant, ces évaluations ont été réalisées dans des conditions simples, avec des biofilms mono-souches. Alors que les milieux naturels, notamment le milieu marin, sont polymicrobiens. De plus, la toxicité n'a été évaluée que face aux bactéries tests, afin de déterminer la spécificité anti-biofilm de leur activité. Le but final étant de développer des composés à activité anti-biofilm dépourvus de toxicité contre les organismes marins, il y a également nécessité d'évaluer cette toxicité.

Afin de répondre à ces différents objectifs, la première étape des travaux a consisté à l'évaluation de 3 nouveaux composés synthétisés. Ceux-ci sont caractérisés par une région « ouest » identique : obtenus à partir de l'acide **1a**, les composés sont donc porteurs d'une fonction méthoxyle, avec 2 atomes de carbone en région « ouest ». Alors qu'en région « est », la chaîne carbonée résulte d'une réduction de la longueur à 1 ou 0 atome de carbone, le noyau aromatique étant ou non bromé. Cette dernière variation de structure les distingue de la précédente série réalisée, caractérisée par une longueur fixe à 2 atomes de carbone en région « ouest ». La figure 37 présente la structure générale des composés évalués. Le tableau 5 montre les différents composés évalués

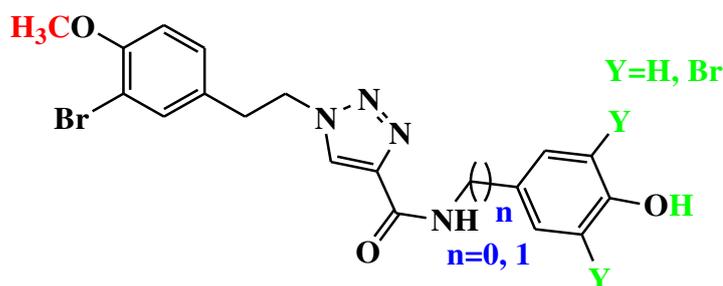


Figure 37: structure des composés de la première série évaluée

Tableau 5: caractéristiques des composés de la première série

Composé	n	Y	Rdt	LogP
2	0	H	68%	3,53
3	1	H	72%	3,6
4	1	Br	56%	5,26

Les composés obtenus ont dans un premier été comparés par leur capacité à inhiber l'adhésion des souches modèles TC8, TC14 et 4M6 dans les conditions expérimentales comparables à celles déjà réalisées. Le critère de comparaison était la CE₅₀. Leur action sur la croissance et la viabilité des bactéries a également été évaluée.

Le composé le plus actif des trois a ensuite été sélectionné pour la suite des travaux. Il s'est d'abord agi d'évaluer sa capacité à inhiber un biofilm constitué de 3 souches bactériennes : *Persicivirga* (Nonlabens) *mediterranea* TC4, *Shewanella* sp TC11 et *Shewanella* sp. TC10-pX5-GFP. Cette dernière souche est la TC10 transformée au sein du laboratoire MAPIEM pour y intégrer un plasmide porteur de la green fluorescent protein (GFP) afin de la rendre auto-fluorescente. La technique utilisée a été une adaptation de celle mise au point par Guilloneau pour l'étude des interactions entre microorganismes marins dans un biofilm. Cette technique a été ainsi pour la première fois utilisée pour l'évaluation de composés à activité anti-biofilm. De façon pratique, il a fallu tout d'abord évaluer la capacité du composé à inhiber l'adhésion des souches utilisées puis son activité sur leur croissance et leur viabilité bactérienne. Une fois l'activité sur les souches isolées vérifiée, le test a été mené sur le biofilm complexe constitué des 3 souches, avec et sans le composé évalué. Les biofilms ont ensuite été visualisés par microscopie confocale et les biovolumes des biofilms évalués et comparés, afin d'objectiver l'activité des composés.

Un dernier test a consisté à déterminer la toxicité du composé sur le plancton. Ceci a été réalisé en mettant en contact le composé avec de l'eau de mer prélevée en rade de Toulon et à mesurer son effet sur la viabilité des constituants planctoniques (pico, nanoplancton). Il s'agissait encore une fois d'une première expérimentation de cette technique pour l'évaluation de l'activité de composés.

Ces travaux sont rapportés dans la publication suivante, parue dans Letters in Applied Microbiology.

SPECIAL ISSUE ARTICLE

Towards eco-friendly biocides: preparation, antibiofilm activity of hemibastadin analogues

A. Kacou¹, A. Ouvrard^{1,2}, D. Jamet², J.-L. Jamet² and Y. Blache¹ ¹ Université de Toulon, MAPIEM, Toulon, France² Université de Toulon, Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, MIO, CNRS, Toulon, France

Significance and Impact of the Study: This study reports relevant information about antibiofilm activity of original derivatives of hemibastadin alkaloids. The most active compound was shown to act as a specific anti-biofilm inhibitor without affecting viability of the targeted bacteria no more than those of the global bacterial community of a seawater sample. Taken together, these findings indicate the potentiality of such compounds to be used as original nonbiocidal molecules for designing eco-friendly antifouling solutions.

Keywords

biocides, biocontrol, biofilms, ecotoxicity, environmental.

CorrespondenceYves Blache, Laboratoire MAPIEM (EA 4323), SeaTech Ecole d'Ingénieurs, Université de Toulon, CS 60584, 83041 Toulon Cedex 9, France.
E-mail: blache@univ-tln.fr

2019/0149: received 27 December 2018, revised 2 March 2019 and accepted 3 March 2019

doi:10.1111/lam.13150

Abstract

The antibiofilm activity of three hemibastadins analogues was evaluated against different marine bacterial strains through mono-species biofilms and through a multi-species model of biofilm. Results showed that compound **3** exhibited interesting antibiofilm efficiencies effective concentrations (EC_{50}) in the range of 30–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ without acute toxicity against bacteria. Toxicity against nontargeted organisms was also considered showing that the compound did not affect the global bacterial community at a concentration of 75–100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. These results provided baseline data concerning the toxicity of antibiofilm biocides against marine organisms.

Introduction

Biofouling is involved in almost every process taking place in water, costing billions of dollars each year only in the sector of transportation. This phenomenon is a natural multistage process which typically consists of the rapid adhesion, colonization and growth of micro-organisms (bacteria, microalgae) on artificial surfaces leading to the formation of biofilms. Biofilms may also influence the settlement of macrofoulers (macroalgae, invertebrates) (Yebrá *et al.* 2004; Qian *et al.* 2010; Mieszkin *et al.* 2013; Salta *et al.* 2013). To prevent such an undesirable process, antifouling paints are routinely used to protect the hulls of ships, as well as of smaller vessels. During the last 50 years, the principle of such coatings was based on the use of broad-spectrum biocides. However, as most of

these compounds have been shown to be highly toxic for marine environment, their use is now regulated, and number of these biocides have been banned of the market. In this context, there is a great urge for the conception of original molecules which could exhibit antifouling properties without affecting aquatic life. For such a challenge, some of the antifouling strategies that are tested today consist in targeting the formation of marine biofilms by studying secondary metabolites from marine organisms, such as sponges or soft corals (Melander *et al.* 2016). In addition, a number of researches have been conducted in order to optimize the efficiency of such natural compounds by studying structure-activity relationships (SAR) (Richards *et al.* 2008; Niemann *et al.* 2015). In view of discovering new specific and nontoxic anti-biofilm compounds which should be used as potential

friendly environmentally biocides, our group is developing an efficient approach based on the bioisosteric replacement of natural frameworks by a 1,2,3-triazolic ring to allow SAR studies in the field of antifouling fight. More precisely, we have shown that hemibastadins analogues (Linares *et al.* 2011; Andjouh and Blache 2015, 2016) were able to inhibit the formation of biofilm of marine bacterial strains *in vitro*. Unfortunately, the two most potent derivatives were shown to highly affect the adhesion stage, but this action was correlated with a strong inhibition of bacterial growth. Considering these elements, we wish to report here our last results obtained with new derivatives of hemibastadin **1** on biofilm formation and viability of marine bacteria (Fig. 1). Furthermore, and to assess preliminary eco-toxicological data, we wish to precise their toxicity by studying their global impact on planktonic communities (bacteria, nanoplankton, picoplankton).

Results and discussion

Antibiofilm activities

Compounds **2,3,4** were prepared as described in Fig. S1. In order to assess their anti-biofilm activity against representative Gram-negative bacterial biofilms, three strains were chosen for their capacity to form biofilms: *Pseudoalteromonas lipolytica* (TC8), *Pseudoalteromonas ulvae* (TC14) and a *Paracoccus* sp. strain (4M6), by using our previous method using the specific fluorophore Syto 61. Results of this screen are outlined in Table 1 as their effective concentrations to inhibit 50% of the bacterial adhesion (expressed as EC_{50}).

At this stage, we can note that compound **4** which possesses two bromine atoms does not exhibit interesting activity and that finally, compound **2** and **3** which are

very closed structures seems to be the more interesting leads for inhibiting biofilm formation.

Furthermore, in order to verify that the compounds were specific inhibitors of bacterial biofilm formation and did not act through a general toxicity, their capacity to inhibit the growth of the three strains was tested. Experiments were performed at a concentration of $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ of each compound using ethanol (50% in water) as a positive antibacterial reference. For viability, the same methodology used with SYTO 61 was applied to clarify that the compounds were not lethal to the bacteria using the resazurin test. The results showed that compared to untreated samples, and in contrast with ethanol, these compounds exhibited poor effect on bacterial growth and that there was no toxicity against the three strains at high concentrations, indicating that the anti-biofilm activity was not a result of a bactericidal effect (Fig. 2).

Finally, in regard with these results, and as most biofilm communities are composed of multiple different bacteria living in close proximity, compound **3** which was identified as the more potent and nontoxic compound, was selected for a test against a multispecific biofilm.

Table 1 biological screening against bacterial biofilms of *Paracoccus* sp. (4M6), *Pseudoalteromonas lipolytica* (TC8), *Pseudoalteromonas ulvae* (TC14)

Compound	EC_{50} ($\mu\text{mol l}^{-1}$)		
	4M6	TC8	TC14
2	75.9 ± 7.9	105.8 ± 32.8	70.1 ± 0.2
3	33.1 ± 13.5	66.4 ± 21.4	63.8 ± 13.0
4	137.4 ± 91.2	190.5 ± 44.0	>200

Results are expressed as effective concentration to inhibit 50% of biofilm formation (EC_{50}) in $\mu\text{mol l}^{-1}$. Data represent means \pm standard deviations values from three independent experiments.

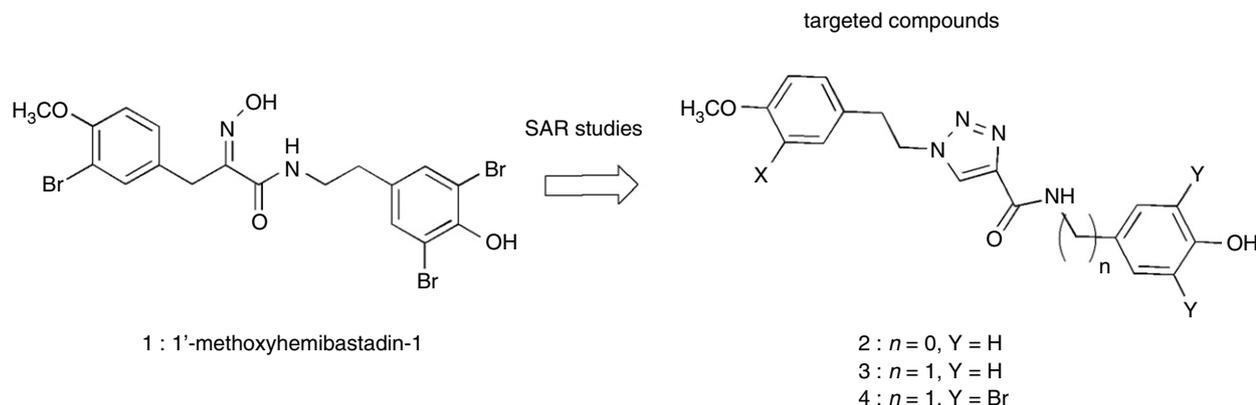


Figure 1 structure of 1'-methoxyhemibastadin **1** and targeted compounds **2,3,4**.

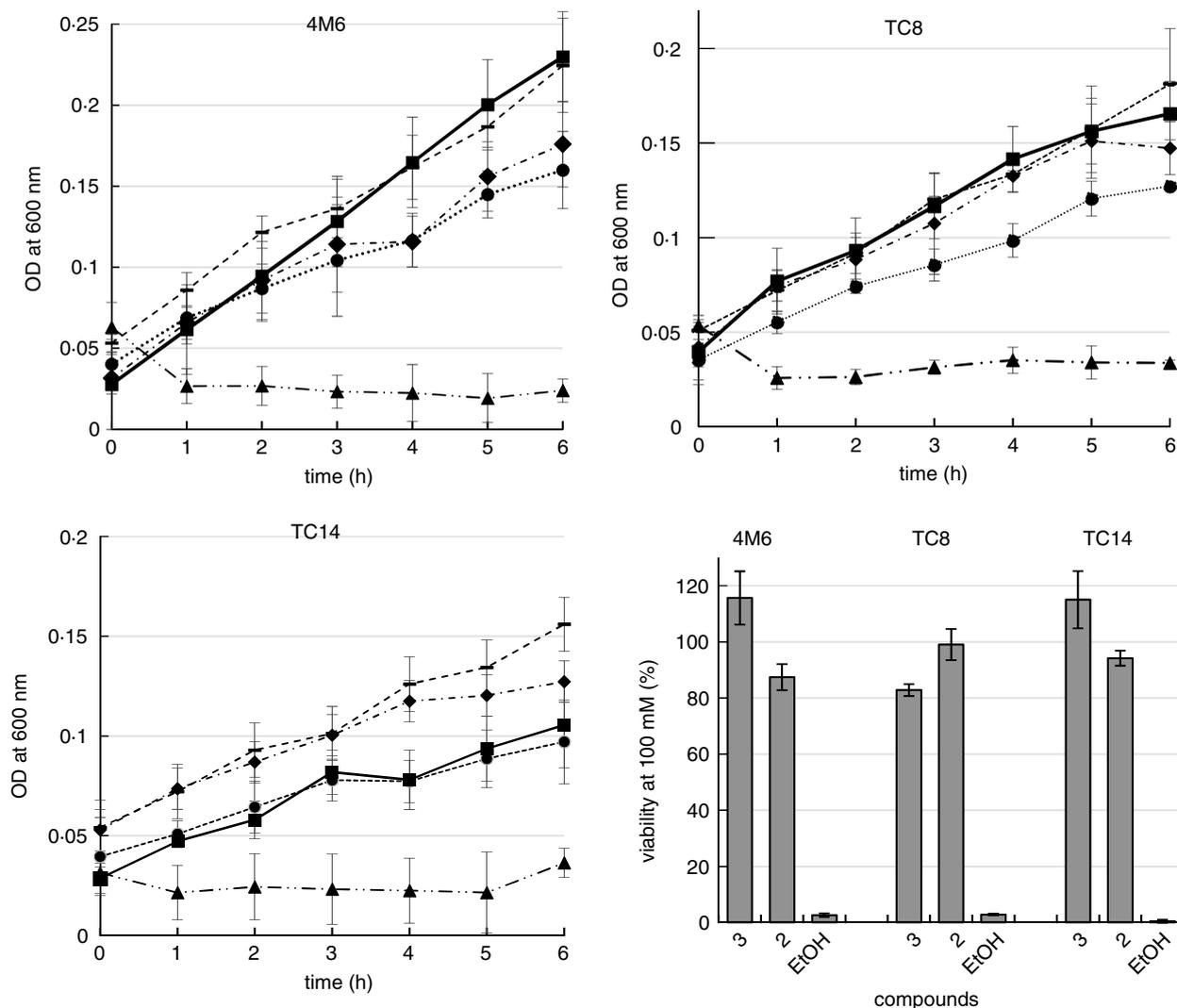


Figure 2 Left, effect of compounds **2** (—■—), **3** (—◆—), **4** (---) at a concentration of 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ on the bacterial growth of *Paracoccus* sp. 4M6 (up), *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 (middle) and *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 (down). Results are expressed by measurement of optical density at 600 nm over 6 h. Ethanol (—▲—) was used as a bactericidal control, and an untreated sample (—■—) was used as positive reference. Right, effect on of compounds **2,3,4** at concentration of 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ on viability of the three strains. Data are expressed as % of viable bacteria when compared to an untreated sample with 100% of viability. **4** (---), **3** (—◆—), reference (—■—) EtOH (—▲—), **2** (—●—)

Such multispecies biofilms could be used as a routine model to test newer biocidal agents. For this purpose, the three bacterial species (TC4, TC10 and TC11) used in the present study were also isolated from Mediterranean Sea and the model of multispecies biofilm was developed by Guilloneau *et al.* First, a simple screening of antibiofilm on each isolated strain confirmed the general antibiofilm activity of compound **3** with EC_{50} ranging from 77 to 104 $\mu\text{mol l}^{-1}$, and no effect was observed on growth and viability of TC4, TC10 and TC11 strains (Table S1).

For the multispecies experiment, TC4, TC10 and TC11 were inoculated in the same proportion on to glass

coverslips and the biofilms were studied at 24 h using CLSM and experiments were conducted with compound **3** at 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ and without compound **3** as a reference. Interestingly, these results (Figs 3 and S2) reveal that compound **3** can reduce indifferently the formation of the three strains in this multispecies biofilm.

Monitoring of bacteria populations

The monitoring of bacterial abundance over 96 h revealed a negative effect of compound **3** on bacterial growth during the first 24 h (Fig. 4). The measured abundance

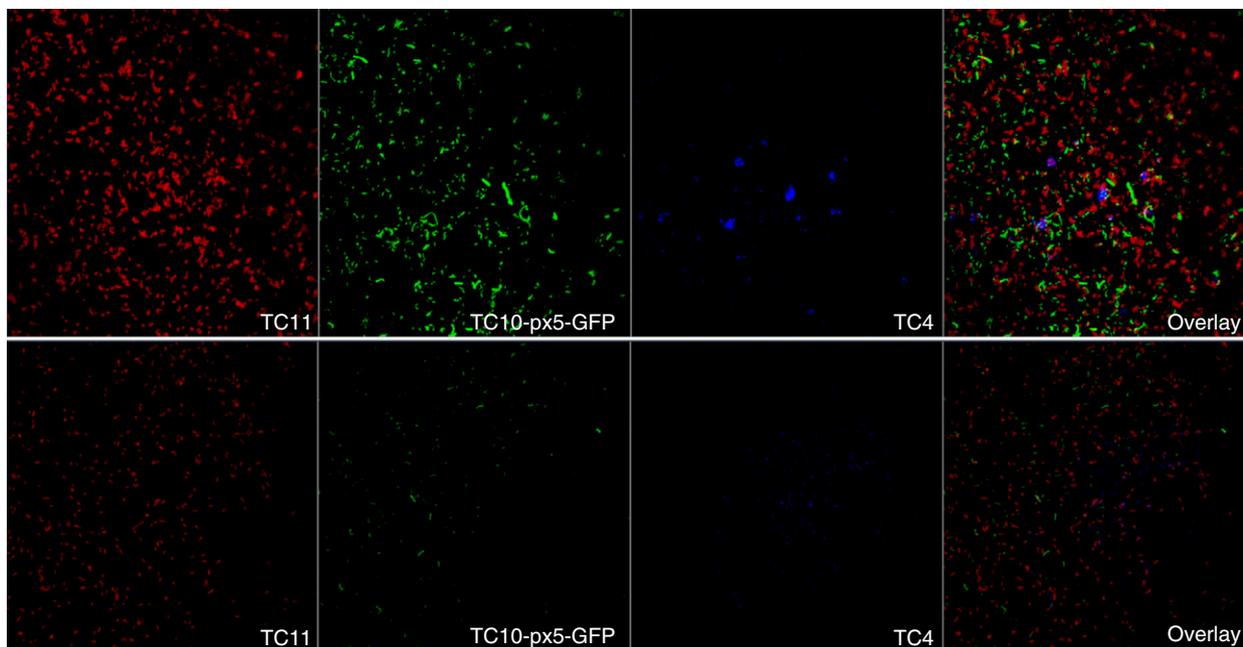


Figure 3 Confocal laser scanning microscopy images for the multispecies biofilm composed of *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11 on coverslips at 24 h. Images showed the biofilm without treatment as reference (up) and treated with $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ of compound **3** (down). Images of each strains have been extracted and overlay of the three strains is shown on the right. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

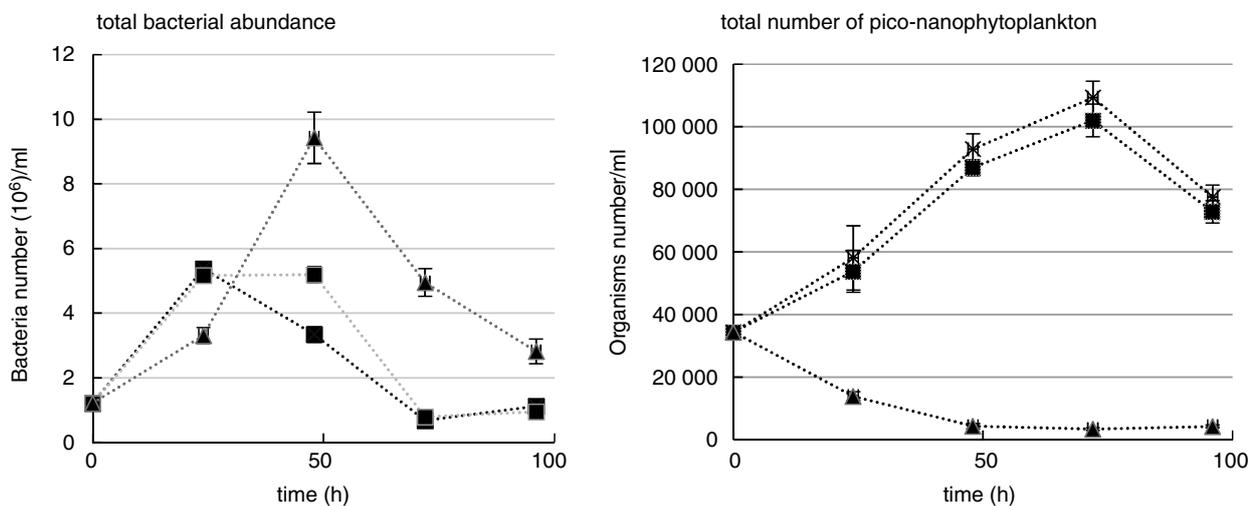


Figure 4 Flux cytometry monitoring of a sample of sea water over 100 h showing the total bacterial abundance (left) and total number of pico-nanophytoplankton organisms (right) according to three tested conditions: a control sample composed of seawater (---), a reference sample with 2% of DMSO (---) which is the minimal concentration for the solubilization of compound **3**, seawater sample treated with $75 \mu\text{mol l}^{-1}$ of compound **3** (-.-.-) solubilized with 2% of DMSO.

seemed strictly lower than the abundances measured for the seawater and DMSO controls ($t = 24$ h). Beyond 24 h, the bacterial growth in condition with compound **3** increased very strongly until reaching a peak at 48 h, unlike the growths measured for the seawater and DMSO controls which have fallen and stabilized around 2×10^6

bacteria per ml. For the physiological state study, the percentage of damaged cells varied from 10 to 30%. In order to get more informations about this unusual change at 24 h, pico- and nano-phytoplankton populations were also monitored (Figs 4, S3 and S4). The density of the communities under the control conditions of seawater

and DMSO increased from t_0 to t_{72h} , before observing a slight fall to t_{final} . This fall correlated with the increase in large cells with a peak at 72 h, and the observations recorded during the experiment at time = 96 h: large clumps of organisms were developed in the six bottles of the seawater and DMSO controls. A microscopic observation of them revealed the large presence of large predators (microphytoplankton: Dinophyceae of the genus *Gymnodinium* sp.). It is important to note that no clumps of microphytoplankton cells were found in the bottles in the presence of the chemical compound. Concerning the communities in the presence of the compound, a significant fall in abundance was observed from t_0 to t_{96h} . Considering these observations, it seemed that the influence of environmental conditions and more particularly the presence of nutrients and organic matter resulting from the death of pico and nanoplankton cells, was greater than that of the compound. The different curve dynamics could be explained by the different proportions of deaths in the studied phytoplankton communities, strictly higher under the conditions with the compound than in the both controls conditions, providing a considerable input of organic matter usable by the bacteria for their growth. Finally, even if a significant difference was observed at 24 h between our three conditions (seawater, DMSO, compound 3), compound 3 at a concentration of $75 \mu\text{mol l}^{-1}$ did not appear to strongly impact the bacterial community studied, with the same number of bacteria in the three conditions at t_0 and t_{final} . Moreover the study of the physiological state of cells seemed to confirm our results, with for each condition the percentage of damaged cells varying from 10 to 30% which have shown no particular effect of the compound with respect to the integrity of the bacterial membrane.

Figure 4 shows bacterial abundance (left) and total number of pico-nanophytoplankton organisms (right) over time according to the three tested conditions (seawater, with DMSO, with compound 3).

Taken together, our results strongly indicate that compound 3 act as potent and specific antibiofilm agent against gram negative marine bacteria. Since the growth and viability of the different strains was not affected by exposure of compound, we can consider it as nontoxic on the different isolated strains as well as on multispecies biofilms. In addition, when looking to for the global toxicity on planktonic communities, it is important to note that no toxicity was observed on natural bacterial community while pico-and nano-plankton communities seems to be affected, suggesting a potential toxic effect toward these species.

In summary, in this study, we designed the potential antibiofilm compound 3 and showed that the coupling of *in vitro* bioassays (biofilm, growth, toxicity) with

experiments in natural sea water (monitoring bacterial communities) is of great interest to assess a first degree of ecotoxicity. Furthermore, rationalization of the research of new bioactive compounds that respect the environment should take in account these results by addressing such specific bioassays.

Materials and methods

Preparation of compounds 2,3,4 (Sall *et al.* 2018)

All chemicals were purchased from Aldrich or ACROS and used as received. $^1\text{H-NMR}$ spectra (400 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (100 MHz) were recorded on a Bruker Advance NMR spectrometer (Palaiseau, France). The spectra were recorded in DMSO- d_6 as solvent. Multiplicity was indicated as follows: s (singlet); d (doublet); t (triplet); m (multiplet); dd (doublet of doublets), etc. Coupling constants (J) were given in Hz. Chemical shifts are reported in δ relative to trimethylsilyl as an internal standard. Mass spectra were measured on an ion trap mass spectrometer fitted with an ESI interface (Esquire 6000; Bruker Daltonics, Canteleu, France).

Method

To a stirred solution of 1.28 mmol of 1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid (Andjouh and Blache 2015, 2016) in anhydrous dimethyl formamide (DMF), were added dicyclohexylcarbodiimide (1.2 eq), Hydroxybenzotriazole (1.2 eq). The mixture was stirred at room temperature under nitrogen for 5 min and appropriate amine (1.0 eq), diisopropylethylamine (100 μl) were added. The reaction was stirred at room temperature for 48 h. A saturated NaCl solution was then added and the organic layer extracted three times with CH_2Cl_2 . The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography (SiO_2) using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ as eluent to yield compounds 2,3,4.

Bacterial strains

Six marine gram negative bacterial strains *Pseudoalteromonas ulvae* (TC14), *Pseudoalteromonas lipolytica* (TC8), *Paracoccus* sp. (4M6), *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11 (Brian-Jaisson *et al.* 2014).

TC14 was isolated in June 2010 in Little Bay of Toulon (1 m depth, Mediterranean Sea, France)(Brian-Jaisson *et al.* 2014). The strain 4M6 was provided by the LBCM (Université de Bretagne Sud). It was isolated on glass slides immersed during 6 h at 1 m depth in March 2000 in the Morbihan Gulf (Bailleron Island, 47_3403700N-

2_4405400W, Atlantic Ocean) (Grasland *et al.* 2003). TC8 was isolated in February 2008 in Little Bay of Toulon (1 m depth, Mediterranean Sea, France) (Camps *et al.* 2011). TC4, TC10 and TC11 have also been isolated from various surfaces immersed in Little Bay of Toulon (1 m depth, Mediterranean Sea, France). TC10 harboured the pX5 plasmid encoding GFP (constructed by Dr. Aurore Puymège).

Anti-adhesion bioassays (Camps *et al.* 2011; Othmani *et al.* 2014)

Bacterial strains were grown on Väätänen nine-salts solution (VNSS). When the stationary phase was reached, bacterial suspension was centrifuged. Cells were then diluted in sterile artificial sea water (ASW) and introduced into microtiter plates (sterile black PS; Nunc, Fisher Scientific, Asnières sur Seine, France) with tested molecules at eight concentrations (2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$) in three replicates in the presence of three controls: (i) nonspecific staining control, (ii) adhesion control, and (iii) positive control. The maximum percentage of solvent (final concentration = DMSO 2%) used for the dilution of biocides was also tested in triplicate as additional control. After incubation during an optimized adhesion time (moderately 15 h), the non-adhered bacteria were eliminated and the adhered cells were quantified after SYTO 61 (Molecular Probes Invitrogen, Montilly le Bretonne, France) (1 $\mu\text{mol l}^{-1}$) staining. A percentage of inhibition was calculated per well:

$$\frac{\text{Mean FI}_i - \text{nsC}_i}{\text{Mean FI}_c - \text{Mean B}} \times 100,$$

with FI_i as the fluorescence intensity in a treated well (tested compound + bacteria + SYTO 61), FI_c as the fluorescence intensity in a control well (bacteria + SYTO 61), nsC_i as the nonspecific control (tested compound without bacteria + SYTO 61), and B as the blank, i.e. stain control (only SYTO 61). A sigmoid dose–response curve was obtained when plotted the percentage of inhibition with the log of compound concentrations, after mean ($n = 3$) and standard deviation calculation per triplicate for each concentration. EC_{50} values were then calculated for each compound using GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA). This software allowed also to perform statistical tests dedicated to the analysis of two variables simultaneously, such as the difference between strains and between biocides (two-way ANOVA). Significant differences were accepted when $P < 0.05$.

Toxicity tests (Camps *et al.* 2011; Othmani *et al.* 2014)

After growth on VNSS, bacterial strains were picked up during the exponential phase. The microtitre plates

(sterile transparent PS) were filled as described in the protocol of the antiadhesion assay but using VNSS instead of ASW to allow bacterial growth. The bacterial growth was followed by measuring the turbidity ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) every hour during 7 h. Then, resazurin (50 $\mu\text{mol l}^{-1}$) was added in all the wells, and fluorescence was measured after 2 h to quantify the percentage of bacterial viability. The same methodology used with SYTO 61 was applied to calculate a percentage of viability after resazurin staining. Only compounds with EC_{50} lower than 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ were tested and experiments were performed at concentration of 100 μM of each compound using ethanol 50% as a positive antibacterial reference.

Multispecies biofilm formation

This test using TC4, TC11 and TC10 was realized by strictly following the procedure previously described in MAPIEM laboratory (Guillonnet *et al.* 2018).

Bacterial labelling

This was made with TC4, TC11 and TC10. TC10-pX5-GFP was obtained by conjugation using *Escherichia coli* WM3064 as a 113 donor strain. Briefly, postexponential phase culture of WM3064 transformed with pX5-GFP 114 was mated with postexponential phase *Shewanella* sp. TC10 in a 1 : 1 ratio on VNSS plates 115 containing 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of DAP (2,6-Diaminopimelic acid) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) overnight at 20°C. *Shewanella* sp. TC10 transconjugants were selected on 117 VNSS DAP free agar plates containing 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of chloramphenicol.

Anti-multispecies biofilm assay

To test the capability of molecule to inhibit multispecies biofilm, this test has been led with three species: TC4, TC11 and TC10-pX5-GFP on a 24 h biofilm. After growth in VNSS, bacteria in postexponential growth phase were suspended in ASW and inoculated in 24 well plates (Corning Incorporated Costar) containing a sterilized glass coverslip into each well to a final $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 0.3 (0.1 per strain). This test was made with and without 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of the previously molecule determined as the most effective. Controls included single species biofilms formed in the same condition. After 24 h, cells were fixed using Formalin 3.7% during 15 min. For the immunostaining, samples were blocked with BSA 3% (Acros Organics, Gelle, Belgium) in PBS 1 \times overnight at 4°C. The primary antibodies were added during 1 h in 190 BSA 3% at 1/300 for Chicken-anti-TC4, 1/100 for Goat-anti-TC5 and 1/300 for Rabbit-anti-191 TC11. After a second blocking step of 2 h at room temperature, the secondary antibodies were 192 added in BSA 3% to a

concentration of 1/2000 for Goat anti-Chicken IgY (H+L) conjugated to 193 FITC (Invitrogen, Waltham, MA) for 1 h, to a concentration of 1/500 for 194 Goat anti-Chicken IgY (H+L) conjugated to Alexa Fluor 405 (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h, to a concentration of 1/1000 for Donkey anti-Goat IgG (H+L) coupled to 196 Alexa Fluor 633 (Invitrogen) for 1 h, to a concentration of 45 $\mu\text{l ml}^{-1}$ for Donkey anti-Rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 during 30 min and to a concentration of 1/200 for Mouse anti-rabbit IgG coupled to CruzFluor 488 for 1 h. Finally, the coverslips were mounted with a drop of ProLong Diamond Antifade before observation 200 using CLSM.

Data extraction from images and statistics

At least three replicates and five pictures per replicate were performed and used for data extraction. The pictures have been acquired by CLSM. The biovolume was determined with the COMSTAT2 software (Heydorn *et al.* 2000; Vorregaard 2008).

Pico-nanophytoplankton and bacteria preparation and monitoring

Seawater was collected on the French Mediterranean coast (43°05'N/05°55'E). Samples of 500 ml were prepared in triplicate and inserted into bottles with three different study conditions: (i) one control condition containing only seawater, (ii) one DMSO in sea water (1% v/v) control condition, (iii) one condition with the compound studied at 75 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (DMSO 1% v/v) in sea water. This concentration was chosen because at a concentration of 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ we observed a flocculation which was not compatible with flow cytometry analyses. The bottles were stored in a thermostatically controlled chamber at 20°C following a day-night cycle. Two millilitre of sample were taken each day from each bottle and analyzed by flow cytometry. Flow cytometry analyses were performed using an Accuri C6 (BD Biosciences, Le pont de claix, France) equipped with 488 and 640 nm laser beams. Ultrapure water filtered on 0.2 μm was used as sheath fluid. For each analyzed particle, two light scatter intensities were collected: the forward angle light scatter is related to the size of the particles, and the side scatter is related to the shape and inner structure of the particles. Three natural fluorescence intensities induced by the 488 nm laser beam were recorded. The flow cytometer measured red fluorescence (FL3) mainly emitted by chlorophyll (>650 nm), orange fluorescence (FL2) mainly emitted by phycoerythrin emission (585 \pm 20 nm), and green fluorescence (FL1) (530 \pm 15 nm). The FL4 far red fluorescence (675/25 nm) is induced by the 640 nm red

laser beam. Beads of 2 μm (Fluoresbrite YG, Polysciences) were periodically added in samples as an internal standard. All data were collected in log scale using CFlowPLUS software (BD Biosciences).

To monitoring pico-nanophytoplanktonic community, 500 μl were analysed at 60 $\mu\text{l min}^{-1}$ and data acquisition was triggered on the red fluorescence signal to focus on autofluorescent particles containing chlorophyll *a*. The optical resolution of the various functional groups was based on their ranges of light scatter and fluorescence intensities using two-dimensional data displays called cytograms (Marie *et al.* 1997, 2014; Grégori *et al.* 2001; Thyssen *et al.* 2014).

To monitoring the bacterial community, 5 μl of Syber-green were added to 500 μl sample and 50 μl were analysed at 14 $\mu\text{l min}$ and data acquisition was triggered on the green fluorescence signal (FL1). The study was supplemented by evaluation tests of bacteria physiological state (viability), using propidium iodide. This marker only penetrates bacteria with damaged membranes and binds to DNA. Propidium iodide was added at a final concentration of 1 mg ml^{-1} and the samples were incubated for 30 min in the dark. Propidium iodide fluoresces in red (FL3). FL3 is a fluorescence detector that detects natural or artificial red fluorescence.

Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate, the dubious values were tested by means of a Dixon test and removed if they proved to be aberrant. Statistical studies were carried out by ANOVA. Significant differences were accepted when $P < 0.05$. In some cases, the Wilcoxon–Mann–Withney and Tukey tests were performed to compare the distribution of the data under different conditions two by two. All statistical processing was done using the R software (R Development Core Team 2005).

Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies (public, or private). The *Paracoccus* sp. strain 4M6 was provided by the LBCM (Université de Bretagne Sud).

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

References

- Andjough, S. and Blache, Y. (2015) Click-based synthesis of bromotyrosine alkaloid analogs as potential anti-biofilm leads for SAR studies. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 5762–5766.

- Andjouh, S. and Blache, Y. (2016) Screening of bromotyramine analogues as antifouling compounds against marine bacteria. *Biofouling* **32**, 871–881.
- Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y. and Molmeret, M. (2014) Identification of bacterial strains isolated from the mediterranean sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microb Ecol* **68**, 94–110.
- Camps, M., Briand, J.F., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Bazire, A. and Blache, Y. (2011) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Mar Poll Bull* **62**, 1032–1040.
- Grasland, B., Mitalane, J., Briandet, R., Quemener, E., Meylheuc, T., Linossier, I., Vallee-Rehel, K. and Haras, D. (2003) Bacterial biofilm in seawater, cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling* **19**, 307–313.
- Grégori, G., Colosimo, A. and Denis, M. (2001) Phytoplankton group dynamics in the Bat of Marseille during a 2-year survey based on analytical flow cytometry. *Cytometry* **44**, 247–256.
- Guillonneau, R., Baraquet, C., Bazire, A. and Molmeret, M. (2018) Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Front Microbiol* **9**, 1960.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K. and Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**, 2395–2407.
- Linares, D., Bottzeck, O., Pereira, O., Praud-Tabariès, A. and Blache, Y. (2011) Designing 2-aminoimidazole alkaloids analogs with anti-biofilm activities: structure–activities relationships of polysubstituted triazoles. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 6751.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S. and Vaultot, D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* **63**, 186–193.
- Marie, D., Rigaut-Jalabert, F. and Vaultot, D. (2014) An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry A* **85**, 962–968.
- Melander, R.J., Liu, H.B., Stephens, D.M., Bewley, C.A. and Melander, C. (2016) Marine sponge alkaloids as a source of anti-bacterial adjuvants. *Bioorg Med Chem Lett* **26**, 5863–5866.
- Mieszkin, S., Callow, M.E. and Callow, J.A. (2013) Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review. *Biofouling* **29**, 1097–1113.
- Niemann, H., Hagenow, J., Chung, M.Y., Hellio, C., Weber, H. and Proksch, P. (2015) SAR of sponge-inspired hemibastadin congeners inhibiting blue mussel phenoloxidase. *Mar Drugs* **13**, 3061–3071.
- Othmani, A., Bouzidi, N., Viano, Y., Alliche, Z., Seridi, H., Blache, Y., El Hattab, M., Briand, J.F. *et al.* (2014) Anti-microfouling properties of compounds isolated from several mediterranean *dictyota* spp. *J Appl Phycol* **26**, 1573–1584.
- Qian, P.Y., Xu, Y. and Fusetani, N. (2010) Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* **26**, 223–234.
- R Development Core Team (2005) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>.
- Richards, J.J., Ballard, T.E. and Melander, C. (2008) Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with reverse amide 2-aminoimidazole oroidin analogues. *Org Biomol Chem* **8**, 1356–1363.
- Sall, C., Ayé, M., Bottzeck, O., Praud, A. and Blache, Y. (2018) Towards smart biocide-free anti-biofilm strategies: click-based synthesis of cinnamide analogues as anti-biofilm compounds against marine bacteria. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 155–159.
- Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R. and Briand, J.F. (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ Microbiol* **15**, 2879–2893.
- Thyssen, M., Grégori, G., Grisoni, J.M., Pedrotti, M.L., Mousseau, L., Artigas, L.F., Marro, S., Garcia, N. *et al.* (2014) Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea: influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure. *Front Microbiol* **5**, 1–16.
- Vorregaard, M. (2008) *Comstat2—A Modern 3D Image Analysis Environment for Biofilms, in Informatics and Mathematical Modelling*. Kongens Lyngby, Denmark: Technical University of Denmark. www.comstat.dk.
- Yebra, D.M., Kiil, S. and Dam-Johansen, K. (2004) Antifouling technology past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* **50**, 75–104.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article

Figure S1 Methodology for the synthesis of compounds 2,3,4 showing the peptidic coupling.

Figure S2 Biovolumes measured at 24 h of each strain in three species biofilms compared to when cultivated alone.

Figure S3 Flux cytometry monitoring of a sample of sea water over 100 h showing the composition of pico-nano-phytoplankton organisms (right) for three tested conditions: a control sample composed of seawater, a

reference sample with 2% of DMSO, a seawater sample treated with $75 \mu\text{mol l}^{-1}$ of compound **3** solubilized with 2% of DMSO.

Figure S4 Relative abundances of the different sub-communities studied over time obtained through flux cytometry monitoring of a sample of sea water over 96 h for three tested conditions: a control sample composed of

seawater (up), a reference sample with 2% of DMSO (middle), a seawater sample treated with $75 \mu\text{mol l}^{-1}$ of compound **3** solubilized with 2% of DMSO (down).

Table S1 Biological screening of compound **3** against bacterial biofilms of *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11.

Supporting informations

Toward eco-friendly biocides: preparation, antibiofilm activity of hemibastadin analogues

Alain Kacou,¹ Alex Ouvrard,^{1,2} Dominique Jamet,² Jean-Louis. Jamet,² Yves Blache^{1*}

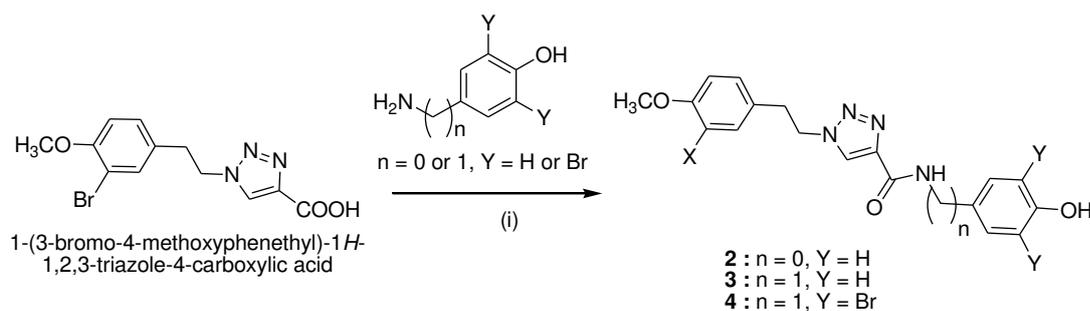
¹Université de Toulon, MAPIEM, Toulon, France

²Université de Toulon, Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, MIO, Toulon, France

Methodology for the synthesis of compounds 2,3,3

Method : To a stirred solution of 1.28 mmol of 1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylic acid (Andjouh *et al.* 2015) in anhydrous DMF, were added dicyclohexylcarbodiimide (1.2 eq), Hydroxybenzotriazole (1.2 eq). The mixture was stirred at room temperature under nitrogen for 5 min and appropriate amine (1.0 eq), diisopropylethylamine (100 μ L) were added. The reaction was stirred at room temperature for 48 hours. A saturated NaCl solution was then added and the organic layer extracted three times with CH₂Cl₂. The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash chromatography (SiO₂) using CH₂Cl₂/MeOH as eluent to yield compounds 2,3,4.

Figure S1 : Methodology for the synthesis of compounds 2,3,3 showing the peptidic coupling



(i) : EDC, HOBt, DIPEA, DMF/CH₂Cl₂, 48h, 20°C

Structural datas for compounds 2,3,4:

1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(4-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (2).

Mp 215-217°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,17 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.57 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.14 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.68 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.16 (t, J = 7.1 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 158.3, 154.5, 154.2, 143.4, 133.5, 131.5, 130.5, 129.7 (2C), 127.4, 122.6, 115.4 (2C), 112.9, 110.9, 56.6, 51.2, 34.1. (ESI, m/z) [M+H⁺] : 383.20-418.84.

1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(4-hydroxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (3).

Mp 170-171°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 9.27 (s, 1H), 8.91 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.45 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.64 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 4.30 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.13 (t, J = 7.1 Hz, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 159.9, 156.6, 154.5, 143.1, 133.5, 131.7, 130.3, 129.7, 129.2 (2C), 126.8, 115.4 (2C), 112.9, 110.9, 56.6, 51.1, 41.8, 34.5. (ESI, m/z) [M+H⁺] : 383.20-431.03.

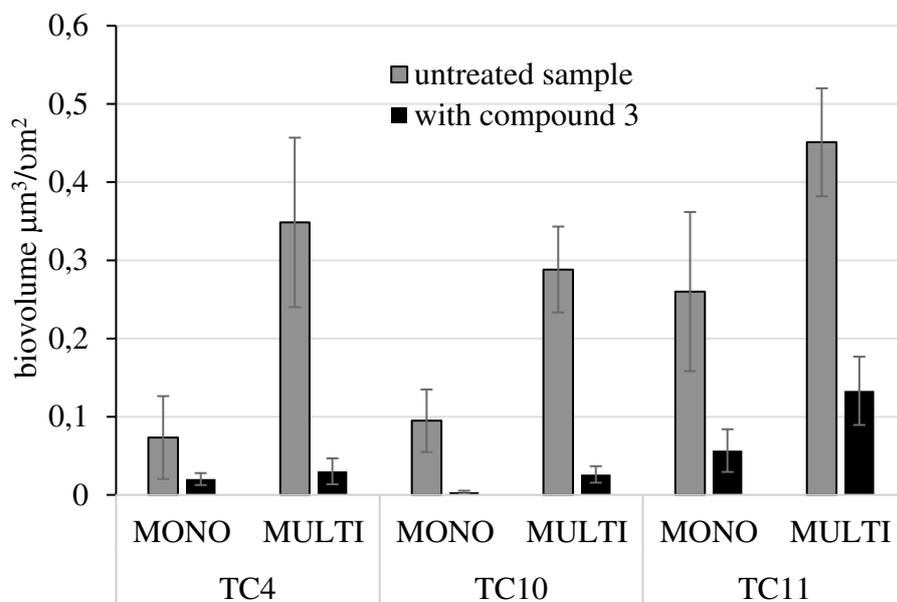
1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (4).

mp 216-217 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 9.87 (s, 1H), 9.11 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.64 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 4.30 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.13 (t, J = 7.1 Hz, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 160.3, 154.6, 150.3, 142.9, 134.2, 133.5, 131.8, 131.6, 129.8(2C), 127.1, 113.0 (2C), 112.3, 110.9, 56.6, 51.3, 40.5, 34.6. (ESI, m/z) [M+H⁺] : 383.20-385.17.

Table S1 : biological screening of compound **3** against bacterial biofilms of *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11. Results for antibiofilm effect (left) are expressed as effective concentration to inhibit 50% of biofilm formation (EC₅₀) in micromoles/L (μmol l⁻¹), and data represent means ± standard deviations values from three independent experiments. effects of compounds **3** at a concentration of 100 μmol l⁻¹ on viability of the 3 strains are expressed as % of viable bacteria when compared to an untreated sample with 100% of viability (right)

antibiofilm effect		viability at concentrations of 100 μmol l ⁻¹	
EC ₅₀ (μmol l ⁻¹)		on TC4, TC10 and TC11	
TC4	117,4 ± 29,9	<p>toxicity of compound 3</p> <p>viability at 100 μmol l⁻¹ (%)</p> <p>TC4 TC10 TC11</p> <p>bacterial strains</p>	
TC10	104,2 ± 11,2		
TC11	77,4 ± 18,8		

Figure S2: Biovolumes measured at 24h of each strain in the three species biofilms compared to when cultivated alone. Results report the untreated samples (black) and samples treated with compound 3 at $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ (grey). All values are the mean of three replicates.



MONO : biovolume of the monospecific biofilm

MULTI : biovolume of the adequate bacterial strains in the multispecific biofilm

Figure S3 : Flux cytometry monitoring of a sample of sea water over 100h showing the composition of pico-nano-phytoplankton organisms (right) for three tested conditions : a control sample composed of seawater, a reference sample with 2% of DMSO, a seawater sample treated with $75 \mu\text{mol l}^{-1}$ of compound 3 solubilized with 2% of DMSO. From left to right : Composition of the pico-nano-phytocommunity at t_0 for all conditions (B) Composition of the pico-nano-phytocommunity at t_{96H} in seawater controls, (C) Composition of the pico-nano-phytocommunity at t_{96H} in DMSO controls and (D) Composition of the pico-nano-phytocommunity at t_{96H} with compound 3.

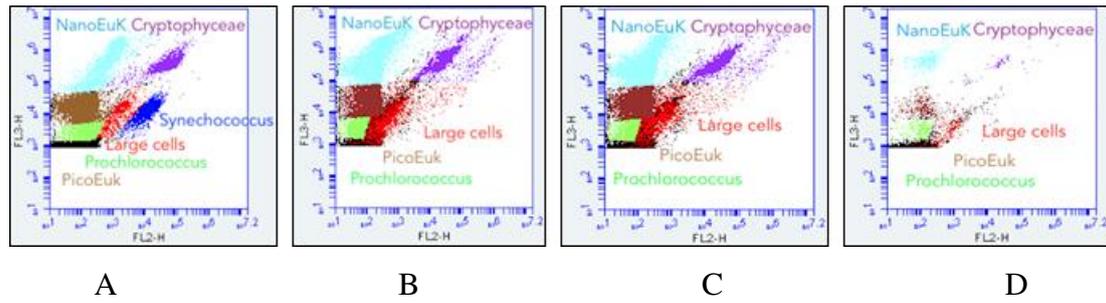
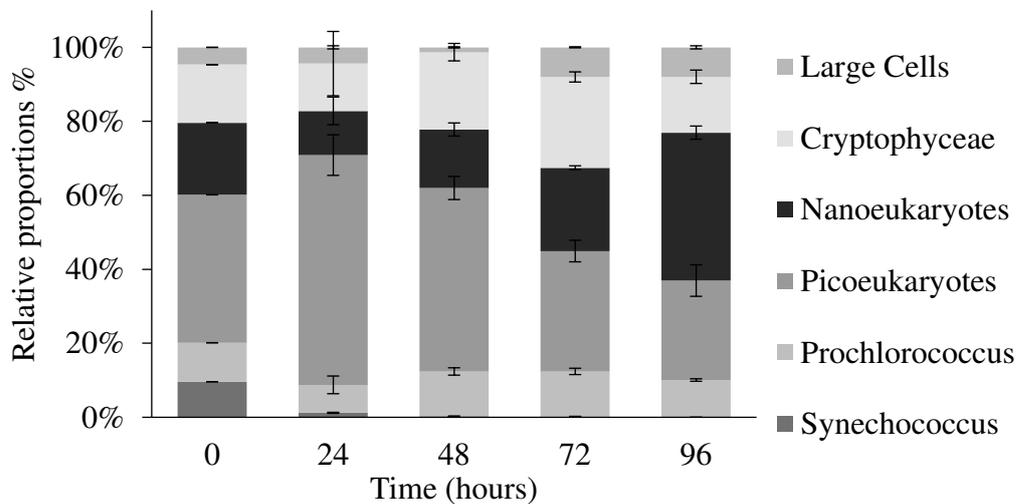
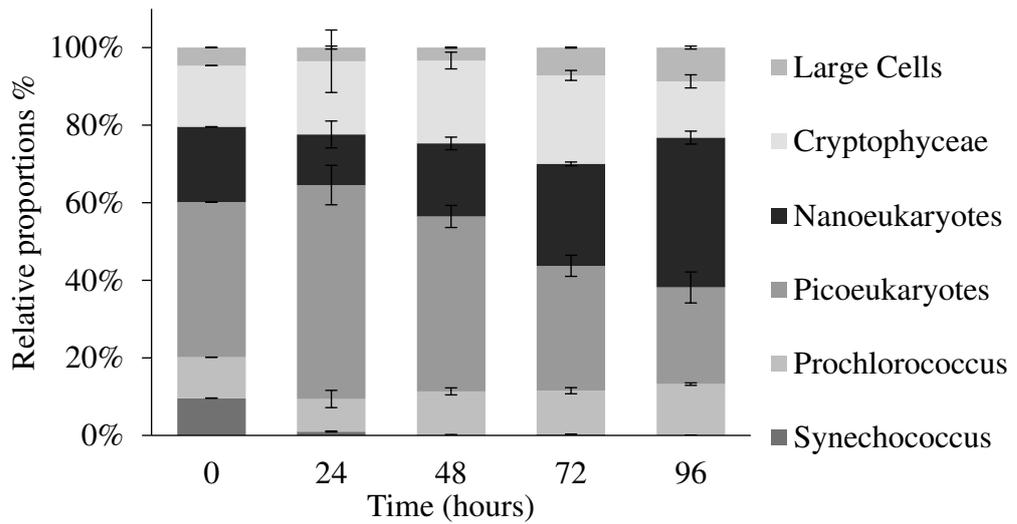
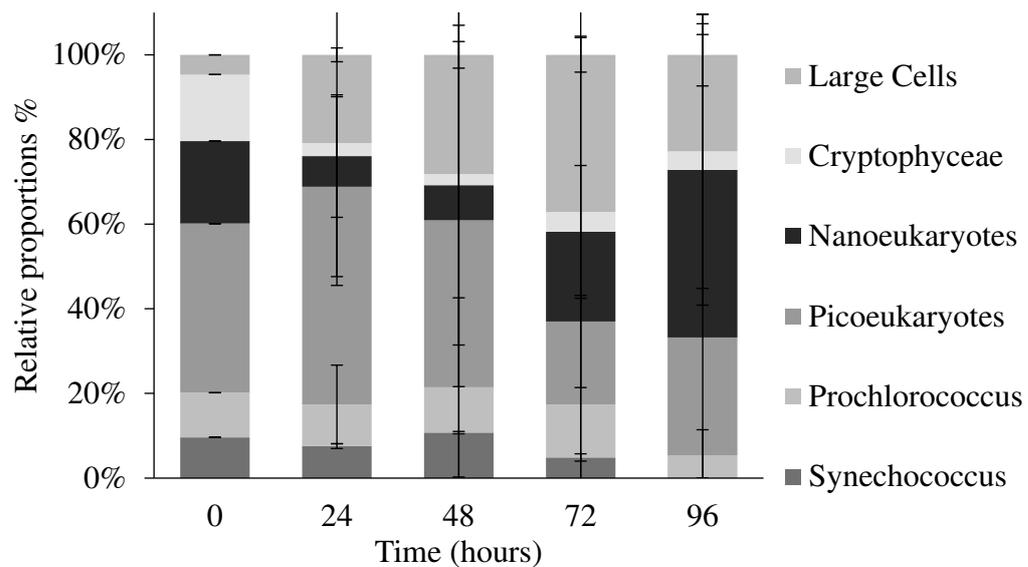


Figure S4 : Relative abundances of the different sub-communities studied over time obtained through flux cytometry monitoring of a sample of sea water over 96 h for three tested conditions : a control sample composed of seawater (up) , a reference sample with 2% of DMSO (middle), a seawater sample treated with 75 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of compound **3** solubilized with 2% of DMSO (down). All values are the mean of three replicates.





Conclusion

Cette première partie de travaux visait tout d'abord à évaluer l'impact de la réduction de la longueur de la chaîne carbonée de la région « est » des analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole sur l'activité anti-adhésion. Elle a également permis d'évaluer la capacité de ces composés à inhiber la formation d'un biofilm multi-souches et enfin, leur toxicité sur organismes planctoniques. Les essais biologiques réalisés sur les composés obtenus ont permis d'approfondir la connaissance des activités anti-biofilm des hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole.

La réduction de la longueur de la chaîne carbonée permet de conserver une activité anti-biofilm, puisque les composés **2** et **3** présentent tous les deux une activité anti-adhésion (CE_{50} de 75,9 μM sur 4M6, 105,8 μM sur TC8 et 70,1 μM sur TC14 pour le composé **2** avec $n = 0$; 33,1 μM sur 4M6, 66,4 μM sur TC8 et 63,8 μM sur TC14 pour le composé **3**, avec $n = 1$). Cependant, le composé **4**, avec $n = 1$ mais avec une région « est » hyperbromée s'avère moins actif que son équivalent sans atomes de brome au niveau de cette région (CE_{50} de 137,4 μM sur 4M6, 190,5 μM sur TC8 et >200 μM sur TC14). Ce résultat est différent de ce qui avait été noté précédemment avec une région « ouest » à deux méthylènes. En effet, dans ce cas de figure, le dérivé à deux atomes de brome était le plus actif.

La molécule **3** qui est ainsi apparue comme étant la plus active, s'est également révélée apte à inhiber la formation d'un biofilm par les souches TC4 (CE_{50} de 119,2 μM) TC10 (86,2 μM) et TC11 (85 μM) isolées. Si les méthodes utilisées jusque-là ont permis de montrer que ces analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole sont capables d'inhiber la formation d'un biofilm, il est apparu opportun de mettre en œuvre des méthodes *in vitro* se rapprochant des conditions naturelles, notamment d'un point de vue bactériologique. Pouvoir reproduire des biofilms multisouches, les visualiser et évaluer l'impact de composés antibiofilm pourrait s'avérer opportun dans cette perspective. En effet, les interactions entre souches différentes sont complexes et variables, parfois antagonistes, parfois à type de coopération. C'est le cas ainsi des souches TC4, TC11 et TC10-pX5-GFP. Comme cela avait déjà été montré par Guilloneau, les biovolumes respectifs de ces 3 souches sont plus importants lorsqu'elles forment un biofilm multisouche que lorsqu'elles forment un biofilm mono spécifique (0,35 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ contre 0,07 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour TC4, 0,45 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ 0,26 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour TC11 et 0,29 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ contre 0,09 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour TC10-pX5-GFP). Ce biofilm multi-souche s'avère ainsi être un modèle intéressant d'étude pour la capacité de composés à activité anti-biofilm. Et l'application de ces techniques a permis de mettre en évidence la capacité du composé **3** à inhiber la formation de

ce biofilm multi-souche. En effet, le biovolume bactérien total de ce biofilm, de $1,09 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sans inhibiteur était de $0,19 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ en présence du composé **3**. Ces résultats permettent de montrer que cette méthode est utilisable pour évaluer *in vitro* l'activité anti-biofilm de composés. Et ils mettent en évidence le fait que ces analogues d'hémibastadines conservent leurs propriétés même en milieu polymicrobien, donc proche des conditions environnementales.

Comme précédemment établi, ces nouveaux analogues d'hémibastadine ne présentent pas de toxicité pour les bactéries marines étudiées. Ce résultat montre d'une part que ces composés présentent une activité anti-biofilm stricte, mais également qu'ils ne perturberaient pas l'environnement bactérien en cas d'utilisation. Il fallait cependant pouvoir établir quel pourrait être leur effet sur d'autres populations biologiques marines, notamment le plancton. En appliquant les méthodes de suivi de populations planctoniques (phyto et zooplancton), il a été possible d'évaluer cet effet. Cependant, le composé **3** s'est avéré toxique pour ces organismes. Toutefois, cela a été établi à une concentration fixe de $100 \mu\text{M}$. Une étude plus poussée, avec des concentrations variables permettrait de déterminer des doses létales 50 % (DL_{50}) pour chacun des organismes considérés et de comparer celles-ci à la CE_{50} .

En résumé, ces travaux ont permis d'approfondir les travaux menés sur les analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole. Ils ont ainsi permis de mettre en évidence l'étendue des activités de ces composés, et que les variations de structures, notamment au niveau de la région « est », peuvent permettre d'obtenir une augmentation de l'activité. Il était donc opportun d'approfondir les variations de structures afin de pouvoir rechercher les meilleurs profils pour obtenir une activité optimale et établir *in fine* des relations structure-activité les plus complètes possibles.

III- Approfondissement des variations de structures des hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole et activité anti-biofilm

Introduction

Dans le but de développer des molécules à propriété anti-biofilm spécifique, dépourvue de toxicité, des travaux portant sur des analogues de produits naturels marins de type hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole ont été menés. Ceux-ci ont permis de mettre en évidence l'intérêt de ces molécules, aptes à inhiber la formation de biofilm de bactéries marines même avec plusieurs souches bactériennes différentes. Tous ces résultats ont été obtenus sans effet toxique sur la croissance et la viabilité des microorganismes concernés. Toutefois, des tests ont montré une possible toxicité pour le zoo et le phytoplancton. La réalisation de variations de structures approfondies permettrait d'obtenir à activité antifouling améliorée. Elle permettrait ainsi d'avoir la possibilité de les utiliser à des concentrations faibles, potentiellement peu toxiques pour les organismes marins.

Les travaux précédents ont permis de mettre en évidence les éléments suivants

- En région « ouest », la longueur optimale semble être de 2 méthylènes avec un noyau aromatique méthoxylé en para de la chaîne carbonée et un seul atome de brome en position 3
- Avec une telle région « ouest », les deux molécules les plus performantes étaient soit celle avec un seul méthylène en région « est » mais sans atome de brome, ou 2 méthylènes et 2 atomes de brome (10,182).

Ces résultats obtenus avec des analogues d'hémibastadines, complètent ceux obtenus avec divers autres analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazole. Ceux-ci avaient montré l'intérêt d'une O-alkylation au moyen d'un chaîne N,N-diméthyléthylamine. Aussi bien sur des analogues de moloka'iamines à noyau 1,2,3-triazole que sur des bis-triazoles analogues de psammaplin A, une réduction significative des CE₅₀ était notée. Ainsi, des analogues de moloka'iamines à activité faible (CE₅₀>200 µM sur toutes les souches testées) ont vu leur CE₅₀ atteindre des valeurs de l'ordre de 19,6 µM (4M6) ou 36,8 µM (TC14) ou 60,7 µM (TC8) après une telle variation de structure (175). Dans le cas des composés de type bis-triazole, les composés les plus actifs présentaient des CE₅₀ proches de celles du TBTO, de l'ordre de 0,5 µM, avec toutefois un effet toxique sur les bactéries marines, moindre que celui du composé de référence (176).

En se basant sur ces résultats préliminaires, des études approfondies de relations structure-activités en série des hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole ont été entreprises, visant à obtenir des molécules à activité anti-biofilm spécifique sont nécessaires. Les variations de structures entreprises pour cela sont décrites dans la figure 38.

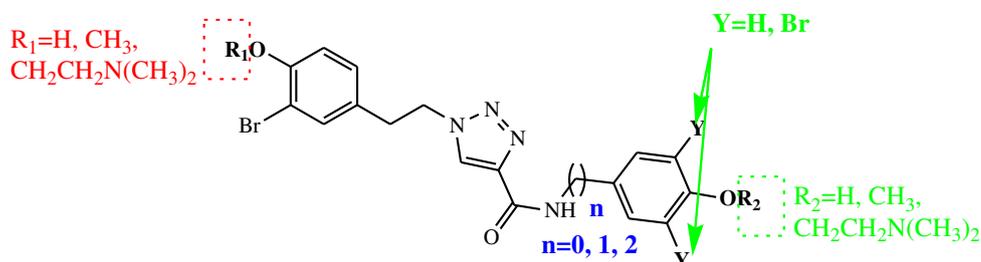


Figure 38: variations de structures entreprises pour l'étude des relations structure-activités des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole

Les études visent à évaluer l'impact des variations de structures suivantes

- Réduction de la longueur de la chaîne carbonée de la région « est »
- Remplacement d'une fonction méthoxy par une fonction hydroxy et vice-versa
- Bromation du noyau aromatique de la région « est »
- O-alkylation avec des chaînes N,N-diméthyléthylamine

Comme précédemment, les tests décrits dans cette partie des travaux ont d'abord consisté à évaluer les composés sur les souches TC8, TC14 et 4M6 en termes d'activité antibiofilm. Ensuite, l'activité antibactérienne de ces composés a été déterminée et enfin, la capacité des composés les plus actifs à inhiber un biofilm multi-souches a été évaluée.

III-1 Résultats

III-1-1 Analogues synthétisés

Cette seconde série est constituée de 13 composés dont les caractéristiques structurales sont détaillées dans le tableau 1. Les composés ont été synthétisés selon les méthodes de couplage peptidique et d'alkylation décrites plus haut.

Tableau 6: analogues d'hémibastadines obtenus

n	R ₁	R ₂	Y	Composé (rdt)*	Log P
0	H	CH ₃	H	5a (73%)	3,53
0	CH ₃	CH ₃	H	5b (49%)	3,79
0	CH ₃	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	H	5c (92%)	3,79
0	H	H	H	5d (68%)	3,27
1	H	CH ₃	H	5e (78%)	3,6
1	CH ₃	CH ₃	H	5f (85%)	3,86
1	CH ₃	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	H	5g (95%)	3,86
1	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	CH ₃	H	5h (93%)	3,86
1	H	H	H	5i (57%)	3,34
1	H	H	Br	5j (85%)	4,99
2	H	CH ₃	H	5k (79%)	3,88
2	H	H	Br	5l (88%)	5,27
2	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	H	5m (89%)	4,14

* les rendements sont ceux obtenus après l'étape finale de couplage peptidique, sauf dans le cas des composés **5c**, **5g**, **5h** et **5m** où il s'agit des résultats de la O-alkylation des analogues d'hémibastadines correspondantes.

Ces molécules se distinguent par la longueur de leur chaîne carbonée en région « est », mais peuvent également être classées en fonction du type de substitution des OH phénoliques.

On note ainsi :

- Deux composés à fonction méthoxy en région est et ouest : **5b** et **5f**
- Trois composés à fonction OH phénolique en région ouest et méthoxy en région est : **5a**, **5e** et **5k**
- Quatre composés à fonction OH phénolique en région est et ouest (les **5d**, **5i**, **5j** et **5l**) dont 2 à région ouest dibromée (**5j** et **5l**)
- Quatre composés à chaînes N,N-diméthyléthylamine (**5c**, **5g**, **5h**, **5m**)

III-1-2 Essais biologiques anti-adhésion

Les activités anti-adhésion sont résumées dans le tableau 7, qui donne les moyennes et les écart-types des pourcentages d'adhésion à 200 μM et des CE_{50} (exprimées en $\mu\text{mol.L}^{-1}$) de chaque composé.

Tableau 7: activités anti-adhésion des composés évalués

Composé	TC8		TC14		4M6	
	% d'adh.	CE_{50}	% d'adh.	CE_{50}	% d'adh.	CE_{50}
5a	60,0 \pm 14,4	>200	34,3 \pm 3,3	65,2 \pm 0,9	67,9 \pm 5,9	>200
5b	>75%	-	>75%	-	>75%	-
5c	49,7 \pm 12,1	>200	42,8 \pm 6,7	135,1 \pm 9,0	29,9 \pm 3,5	105,4 \pm 18,7
5d	68,7 \pm 10,7	>200	22,9 \pm 16,1	90,6 \pm 35,9	32,6 \pm 0,7	81,9 \pm 17,4
5e	55,5 \pm 6,7	>200	32,3 \pm 8,2	88,2 \pm 11,7	44,2 \pm 2,3	174,3 \pm 18
5f	>75%	-	>75%	-	>75%	-
5g	>75%	-	41,8 \pm 33,8	121,7 \pm 14	67,8 \pm 10,9	>200
5h	>75%	-	33,8 \pm 1,1	115,2 \pm 26,7	63,1 \pm 9,7	>200
5i	65,2 \pm 5,3	>200	39,7 \pm 2,5	156,0 \pm 15,1	66,2 \pm 5,3	>200
5j	14,1 \pm 11,7	91,5 \pm 27,1	15,1 \pm 1,4	32,4 \pm 1,4	6,4 \pm 2,8	27,1 \pm 14,9
5k	49,9 \pm 4,9	188,7 \pm 26,5	38,8 \pm 15,2	122,1 \pm 51,3	36,1 \pm 15	161,9 \pm 38,8
5l	36,3 \pm 8,8	131,7 \pm 34,1	19,7 \pm 11,6	28,6 \pm 7,8	11,8 \pm 2,6	28,8 \pm 8,3
5m	>75%	-	>75%		>75%	

% d'adh. correspond au pourcentage d'adhésion à 200 μM . Les CE_{50} sont exprimées en $\mu\text{mol.l}^{-1}$

L'analyse de ces résultats permet de mettre en évidence les éléments suivants :

- Les activités sont variables selon le microorganisme
- La souche TC8 est celle sur lesquelles les composés ont les CE_{50} les plus élevées.
- Seules les molécules **5a**, **5c**, **5d**, **5e**, **5j**, **5k** et **5l** présentent une activité anti-adhésion sur cette souche à 200 μM . Cependant, ce sont uniquement les composés **5j**, **5k** et **5l** qui présentent une $\text{CE}_{50} < 200\mu\text{M}$.
- Les molécules **5b**, **5f** et **5m** sont inactives quel que soit le microorganisme.
- Les composés les plus actifs sur toutes les bactéries sont les **5j** et **5l**. Ces deux molécules ont donc été sélectionnées pour la suite des tests.

III-2-2-2 Effet sur la croissance et la viabilité des bactéries

Afin de déterminer si l'activité est liée à un effet sur la viabilité des bactéries, l'effet des deux molécules sur la croissance des bactéries cibles a été mesurée en comparaison à l'éthanol. La figure 39 présente les courbes de croissance des souches en présence des composés.

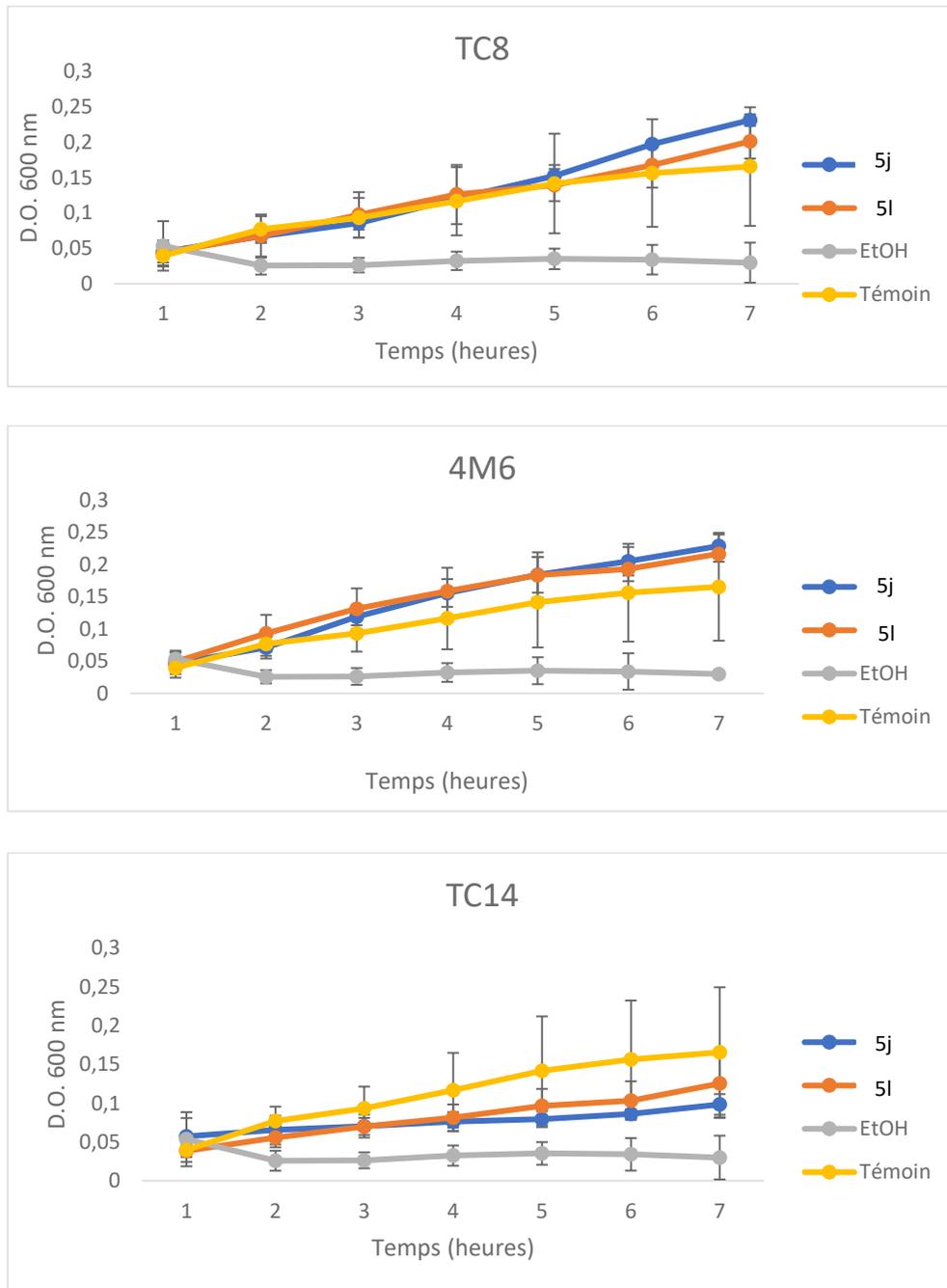


Figure 39: courbes de croissance des bactéries en présence des composés Sélectionnés

Ces courbes permettent de constater que les 2 composés agissent faiblement sur la croissance des souches modèles sélectionnées, sauf sur la souche TC14.

La figure 40 présente le pourcentage de viabilité des 3 souches modèles comparativement à un témoin non traité, l'éthanol servant de référence négative.

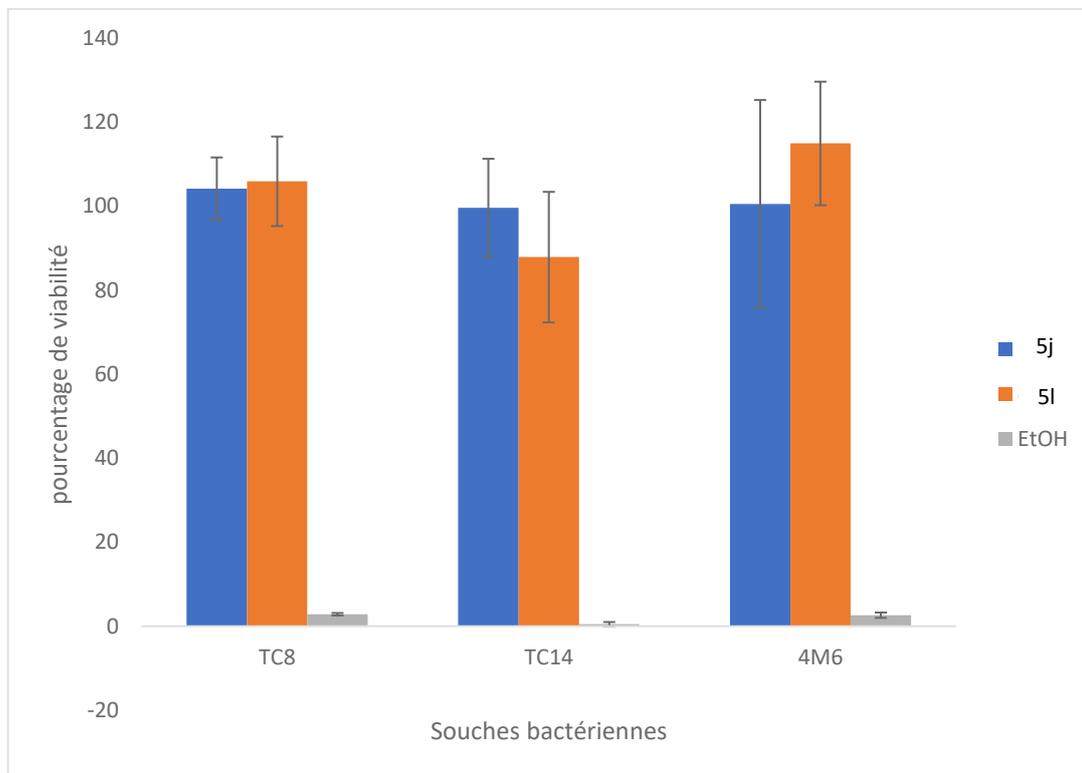


Figure 40: pourcentage de viabilité des différentes souches bactériennes en présence des molécules sélectionnées et d'éthanol à 50%

Comme cela avait été noté avec les courbes de croissance, la viabilité de la souche TC14 subit un léger impact des composés évalués, sur le **5l** (87,9% de viabilité). Mais les souches restent généralement viables en présence de ces composés.

Ces deux figures permettent de montrer que les composés **5l** et **5j** n'ont quasiment pas d'effet sur la croissance et la viabilité des bactéries concernées.

III-2-2-3 Activité sur biofilm multisouche

Cette activité a été évaluée sur les souches TC4, TC11 et TC10-px5-GFP. Au préalable, l'activité anti-adhésion des composés **5j** et **5l** a été évaluée sur les 3 souches bactériennes.

Tableau 8: activités anti-adhésion des composés **5j** et **5l** sur les souches TC4, TC11 et TC10-pX5-GFP

Composé	TC4		TC11		TC10-px5-GFP	
	% d'adh.	CE ₅₀	% d'adh.	CE ₅₀	% d'adh.	CE ₅₀
5j	53,9 ± 21,5	153,4 ± 12,1	24,5 ± 16,6	53,7 ± 27,4	41,1 ± 16,4	156,6 ± 8,3
5l	16,3 ± 2,7	78,1 ± 15,9	16,6 ± 6,1	21,7 ± 2,5	24,5 ± 4,9	145,2 ± 9,8

% d'adh. correspond au pourcentage d'adhésion à 200 µM. Les CE₅₀ sont exprimées en µmol.l⁻¹

Ces deux composés, actifs sur les souches TC8, TC14 et 4M6 le sont également sur les souches TC4, TC11 et TC10-px5-GFP prises isolément. Des essais sur la croissance et la viabilité de ces souches sont nécessaires pour déterminer si cet effet est strictement anti-biofilm comme précédemment ou s'il est dû à un effet toxique sur les souches.

La figure 41 présente la courbe de croissance de ces souches en présence des composés.

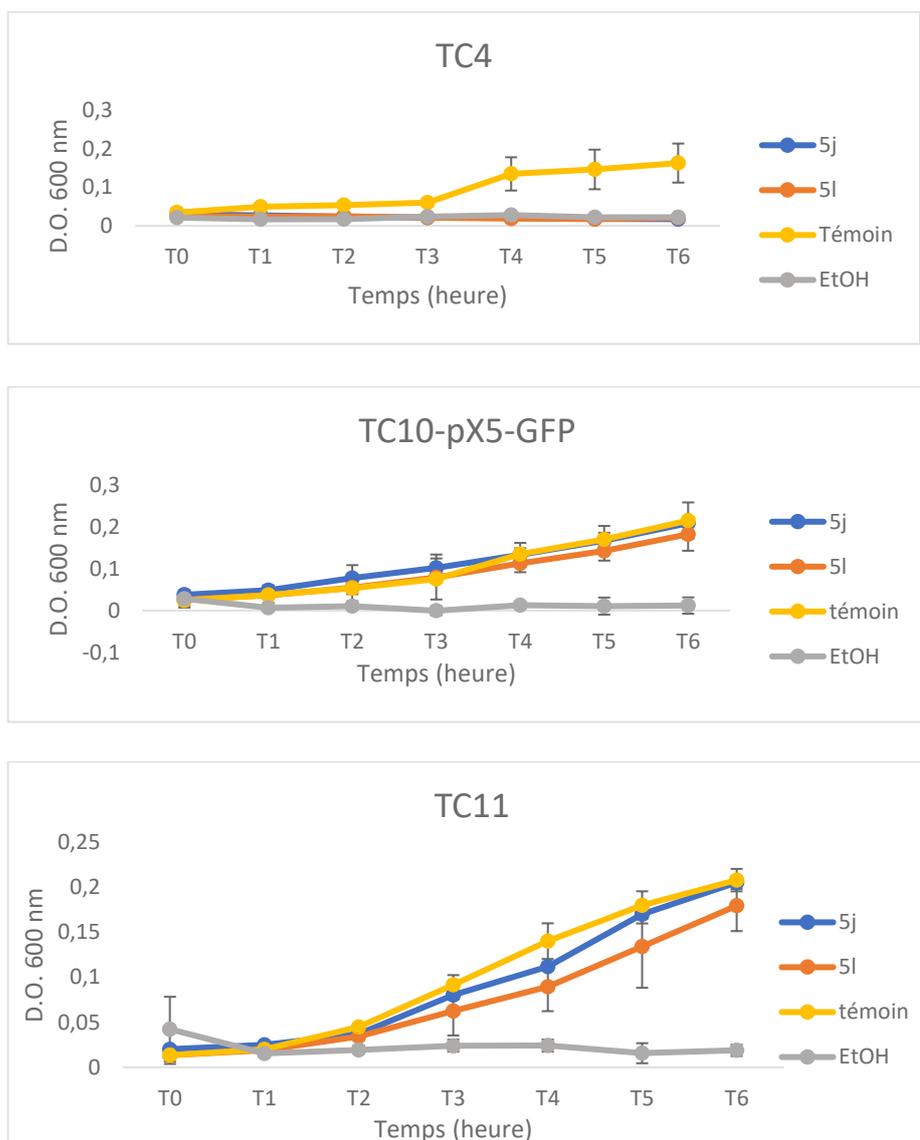


Figure 41: courbes de croissances des souches TC4, TC11 et TC10-pX5-GFP composés 5j et 5l en comparaison à un témoin sans composé et à l'éthanol

Ces courbes de croissance montrent que les deux composés **5j** et **5l** perturbent la croissance de la souche TC4, conduisant à un effet comparable à celui observé avec l'éthanol. En revanche, les deux autres souches ne voient pas leur croissance perturbée par ces analogues d'hémibastadine.

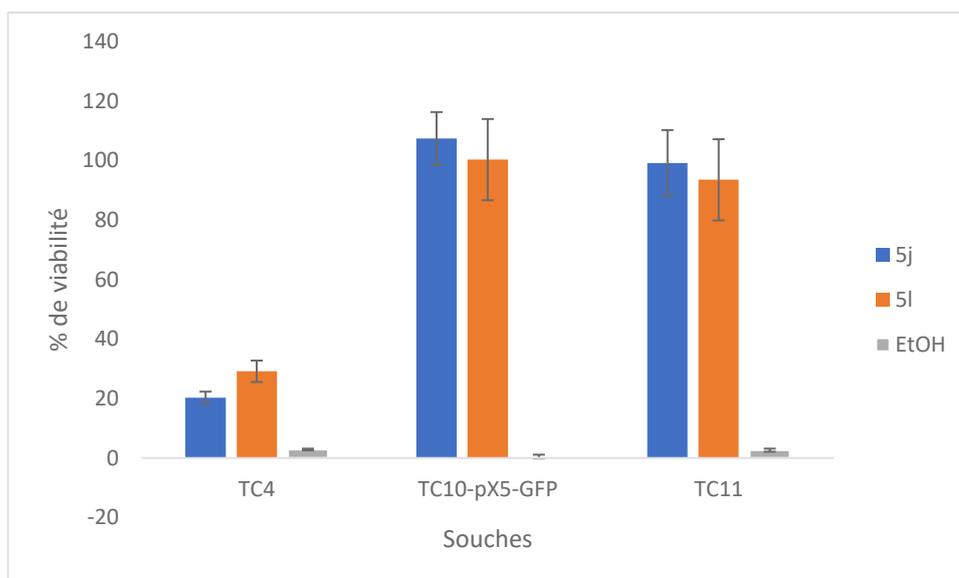


Figure 42: pourcentages de viabilité des souches bactériennes en présence des analogues d'hémibastadines

Conformément à ce qui a été constaté avec les courbes de croissances, les composés **5j** et **5l** présentent un effet toxique sur la souche TC4, mais pas sur les deux autres souches bactériennes.

Il apparaît ainsi que la souche TC4 a sa viabilité affectée par la présence de ces deux composés. L'effet d'inhibition de l'adhésion observé pourrait donc être lié à un effet anti-biofilm strict, mais également à une activité antibactérienne sur cette souche. Dans le cas des deux autres par contre, l'activité semble bien strictement anti-biofilm, comme observé jusque-là avec les autres composés de cette famille sur les autres souches.

Les résultats démontrant l'effet anti-adhésion de ces composés, des essais sur biofilm multi-souches ont donc pu être réalisés.

La figure 43 permet d'observer les biofilms formés par les souches TC4, TC11 et TC10-px5-GFP sans composés et avec une concentration de 100 μ M des analogues d'hémibastadine **5j** et **5l**.

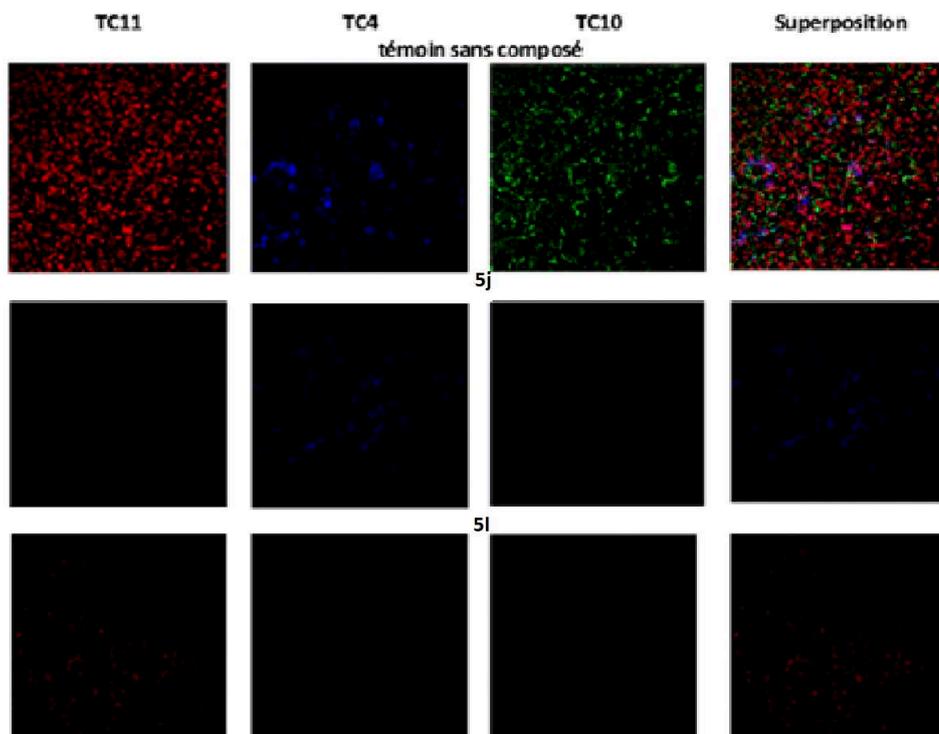


Figure 43: image par microscopie confocale des biofilms multiscouches de TC4, TC11 et TC10-PX5-GFP sans composé et avec les composés **5j** et **5l**

Les images semblent laisser apparaître une quasi-absence de bactéries en présence des analogues d'hémibastadines, comparativement aux échantillons sans composé. Ces éléments sont confirmés par les données chiffrées obtenues par extraction des biovolumes bactériens, présentés dans la figure 41.

La figure 44 présente les biovolumes comparés obtenus après extraction des images.

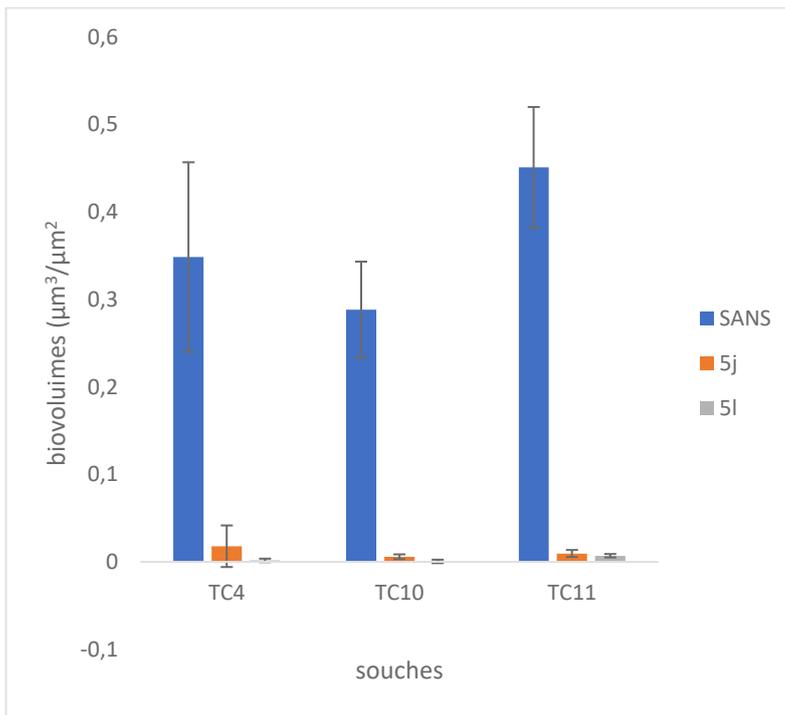


Figure 44: biovolumes comparés des souches TC4, TC10-pX5-GFP et TC11 sans ajout de composés anti-biofilm et avec l'ajout des molécules **5j** et **5I**

En l'absence de composés, les biovolumes moyens calculés ($0,35 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2 \pm 0,11$ pour TC4, $0,29 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour TC10-pX5-GFP et $0,45 \pm 0,07 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour TC11) sont beaucoup plus importants que ceux obtenus en présence des analogues **5j** ($0,02 \pm 0,02 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ avec TC4 ; $0,01 \pm 0,002 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ avec TC10 et $0,01 \pm 0,001 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ avec TC11) et **5I** ($0,01 \pm 0,01 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour TC4 ; 0 pour TC10-pX5-GFP, $0,01 \pm 0,01 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour TC11). Ces résultats confirment ce qui a été observé.

III-3 Discussion

Ce travail ayant pour but d'aboutir à des composés à visée anti-biofilm a consisté à approfondir les études de relation structures-activités d'analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole. Ces composés sont facilement accessibles par réaction de chimie click suivie d'un couplage peptidique (10,182). L'application de ces méthodes a permis de proposer une série de composés permettant de compléter la librairie d'analogues de bromotyrosines à noyau 1,2,3-triazole déjà disponibles.

Les tests d'activité menés sur les trois souches bactériennes modèles ont permis de montrer une variabilité en termes d'activité anti-biofilm. La souche TC14 est la souche la plus sensible à l'action anti-adhésion de ces composés, pour ceux qui sont actifs. Seuls quatre composés présentent des $CE_{50} > 200 \mu\text{M}$ sur cette souche. Sept étaient inactifs sur 4M6. La souche TC8 est la moins sensible à l'action de ces composés, seulement trois composés sont actifs sur cette souche. Les CE_{50} étaient également plus élevées sur cette dernière souche même pour les composés actifs. Ces résultats sont superposables à ceux déjà enregistrés lors des précédents travaux menés sur analogues d'hémibastadine et dérivés à noyau 1,2,3-triazole et à région « est » fixe à deux méthylènes (10). En effet, les bio-essais avaient montré que si tous les composés synthétisés étaient actifs sur les trois souches tests, les CE_{50} variaient de 8,8 μM à 72,9 μM sur TC14 alors qu'ils étaient compris entre 67,8 et 170,5 μM sur TC8 et 40,7 et 195,6 μM sur 4M6. Lorsqu'il s'est agi d'analogues de cinnamides, ces composés n'étaient actifs quasi exclusivement que sur la souche TC14 (183). Les analogues d'hémibastadines et leurs dérivés de type analogue de cinnamides semblent être particulièrement actifs sur cette souche TC14. La variation de structures des composés permet cependant d'étendre le spectre d'activité anti-biofilm.

Les composés les plus actifs sont ceux avec le plus d'atomes de brome (**5j** et **5l**). Leurs activités respectives sur les trois souches bactériennes tests (pour **5j** : 91,5 μM sur TC8, 32,4 μM sur TC14 ; 27,1 μM sur 4M6 ; **5l** 131,7 μM sur TC8, 28,6 μM sur TC14 et 28,8 sur 4M6) sont comparables à celles préalablement rencontrées avec les analogues d'hémibastadine les plus performantes. L'analogue d'hémibastadine développée la plus active développée par Andjouh présente en effet les CE_{50} suivantes : 67,8 sur TC8, 8,8 μM sur TC14 ; et 40,7 sur 4M6. Celle développée au chapitre précédent par contre avait les CE_{50} suivantes : 66,4 μM sur TC8, 63,8 sur TC14 et 33,1 μM sur 4M6. Il apparait donc que ces 4 molécules sont les plus performantes, mais l'ordre varie en fonction de la souche.

Comme cela avait déjà été mis en évidence, ces composés ne perturbent ni la croissance ni la viabilité des bactéries, mettant en évidence une activité anti-biofilm stricte.

Les différences d'activité en fonction de la souche bactérienne se sont confirmées en comparant l'activité de ces molécules sur les souches TC4, TC10-pX5-GFP et TC11. En effet, si le composé **5j** est plus performant que la **5i** en termes de CE₅₀ sur les 3 souches bactériennes utilisées pour la première étape de criblage, la seconde avait des CE₅₀ plus basses sur ces trois dernières souches. Mais dans le cas spécifique de la souche TC4, il semble que les composés perturbent la croissance et la viabilité de cette souche. L'effet pourrait donc dans ce cas précis être dû à une activité antibactérienne, en-dehors ou en plus de son activité anti-biofilm stricte.

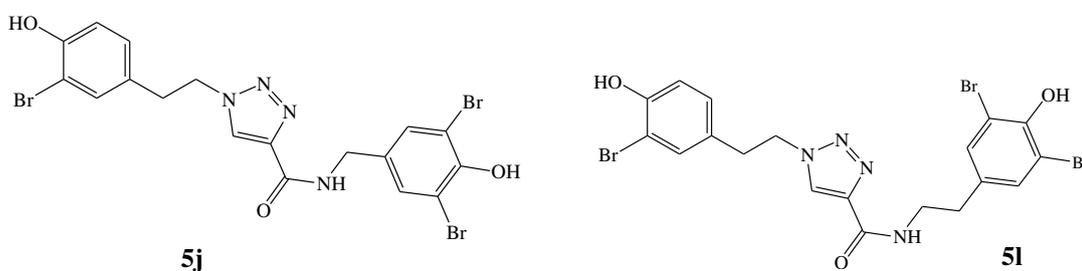
A la concentration de 100 μM , ces deux molécules possèdent une activité anti-biofilm quasi-identique, avec une biomasse pratiquement nulle. Ces résultats sont plus importants que ceux obtenus avec le composé **3**, qui possède un groupement méthoxyle en région « ouest » et un seul méthylène en région « est », sans atomes de bromes (TC4 0,03 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, TC11 0,13 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$; TC10 0,01 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). Ces composés, plus performants en anti-adhésion sur souche isolée, le sont également sur biofilm multisouche. Ces deux molécules se sont montrées capables d'inhiber la formation d'un biofilm constitué de ces trois souches.

Conclusion

Du fait des données ayant démontré l'activité d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole sur biofilms bactériens, y compris multisouches, un approfondissement des variations de structure a été entrepris. Le but était une potentialisation de l'effet inhibiteur de formation de biofilm. Pour cela, tout en conservant une longueur de chaîne à 2 atomes de carbone en région « ouest » et avec un seul atome de brome sur son noyau aromatique, les modulations ont porté sur les éléments suivants

- O-alkylation ou non des OH phénoliques des noyaux aromatiques,
- Variation de la longueur de chaîne carbonée de la région « est »
- Bromation ou non du noyau aromatique de la région « est »

Les composés obtenus ayant été évalués, deux se sont avérés les plus efficaces en termes d'activité inhibitrice de la formation de biofilm : la **5j** (CE₅₀ respectivement de 91,5±27,1 µM sur TC8, 27,1±14,9 µM sur TC14 et de 32,4±1,4 µM sur 4M6) et la **5l** (CE₅₀ de 131,7 ± 34,1 µM sur TC8, de 28,6 ± 7,8 sur TC14 et de 28,8 ± 8,3 sur 4M6). Comme les autres analogues d'hémibastadines précédemment évalués, ces composés ne présentent pas d'activité antibactérienne sur ces souches. Ils sont également aptes à inhiber la formation d'un biofilm constitué de trois souches de bactéries marines.



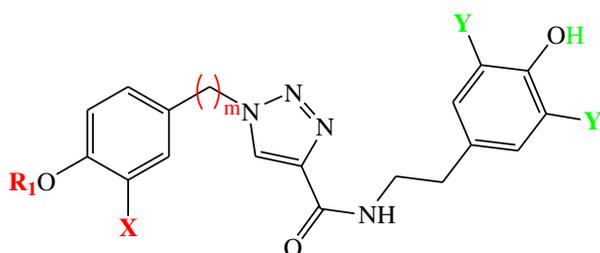
Avec cette dernière série de composés il devient possible de compléter la bibliothèque d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole, permettant ainsi d'envisager un approfondissement des études de relations structure-activités anti-biofilm dans cette série de composés.

IV- Analyse des relations structure-activités des analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole et dérivés

Introduction

Au cours de ces travaux, des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole ont été synthétisés et évalués. Les activités anti-biofilms obtenues lors des tests viennent confirmer l'intérêt de ces composés pour une possible utilisation comme antifouling. Ils viennent surtout compléter la librairie d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole à activité anti-biofilm déjà synthétisée et évaluée. Ainsi, une première série avait été mise au point par Andjouh (10). Leurs structures respectives sont décrites dans le tableau 9.

Tableau 9: analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole antérieurement synthétisés



R ₁	X	m	Y	Composés
CH ₃	Br	1	H	11a
CH ₃	Br	2	H	11b
H	Br	2	H	11c
H	H	2	H	11d
CH ₃	Br	1	Br	11e
CH ₃	Br	2	Br	11f
H	3,5-diBr	2	Br	11g

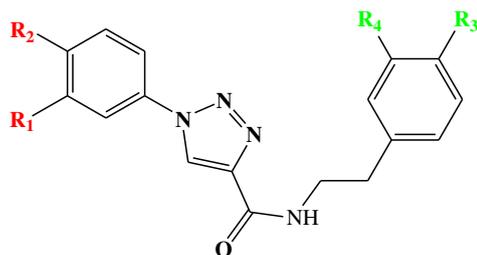
Le tableau 10 présentent leurs activités anti-adhésion

Tableau 10: activités anti-biofilm de la première série d'analogues d'hémibastadines (10)

Composés	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
11a	97,3 ± 16,7	134,2 ± 14,7	40,0 ± 6,2
11b	72,9 ± 4,8	104,4 ± 22,8	32,6 ± 10,2
11c	155,5 ± 21,2	113,2 ± 11,1	69,3 ± 19,4
11d	195,6 ± 22,0	170,5 ± 1,5	72,9 ± 11,5
11e	84,0 ± 23,2	123,6 ± 24,2	40,2 ± 1,6
11f	40,7 ± 10,6	67,8 ± 8,3	8,8 ± 2,3
11g	83,2 ± 8,9	96,0 ± 10,7	26,6 ± 7,8

Par ailleurs, des analogues de cinnamides à noyau 1,2,3-triazole ont également été évalués pour leurs capacités anti-biofilm (183). Ces composés présentent une analogie avec les hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole, en ce sens qu'ils correspondent à une élimination de la chaîne carbonée de la région « est ». Les composés évalués étaient dépourvus d'atomes de brome, tel que décrit dans le tableau 11.

Tableau 11: analogues de cinnamides à noyau 1,2,3-triazole évaluées



R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Composés
OCH ₃	H	OH	H	4
OCH ₃	H	H	OCH ₃	5
OCH ₃	H	OCH ₃	H	6
OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	7
H	OCH ₃	OH	H	8
H	OCH ₃	H	OCH ₃	9
H	OCH ₃	OCH ₃	H	10
H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	11

Les essais anti-adhésion des analogues de cinnamides ont permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: activités anti-adhésion d'analogues de cinnamides à noyau 1,2,-triazole

Composés	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
4	>200	>200	>200
5	>200	>200	80,6 ± 22,0
6	>200	>200	11,4 ± 1,0
7	153,5 ± 9,0	>200	73,7 ± 17,0
8	>200	>200	115,3 ± 25,0
9	>200	142,3 ± 0	52,3 ± 22,0
10	>200	>200	11,3 ± 7,0
11	162,5 ± 5	>200	54,6 ± 11,0

Ces composés, étaient actifs presque exclusivement sur TC14, assez peu sur les 2 autres souches modèles.

En combinant l'ensemble de ces données, complétées par les présents travaux, il est possible d'envisager une étude des relations structure-activité approfondies en série des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole.

IV-1 Méthode

IV-1-1 Variations de structures

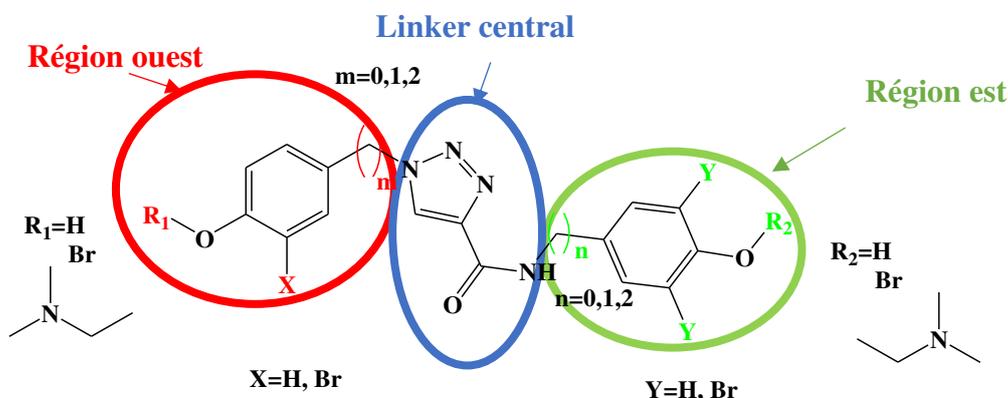


Figure 45: variations de structures étudiées pour l'établissement des relations structure-activités des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole

Les études ont consisté à évaluer l'impact des variations de structures suivantes :

- Réduction des longueurs de chaîne carbonée reliant les noyaux aromatiques au linker central.
- Modulations au niveau de l'hydroxyle phénolique : influence d'une O-méthylation ou d'une O-alkylation par une chaîne N,N -diméthyléthylamine
- Bromation des noyaux aromatiques

En outre, l'impact de la lipophilie sur l'activité a également été évalué, en se basant sur le calcul des LogP. Cette donnée a été calculée à l'aide du logiciel ChemDraw[®] Ultra de Cambridge Soft.

IV-1-2 Critères de comparaison

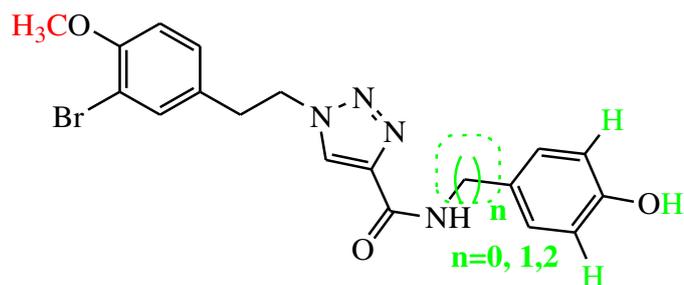
Les composés ont été comparés sur la base de leur activité anti-biofilm, quantifiée par leurs CE_{50} respectives sur les souches TC8, TC14 et 4M6.

IV-2 Analyse des relations structure-activités

IV-2-1 Présence d'un noyau aromatique à OH-phénolique et d'un méthoxyphényle

IV-2-1-1 Région « ouest » à noyau aromatique méthoxylé et OH-phénolique en région « est » ($R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$)

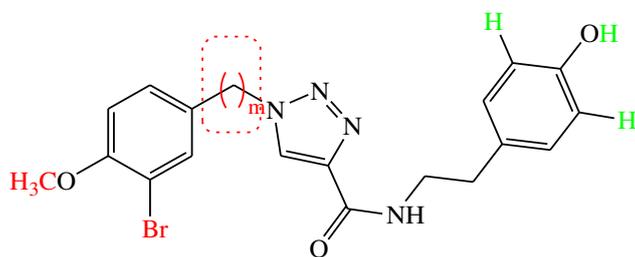
- $m = 2, n = 0, 1, 2$



Composés	n	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
2	0	75,9 ± 7,9	105,8 ± 32,8	70,1 ± 0,2
3	1	33,1 ± 13,5	66,4 ± 21,4	63,8 ± 13,0
11b	2	72,9 ± 4,8	104,4 ± 22,8	32,6 ± 10,2

Avec une longueur de chaîne fixe en région « ouest » à deux méthylènes, les composés sont actifs sur les trois souches tests. En considérant les CE₅₀, le composé le plus actif est celui avec $n = 1$, la seule exception étant la souche TC14 (**11b** possédant la plus faible CE₅₀ sur cette souche).

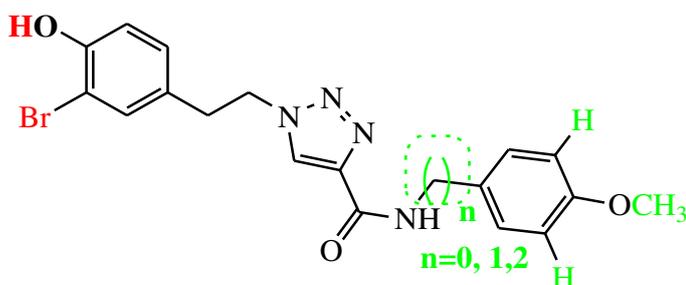
- **m= 1,2, n=2**



Composés	m	4M6(CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
11a	1	97,3 ± 16,7	134,2 ± 14,7	40,0 ± 6,2
11b	2	72,9 ± 4,8	104,4 ± 22,8	32,6 ± 10,2

La réduction de la longueur de chaîne carbonée sur la région « ouest », passant de deux à un atome de carbone se traduit par une CE₅₀ plus élevée sur les 3 bactéries modèles : CE₅₀ de 32,6 à 40 μM sur TC14, 104,4 μM à 134,2 μM sur TC8 et 72,9 à 97,3 μM sur 4M6. Ainsi, celle-ci est défavorable à l'action anti-biofilm.

IV-2-1-2 Région « ouest » à OH-phénolique et région « est » à noyau méthoxyphényle (**R₁=H, R₂=CH₃**)



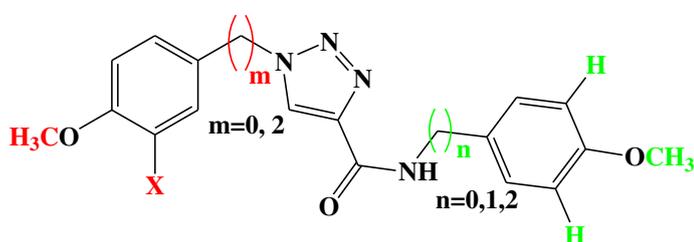
Composés	n	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
5a	0	> 200	> 200	60 ± 14,4
5e	1	174,3 ± 18	> 200	88,2 ± 11,7
5k	2	161,9 ± 38,8	188,7 ± 26,5	122,1 ± 51,3

Lorsque seul le phényle de la région « est » est de type méthoxyphényle, alors que celui de la région « ouest » porte un OH phénolique (composés **5a**, **5e** et **5k**), l'activité semble décroître avec la réduction de la longueur de la chaîne carbonée de la région « est ». Le composé

le plus actif est le **5k**. Ces composés sont toutefois moins actifs que ceux dont le groupement méthoxyle est en région « ouest ».

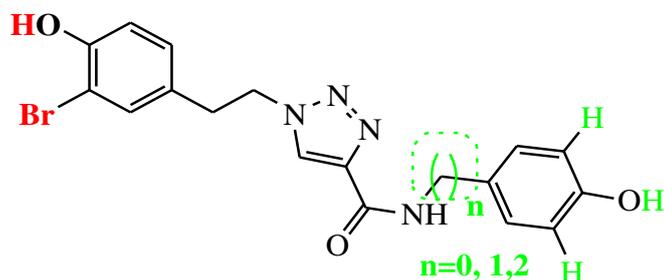
De ces différents résultats, il ressort que lorsqu'un seul des 2 noyaux aromatiques est de type para-méthoxyphényle (R_1 ou $R_2 = CH_3$), quelle que soit la région concernée, le nombre d'atomes de carbone qui le relie au linker central est de 2 atomes de carbone. La réduction du nombre de méthylènes se traduit par une diminution de l'activité anti-biofilm. Cela montre une relative symétrie et une équivalence autour du linker central. La présence de deux atomes de carbones pourrait donner une longueur de chaîne favorable pour un ancrage au récepteur moléculaire.

IV-2-2- Méthoxyphényle en régions « est » et « ouest »



Cette modulation se traduit par une perte d'activité anti-adhésion et ce, quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée. La seule exception est l'analogue de cinnamide **10**, mais qui s'est avéré actif uniquement sur la souche TC14 ($CE_{50} = 11,3 \mu M$) et inactif sur toutes les autres. La présence d'au moins OH-phénolique serait donc indispensable à l'ancrage des analogues d'hémibastadine à leur cible biologique.

IV-2-3 Présence d'OH phénoliques de part et d'autre du noyau 1,2,3 triazole

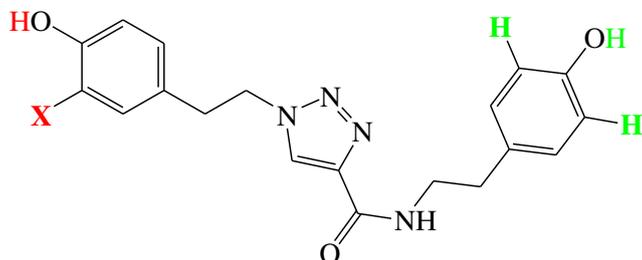


Composés	n	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
5d	0	81,9 ± 17,4	> 200	90,6 ± 35,9
5i	1	> 200	> 200	156,0 ± 15,1
11c	2	155,5 ± 21,2	113,2 ± 11,1	69,3 ± 19,4

Trois composés présentant cette structure et dépourvus d'atomes de brome en région « est » ont été évalués. Ils possèdent tous une région « ouest » de type 3-bromo-4-hydroxyphényl et se distinguent par la longueur de la chaîne carbonée en région « est » (0, 1, 2 méthylènes). Par ordre décroissant d'efficacité, les composés peuvent être classés ainsi : n = 2 > n = 0 > n = 1. Seul le composé à deux méthylènes (**11c**) est actif sur les trois bactéries modèles. Ils sont moins actifs que leurs équivalents à région ouest de type méthoxyphényl. En somme, la présence d'OH-phénoliques en région « est » et « ouest » se traduit par une réduction de l'activité anti-biofilm des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole, le composé le plus actif étant celui à région « est » de type tyramine (n = 2).

IV-2-4 Influence des atomes de brome

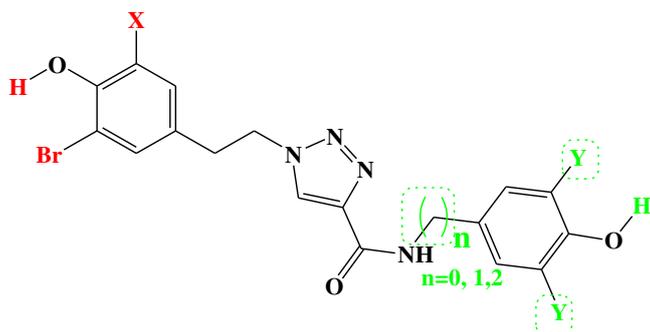
- **Y=H** : influence de la présence d'un atome de brome en région « ouest »



Composés	X	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
11c	Br	155,5 ± 21,2	113,2 ± 11,1	69,3 ± 19,4
11d	H	195,6 ± 22,0	170,5 ± 1,5	72,9 ± 11,5

La présence d'atomes de brome, sans être indispensable, semble être un facteur favorisant l'activité anti-biofilm. En effet, si le composé **11d**, dépourvu d'atomes de brome, possède quand même une activité anti-biofilm sur les 3 souches bactériennes (CE₅₀ de 72,9 μM sur TC14, 170,5 μM sur TC8 et 195,6 μM sur 4M6), ses chiffres étaient systématiquement plus élevés que son équivalent possédant un atome de brome **11c** (CE₅₀ de 69,3 μM sur TC14, 113,2 μM sur TC8, 155,5 μM sur 4M6). Il est à noter que si ce composé **11d** avait des CE₅₀ inférieures à 200 μM sur les trois souches bactériennes, ce n'était pas le cas des analogues de cinnamides. Dépourvus d'atomes de brome, un seul d'entre eux était actif sur les trois souches. Les autres n'étaient généralement actifs que sur la souche TC14.

- **Influence des atomes de brome en région « est »**
 - **Noyaux aromatiques à OH phénoliques R1=H**



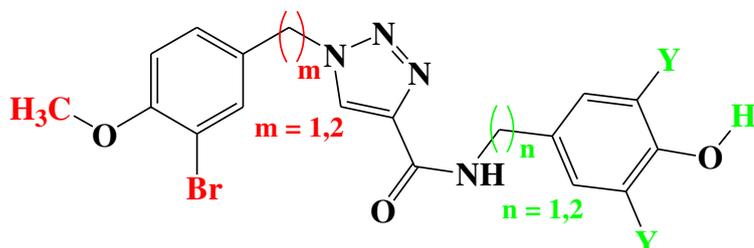
Composés	X	n	Y	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
5i	H	1	H	> 200	> 200	156 ± 15,1
5j	H	1	Br	27,1 ± 14,9	91,5 ± 27,1	32,4 ± 1,4
11c	H	2	H	155,5 ± 21,2	113,2 ± 11,1	69,3 ± 19,4
5l	H	2	Br	28,8 ± 8,3	131,7 ± 34,1	28,6 ± 7,8
11g	Br	2	Br	83,2 ± 8,9	96,0 ± 10,7	26,6 ± 7,8

La présence d'atomes de brome en région « est » semble être particulièrement favorable à l'activité anti-adhésion. En effet, les deux molécules concernées étaient les plus performantes, la bromation entraînant systématiquement une réduction des CE₅₀, qu'il y ait un ou deux méthylènes. Il apparaît également que la présence d'un 2^e atome de brome sur le noyau aromatique de la région « ouest » se traduisait par contre par un gain variable. Si sur TC8, la CE₅₀ était plus faible, elle était plus élevée sur 4M6 et assez proche sur TC14.

Il faut par ailleurs noter la meilleure activité sur TC14 des composés présentant 2 méthylènes en région « est » (n=2 : **11c**, **5l** et **11g**) par rapport à ceux à un seul carbone, mais pas sur les deux autres souches.

Ces éléments permettent donc de mettre en évidence que si l'absence de groupement méthoxyle se traduit par une diminution de l'activité anti-adhésion, la présence d'atomes de brome permet de restaurer celle-ci, voire de l'augmenter. Quant à la longueur de chaîne optimale, elle varie en fonction de la souche bactérienne, le composé à un seul méthylène étant toutefois généralement le plus actif.

- Noyau aromatique de la région « ouest » à fonction méthoxyle (**R1 = CH₃**)



Composés	m	n	Y	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
11a	1	2	H	97,3 ± 16,7	134,2 ± 14,7	40,0 ± 6,2
11e	1	2	Br	84,0 ± 23,2	123,6 ± 24,2	40,2 ± 1,6
3	2	1	H	33,1 ± 13,5	66,4 ± 21,4	63,8 ± 13,0
4	2	1	Br	137,4 ± 91,2	190,5 ± 44,0	>200
11b	2	2	H	72,9 ± 4,8	104,4 ± 22,8	32,6 ± 10,2
11f	2	2	Br	40,7 ± 10,6	67,8 ± 8,3	8,8 ± 2,3

Avec ces composés, la présence d'atomes de brome sur le noyau aromatique de la région « est » a une influence variable.

Lorsque la chaîne carbonée de la région « ouest » est constituée d'un seul atome de carbone ($m = 1$), la présence d'atomes de brome en région « est » se traduit par un gain d'activité, mais moins marqué qu'avec OH-phénolique en région « ouest » ($R_1 = H$). Par contre, lorsque c'est la région « est » qui ne possède qu'un seul atome de carbone ($n = 1$), la présence d'atomes de brome se montre défavorable à l'activité anti-biofilm, et ce, sur toutes les souches bactériennes. En revanche, lorsque les 2 chaînes carbonées ont deux atomes de carbone ($m = n = 2$), la bromation du noyau aromatique en région « est » est favorable, avec une réduction importante des CE₅₀ comparable à celle observée lorsque $R_1=H$. Ce composé est le plus actif sur la souche TC14 de tous les analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole. Son activité est comparable à celle du composé **3** (dépourvu d'atomes de brome) sur TC8 et inférieure sur 4M6.

Il ressort de ces résultats que la présence d'atomes de brome est un facteur important de l'activité anti-biofilm, mais son impact est assez variable. Si la présence de l'atome en région « ouest » semble être favorable à cette activité, que le noyau aromatique porte un groupement OH-phénolique ou un groupement méthoxyle, l'impact des atomes de brome en région « est » varie plus. Leur présence est quasi-systématiquement favorable lorsque la région « ouest » porte un OH-phénolique, entraînant une baisse importante de la CE₅₀. Cependant, lorsque celle-ci porte un méthoxyle, d'autres éléments semblent devoir entrer en ligne de compte. Ainsi, la réduction de la longueur de la chaîne carbonée de la région « ouest » (défavorable à l'activité) était faiblement compensé par la dibromation de la région « est ». La bromation du noyau aromatique de la région « est » était par contre défavorable dans cette situation.

IV-2-5 R₁ ou R₂ = CH₂CH₂N(CH₃)₂ : Influence de la présence de chaînes N,N-diméthyléthylamine

Les molécules **5c**, **5g**, **5h** et **5m** permettent de voir l'influence de la substitution du OH phénolique par une chaîne de type N,N-diméthyléthylamine. Il faut noter que cette substitution est systématiquement défavorable à l'activité anti-adhésion comparativement aux dérivés non substitués. Que cette chaîne soit fixée en région « est » (**5c** et **5d**), « ouest » (**5e**) ou de part et d'autre (**5m**), ces molécules étaient systématiquement moins actives. Ces résultats sont différents de ceux enregistrés avec d'autres analogues de bromotyramines. En effet, que ce soit dans le cas d'analogues de moloka'iamines ou de bis-triazoles analogues de psammaplines A, la fixation de telles chaînes alkylamines se traduisaient systématiquement par une meilleure activité anti-adhésion.

IV-2-6 Comparaison de l'activité des composés en fonction de la lipophilie (log P)

Le tableau 13 présente la lipophilie et les CE₅₀ des analogues d'hémibastadines et composés apparentés.

Tableau 13: logP et CE₅₀ des composés

COMPOSE	logP	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)	4M6 (CE ₅₀ , μM)
Analogues de cinnamides				
4	3,12	>200	>200	>200
5	3,38	>200	80,6	>200
6	3,38	>200	11,4	>200
7	3,26	>200	73,7	153,5
8	3,12	>200	115,3	>200
9	3,38	142,3	52,3	>200
10	3,38	>200	11,3	>200
11	3,26	>200	54,6	162,5
Précédents analogues d'hémibastadines				
11a	3,6	134,2	40	97,3
11b	3,88	104,4	32,6	72,9
11c	3,62	113,2	69,3	155,5
11d	2,79	170,5	72,9	195,6
11e	5,26	123,6	40,2	84
11f	5,54	67,8	8,8	40,7
11g	6,1	96	26,6	83,2
Nouveaux analogues d'hémibastadines				
2	3,53	105,8	70,1	75,9
3	3,6	66,4	63,8	33,1
4	5,26	84	>200	137,4
5a	3,53	>200	65,2	>200
5b	3,79	>200	>200	>200
5c	3,79	>200	135,1	105,4
5d	3,27	>200	90,6	81,9
5e	3,6	>200	88,2	174,3
5f	3,86	>200	>200	>200
5g	3,86	>200	121,7	>200
5h	3,86	>200	115,2	>200
5i	3,34	>200	156	>200
5j	4,99	91,5	32,4	27,1
5k	3,88	188,7	122,1	161,9
5l	5,27	131,7	28,6	28,8
5m	4,14	>200	>200	>200

La figure 46 regroupe tous les composés considérés en les classant par ordre croissant de logP et en les comparant sur la base de leur CE₅₀.

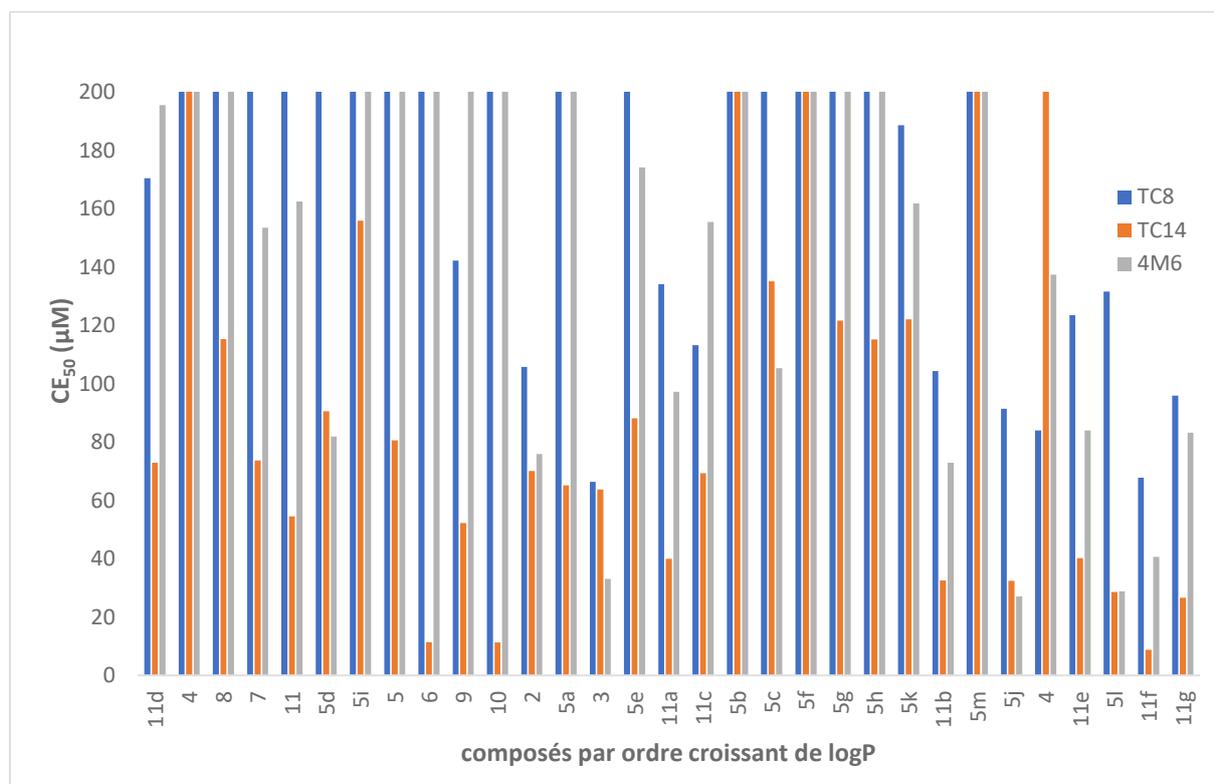


Figure 46: Comparaison des CE₅₀ des composés en fonction de leur lipophilie

Cette figure met en évidence les éléments suivants

- Les composés les plus lipophiles font partie des composés les plus actifs (**5l** avec un logP de 5,27, **11f** avec 5,54 et **11g** à 6,1)
- Toutefois, le composé **3**, l'un des plus actifs tout présente un log P de 3,6. Son dérivé bromé en région « est », le composé **4** s'avère beaucoup moins actif, malgré un log P de 5,26
- Les composés dépourvus d'atomes de brome présentent des log P compris entre 2,8 et 3,8. Toutefois, il ne semble pas y avoir de lien direct entre l'augmentation de la lipophilie et l'activité. En effet, le **11d**, composé le moins lipophile, est l'un des seuls à présenter une CE₅₀ < 200 µM sur les 3 bactéries modèles, ce qui n'est quasiment le cas d'aucun autre composé dépourvu d'atome de brome.
- Le composé **5m**, bien que possédant une lipophilie importante, est inactif quelque soit la bactérie.

L'analyse de ces différents éléments semble ainsi montrer que la lipophilie a une influence marginale sur l'activité anti-biofilm. Celle-ci semble préférentiellement déterminée par la disposition des différents éléments structuraux les uns par rapport aux autres tels que décrits plus hauts. Dans le cas des composés tels que **5j**, **5l**, **11f** à forte activité anti-biofilm, l'activité serait ainsi fonction de la présence des atomes de brome et leur influence électronique ou stérique, mais peu du fait de l'augmentation de la lipophilie qu'ils induisent.

Conclusion

Au cours de ces travaux de thèse, une nouvelle série de composés analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole ont été synthétisés et évalués pour leurs propriétés inhibitrices de la formation de biofilm de bactéries marines. Ils viennent ainsi compléter une bibliothèque de composés de ce type, déjà évalués pour leurs effets antibiofilm, en explorant cette fois-ci l'effet de la réduction de la longueur de la chaîne carbonée en région « est » par rapport au noyau 1,2,3-triazole. Il a ainsi été possible d'étudier de façon plus approfondie les relations structure-activités dans cette famille de composés, en déterminant l'impact des différentes variations de structures. Il semble que les positions relatives des différents éléments de structures les uns par rapport aux autres (substitution ou non des OH phénoliques, présence d'atomes de brome sur les noyau aromatiques, longueur de chaînes carbonées reliant les noyau aromatiques au linker central) jouent un rôle prépondérant sur l'activité anti-biofilm. Il ressort de ces études de relations structures-activités les éléments suivants

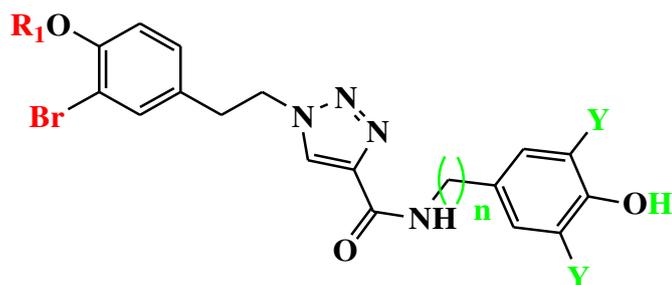
- La présence simultanée de deux groupements méthoxyle se traduit par une perte d'activité anti-biofilm. Ainsi, il semble indispensable d'avoir au moins un OH-phénolique libre pour permettre la liaison ligand-cible biologique responsable de l'activité.
- Au moins une des chaînes carbonées doit posséder deux atomes de carbone, cette longueur, pourrait favoriser la liaison à la cible.
- La présence d'OH phénoliques conduit à des molécules moins performantes, sauf en cas de dibromation des noyau aromatiques, en particulier en région « est ».
- Les atomes de brome ont un effet variable sur ces composés.
 - Ils sont généralement favorables à l'activité anti-adhésion, lorsque situés en région « ouest ».
 - Lorsque les 2 noyau aromatiques sont porteurs d'OH phénoliques, la bromation également de la région « est » est favorable.
 - Lorsque le noyau aromatique est porteur d'un méthoxyle, elle n'est favorable que pour une longueur de chaîne en région « est » de 2 atomes de carbone.

Il faut également noter que les activités des composés en fonction des souches varient en partie selon la longueur de la chaîne carbonée. Les composés à 2 atomes de carbone en région

« est » et « ouest » sont généralement plus actifs sur la souche TC14, tandis que ceux à 1 atome de carbone en région « est » le sont sur les autres.

Enfin, la lipophilie semble peu influencer l'activité anti-biofilm. Celle-ci dépendrait donc essentiellement de l'agencement relatif des différents éléments structuraux de ces composés.

De ces différents éléments, 4 composés se sont distingués par leurs activités anti-biofilm



Composés	R ₁	n	Y	4M6 (CE ₅₀ , μM)	TC8 (CE ₅₀ , μM)	TC14 (CE ₅₀ , μM)
5j	H	1	Br	27,1 ± 14,9	91,5 ± 27,1	32,4 ± 1,4
5l	H	2	Br	28,8 ± 8,3	131,7 ± 34,1	28,6 ± 7,8
3	CH ₃	1	H	33,1 ± 13,5	66,4 ± 21,4	63,8 ± 13,0
11f	CH ₃	2	Br	40,7 ± 10,6	67,8 ± 8,3	8,8 ± 2,3

Synthèse et évaluation biologique des activités anti-biofilm d'analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole

Chapitre 3 :

Activité antibiofilm sur *Candida albicans*

Introduction

Face aux problèmes posés par les biofilms marins, notamment les conséquences du biofouling, des travaux ont été menés sur les produits naturels marins. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, qui a consisté à approfondir les relations structure-activités en série des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole à visée anti-biofilm. Ceux-ci ont abouti à identifier des composés pouvant être considérés comme chefs de file potentiels. Cependant le biofilm ne se limite pas aux bactéries marines.

Le milieu médical est l'un des plus touchés par la problématique. En effet, de nombreuses pathologies sont liées aux biofilms, dont spécifiquement plusieurs pathologies infectieuses et tropicales. Il peut s'agir de présentations cliniques particulières d'infections (cas des infections ostéo-articulaires chroniques de l'enfant sans matériel implanté) ou de maladies infectieuses spécifiques aux régions tropicales telles que l'ulcère de Buruli. Ces défis imposent de développer les moyens de mener des études sur la question du biofilm en milieu biomédical africain. Les travaux menés au cours de cette thèse s'inscrivent donc également dans cette perspective. En effet, en adaptant ces techniques au sein de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'université Félix Houphouët Boigny de Côte d'Ivoire, il serait envisageable de mener de tels travaux de recherches localement. Les bénéfices seraient nombreux. On peut citer, entre autres une meilleure connaissance des processus physiopathologiques ou le développement de stratégies spécifiques et adaptées, à partir de composés de synthèses ou par valorisation de substances naturelles locales etc.

Les pathologies concernées peuvent être d'origine bactérienne ou mycobactérienne. Mais elles peuvent également être d'origine fongique, les champignons microscopiques étant également capables de former des biofilms. Et la pandémie de l'infection à VIH favorise ces infections. Dermatophytes, cryptocoques et surtout, *Candida* sont particulièrement concernés. L'espèce la plus fréquemment incriminée est *C. albicans*, même si d'autres espèces sont rencontrées, en particulier chez les personnes vivant avec le VIH (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, etc.). Etudier ces germes en biofilm et les évaluer permettrait donc, *in fine*, d'évaluer également le spectre d'action anti-biofilm des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole. Ils pourraient alors de fait constituer également des solutions potentielles dans la prévention de la formation de biofilms médicaux.

Ces études s'inscrivent dans une double perspective :

- Mettre en place la technique de formation de biofilm de *C. albicans* et d'évaluation d'activité anti-biofilm de composés au sein de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'université Félix Houphouët-Boigny de Côte d'Ivoire
- Evaluer l'activité anti-biofilm d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole ayant préalablement démontré leur potentiel sur des biofilms de bactéries marines, tout en vérifiant que cette action est bien spécifiquement antibiofilm, comme pour les bactéries marines.

Cette partie du travail sera présentée en quatre parties :

- Un rappel sur *C. albicans*, sa pathogénie et son épidémiologie (notamment en zone tropicale et en Côte d'Ivoire) et les caractéristiques de son biofilm.
- Les méthodes appliquées pour l'étude menée : le processus de sélection des souches, les composés évalués, les méthodes d'évaluation aussi bien de l'activité anti-biofilm que de l'activité antifongique.
- Les résultats obtenus.
- La discussion de ces résultats.

I- Rappels bibliographiques sur *C. albicans* et son biofilm

I-1 Epidémiologie des infections à *C. albicans*

I-1-1 Taxonomie et morphologie

C. albicans est un ascomycète appartenant à la classe des *Deuteromycetes*. Le genre *Candida* contient de nombreuses espèces, mais la particularité morphologique de celle-ci est de pouvoir se présenter sous différents aspects, en fonction des conditions de culture : levure, hyphes ou pseudohyphes (Fig. 47). Elle est associée à la plupart des animaux à sang chaud (184).

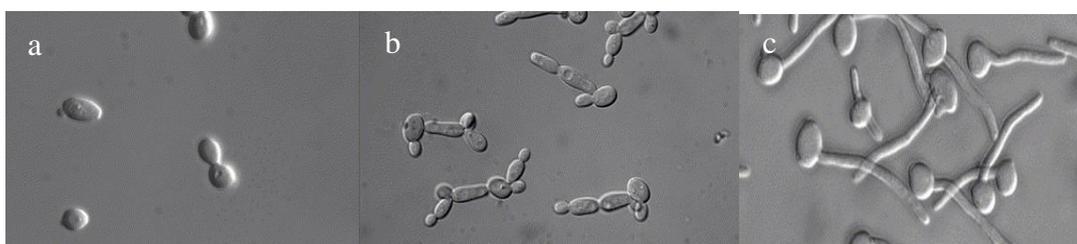


Figure 47: différents aspects morphologiques de *C. albicans* (microscopie optique, Gx40): a) levure ; b) pseudohyphes ; c) hyphes (185)

I-1-2 Pathologies et facteurs favorisants

Bien que commensale de l'homme, *C. albicans* peut provoquer divers types de pathologies (candidoses) qu'on peut classer en deux grandes catégories : les candidoses cutané-muqueuses et les candidoses profondes et systémiques, différents facteurs intervenant dans la pathogénie de cette levure.

I-1-2-1 Candidoses cutané-muqueuses

C. albicans est présent dans le tube digestif, la peau et les muqueuses de pratiquement tous, mais de façon généralement asymptomatique. Toutefois, elles peuvent causer des inflammations localisées. Parmi les candidoses cutané-muqueuses les plus fréquentes, on peut citer le muguet. Les candidoses vulvo-vaginales sont également des affections particulièrement fréquentes, étant admis qu'environ 75 % des femmes feront au moins un épisode au cours de leur vie. Enfin, on peut citer le cas des candidoses oropharyngées, notamment chez les personnes vivant avec le VIH (186).

I-1-2-2 Candidoses systémiques et profondes

Les levures du genre *Candida* sont généralement facilement contrôlées par le système immunitaire. La dissémination ainsi que le développement d'infections systémiques va donc généralement être consécutive à une immunodépression, par exemple au cours du stade SIDA de l'infection à VIH ou de traitement immunosuppresseur. Elles peuvent également être consécutives à la perforation du tube digestif, entraînant une dissémination des germes, ou être causées par l'introduction de matériel médical invasif, notamment en services de réanimation. Les pathologies en question peuvent être des méningites, septicémies ou autres infections d'organes profonds telles que des péritonites.

I-1-3 Données en Côte d'Ivoire

C. albicans constitue la première cause d'infections nosocomiales d'origine fongique dans le monde (187). Et elle constitue une cause récurrente d'infections gynécologiques, comme mentionné plus haut. En Côte d'Ivoire, les données disponibles confirment l'importance de la place des candidoses parmi les pathologies infectieuses locales.

Dans le cadre des candidoses vulvovaginales, une étude menée sur 400 patientes a montré que 23,5% d'entre elles présentaient une candidose vulvovaginale récurrente (188). Et ce, bien que la majorité des souches circulant localement sont non résistantes aux antifongiques (189). La population pédiatrique est également fortement touchée, une étude menée au CHU de Treichville montrant que *C. albicans* était la 3^e cause de diarrhée aiguë chez les enfants de 1 mois à 5 ans qui y étaient admis (190).

L'une des populations les plus touchées est celle des personnes vivant avec le VIH. La Côte d'Ivoire est l'un des pays les plus touchés par la pandémie au niveau ouest africain, avec une prévalence de 2,8% chez les adultes (191). Or les candidoses constituent l'une des principales infections opportunistes rencontrées dans cette population. Des données provenant de l'hôpital militaire d'Abidjan avaient ainsi mis en évidence que 28,9% des PVVIH présentaient une candidose oropharyngée (192). Une étude internationale menée sur des enfants vivant avec le VIH de Côte d'Ivoire, Mali, et du Sénégal avait montré que 8,3% d'entre eux présentaient des lésions orales, la majorité d'entre elles étant des candidoses, représentant 52,6% de ces lésions (193). Et une autre menée chez des patients hospitalisés adultes avaient également montré qu'elles constituaient également la première cause de lésions buccales, avec 79,4% des cas (194).

Certaines habitudes de consommations locales pourraient aussi favoriser le portage de levures du genre *Candida*. Des levures potentiellement opportunistes comme *C. tropicalis* ont été identifiées dans des boissons locales, comme le vin de palme (bangui) ou la bière locale (tchapalo). Ces espèces participent à la fermentation, mais peuvent potentiellement représenter un risque pour des personnes fragiles (195).

I-2 Facteurs de virulence

C. albicans possède de nombreux facteurs participant à sa virulence (196,197).

Le polymorphisme de *C. albicans* serait l'un de ceux-ci. En effet, comme signalé plus haut, *C. albicans* a la particularité de pouvoir exister aussi bien sous forme de levure que sous forme filamenteuse, les hyphes. Elle peut également exister sous forme de chlamydospores ou de pseudo-hyphes. Si toutes ces formes sont rencontrées dans les prélèvements et en cas d'infection, leurs rôles semblent distincts mais complémentaires. Ainsi, la forme hyphale serait plus invasive, tandis que la forme lévuriforme permettrait une meilleure dissémination (196,198,199). Le passage de l'une à l'autre forme se ferait notamment par reconnaissance de surfaces, que celle-ci soit abiotique ou biotique. Toutefois, en fonction de la nature de la surface et de divers autres paramètres (composition physico-chimique du milieu notamment, surface biotique ou abiotique etc.) la réponse sera soit une invasion soit une formation de biofilm (200). Les modifications en fonction de l'environnement couvrent également les conditions de pH et la modification de la composition en nutriments. Ces modifications couvrent également l'adaptation au métabolisme, notamment par modification de différentes voies de consommation de nutriments.

La pathogénie de *C. albicans* est également liée à sa capacité à produire diverses substances et enzymes. On peut noter ainsi la présence d'enzymes lipolytiques et protéolytiques (201). Elle produit également invasines et adhésines. Les premières permettent l'internalisation des cellules par endocytoses. Les secondes vont favoriser l'adhésion des cellules entre elles et à des surfaces.

Plusieurs de ces facteurs, complémentaires, participent à la formation d'un des plus importants d'entre eux : la formation de biofilm par *C. albicans*.

I-3 Le biofilm de *C. albicans*

Comme les bactéries, de nombreuses espèces fongiques sont capables de former un biofilm. C'est le cas de *C. albicans*.

Comme avec les bactéries, il s'agit également d'une agglomération de levures entourée d'une matrice extracellulaire, mais avec des particularités propres des levures, tant au niveau de la structure que du processus de mise en place. Les conséquences en terme de pathogénie seront également fortes, favorisant les facteurs de virulence et de tolérance vis-à-vis du système immunitaire et des antiinfectieux.

I-3-1 Morphologie et architecture du biofilm de *C. albicans*

Le biofilm de *Candida* est constitué de cellules fongiques entourées d'une matrice extracellulaire riche en polysaccharides (202). Il faut noter qu'*in vivo*, les échantillons prélevés chez des patients montrent également la présence de biomolécules tels que fibrinogène ou encore des cellules mortes. D'autres microorganismes y sont aussi régulièrement associés, notamment des bactéries.

Le biofilm mature de *C. albicans* est constitué d'un réseau dense et hétérogène de levures, de tubes germinatifs, de pseudohyphes et d'hyphes (202,203). Ainsi, le biofilm de *C. albicans* permet d'apprécier le polymorphisme de cette espèce.

La matrice quant à elle est un ensemble dynamique dont la composition et l'abondance évolue en permanence, en fonction des conditions environnementales, notamment les nutriments (204,205). Elle est constituée de protéines (55%), de polysaccharides (25%), de lipides (15%) et d'acides nucléiques (5%).

I-3-2 Processus de développement

Le développement du biofilm de *C. albicans* suit le schéma général du processus de formation d'un biofilm : adhésion, initiation, maturation, dispersion (Fig. 48).

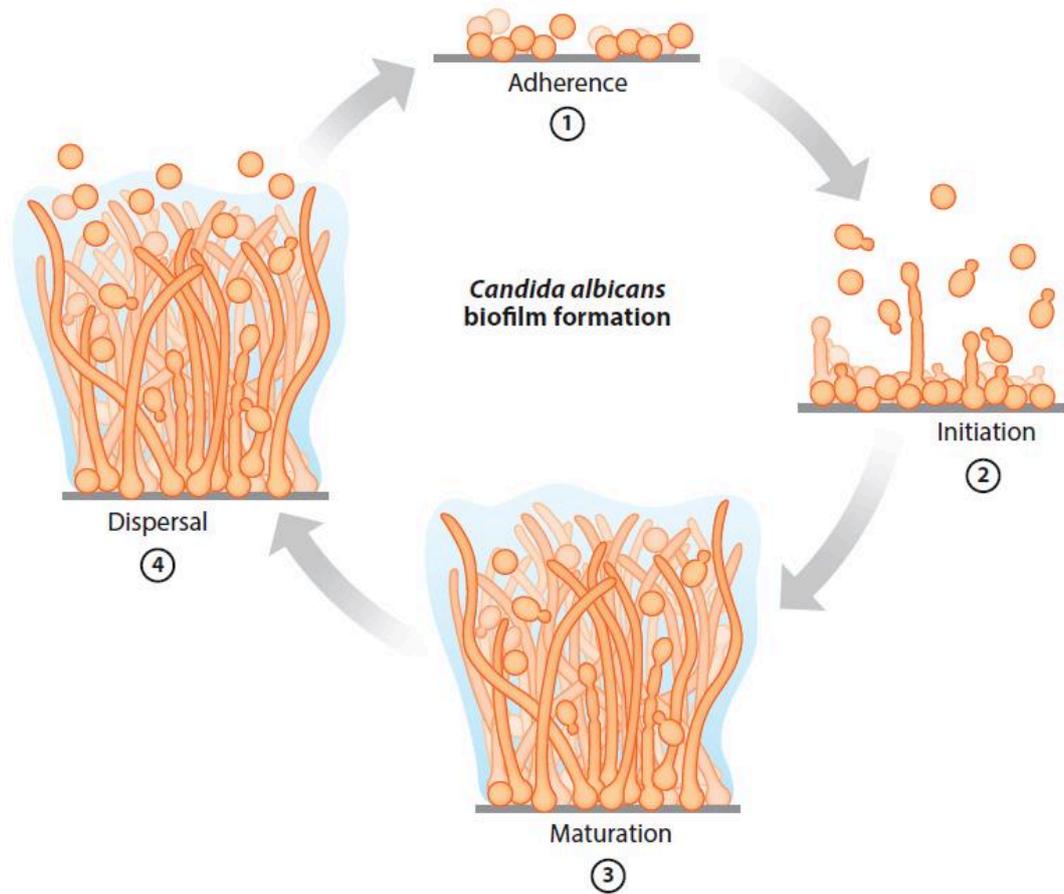


Figure 48: processus de formation du biofilm de *C. albicans* (206)

La formation du biofilm débute par l'adhésion de cellules sous forme de levure à une surface, assez précocement (60-90 min en laboratoire). L'initiation se déroule ensuite, avec prolifération et formation d'une couche basale avec ancrage cellulaire, avec un début de filamentation. La maturation va se traduire par une complexification de la structure du biofilm, avec accumulation des couches de cellules de différentes formes, aussi bien levures, que des hyphes et pseudohyphes, le tout encastré dans la matrice extracellulaire auto-induite. Il faut noter le rôle important des hyphes dans la formation et pour la stabilité même du biofilm. En effet, ceux-ci vont adhérer les uns aux autres ainsi qu'aux cellules levuriformes, favorisant le développement et le maintien du biofilm (206). Ils jouent également un rôle clé dans les liens entre cellules dans les cas de biofilms multispécifiques (197,202,207). La dernière étape est celle de la dispersion, où des éléments en forme de levure vont se détacher du biofilm et aller essaimer de nouveaux sites.

I-3-3 Le biofilm, facteur de virulence majeur de *C. albicans*

Le biofilm va se retrouver impliqué dans un grand nombre de pathologies et ce, aussi bien dans des infections localisées que disséminées (Fig. 49).

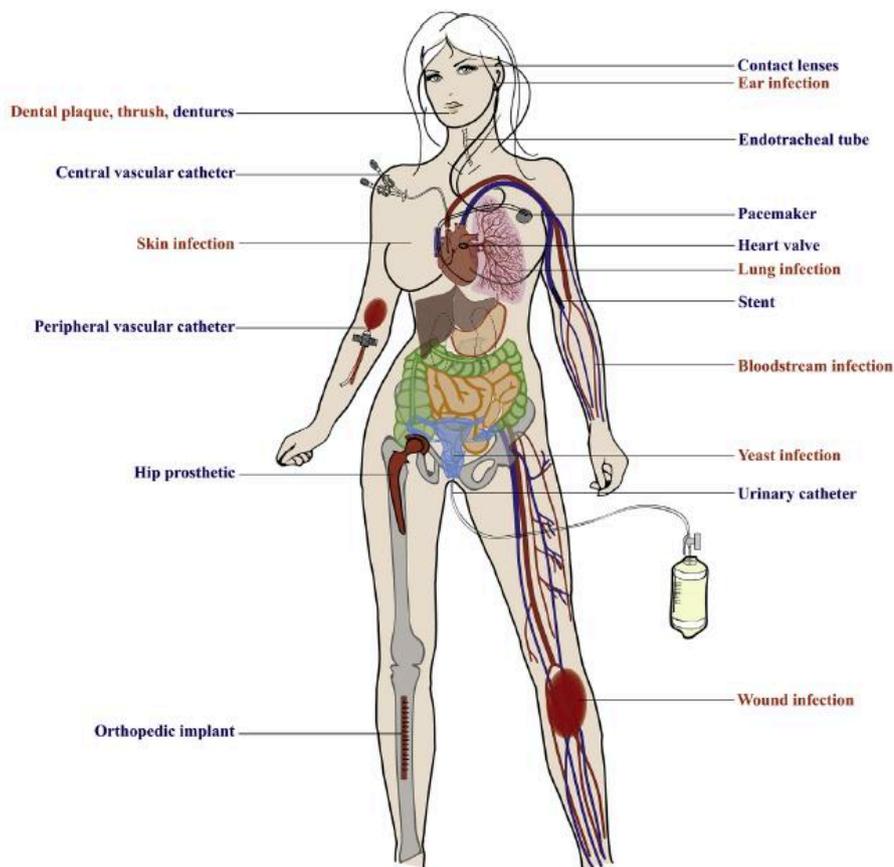


Figure 49: principales infections à biofilm de *C. albicans* (208)

La majorité des infections à *C. albicans* seraient même dues à ce facteur (209–211). *C. albicans* a la capacité de former des biofilms aussi bien sur des surfaces biotiques (peau, muqueuse vaginale, etc.) qu'abiotiques (cathéters, prothèses,) (206). La phase de dispersion va permettre au champignon de diffuser et d'induire des infections systémiques et profondes, à partir d'un site primaire. Mais l'un des principaux facteurs est la capacité que confère le biofilm à *C. albicans* de résister aux antibiotiques et d'échapper au système immunitaire.

Comme avec les bactéries, la formation des biofilms va se traduire par une augmentation de la CMI de la plupart des antifongiques. Les familles comme les azolés (principale classe d'antifongiques utilisée), analogues de la pyrimidine, allylamines et polyènes dans leur formulation classique sont inactifs vis-à-vis de *C. albicans* en biofilm (202,203,212). Les

échinocandines et les formulations lipidiques de polyènes présenteraient une relative efficacité (213–216).

La perte d'activité des antifongiques vis-à-vis de *C. albicans* en biofilm serait due à plusieurs facteurs, globalement proches de ceux déjà décrits pour les biofilms en général :

- Métabolisme ralenti et faible taux de croissance cellulaire : un faible taux de croissance cellulaire se traduit classiquement, même en mode planctonique, par une baisse de l'activité des anti-infectieux. Or le biofilm est caractérisé par la présence de microorganismes à activité ralentie dans la biomasse.
- Augmentation de la densité cellulaire
- Présence de microorganismes à métabolisme ralenti
- Effet de la matrice extracellulaire
- Présence de cellules persistantes
- Surexpression des mécanismes d'efflux

Le biofilm permet également à *C. albicans* d'échapper au système immunitaire, notamment à la réponse immunitaire innée et ce, par divers mécanismes : inhibition de la phagocytose par les neutrophiles, pénétration au travers de la membrane des phagocytes, blocage de l'activation du complément (211,217,218).

Enfin, il faut noter l'existence de biofilms polymicrobiens, avec *C. albicans*. Ces interactions qui existent déjà dans les microbiotes physiologiques (cette espèce en faisant partie), peuvent également être impliquées dans des mécanismes pathologiques. Ces interactions sont complexes, parfois à type de compétition avec inhibition de croissance ou de formation de biofilm. Mais elles peuvent également être plutôt de type symbiotique, avec augmentation de l'adhérence et/ou de la résistance aux anti-infectieux. Les interactions sont fréquentes au niveau oral, notamment avec les streptocoques. Les coinfections *C. albicans* - *Pseudomonas aeruginosa* sont aussi des phénomènes fréquents. Des phénomènes de communication interrègnes, par l'intermédiaire de messagers moléculaires du Quorum sensing ont été décrits (197). Ces interactions peuvent également être de type métaboliques, comme avec la production d'acide lactique par les streptocoques, favorisant la croissance sous forme levure, le pH alcalin favorisant plutôt la formation d'hyphes (207). Le biofilm de *C. albicans* peut également permettre de former un environnement pauvre en oxygène permettant le développement de bactéries anaérobies telles que *Bacteroides fragilis* et *Clostridium perfringens* (206,219). Quoiqu'il en soit, si ces interactions sont complexes et non totalement

élucidées, car variables, elles semblent avoir une influence sur la pathogénicité, se traduisant par une co-adaptation aux conditions du milieu et une meilleure résistance aux anti-infectieux. Ce dernier facteur pose un réel problème en termes de stratégie thérapeutique, contraignant à prendre en compte la présence de différents microorganismes nécessitant des thérapeutiques différentes (antifongiques et antibactériens) dans un contexte d'augmentation globale de la résistance à ces anti-infectieux (209).

II- Evaluation de l'activité d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole sur biofilm de *C. albicans*

Cette partie des travaux s'inscrit toujours dans la perspective de développement de molécules à activité anti-biofilm par l'étude de l'activité anti-biofilm d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole. Après un rappel des méthodes utilisées pour sélectionner d'abord la souche de *C. albicans*, puis évaluer l'activité anti-biofilm des molécules spécifique de ces molécules et leur pouvoir antifongique, les résultats seront présentés puis discutés.

II-1 Méthodes

II-1-1 Composés évalués

Les molécules testées sont trois analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole. Ces trois molécules se distinguent uniquement par la longueur de la chaîne alkyle de la région « est » (Fig. 50).

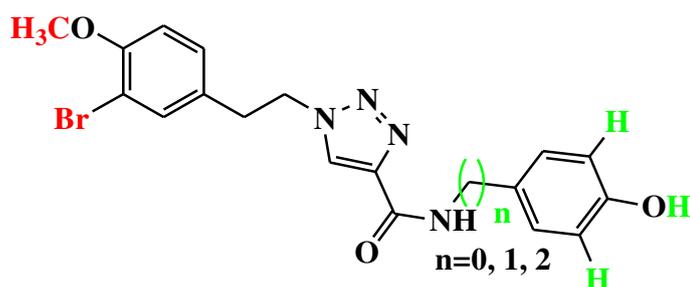


Figure 50: structure générale des molécules testées

Les trois molécules ont une longueur de chaîne carbonée (n) variant de 0 à 2 atomes de carbone, et se sont montrées actives sur les souches TC8, TC14 et 4M6 (10,182). Il s'agissait de deux des trois composés issus de la première série d'analogues d'hémibastadines de cette étude, résultant de la réduction de la longueur de la chaîne carbonée de la région « est », ainsi que de leur équivalent à 2 atomes de carbone développé par Andjouh (10).

Tableau 14: molécules testées et leurs performances CE₅₀ en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sur souches bactériennes marines TC14, TC8 et 4M6, avec les écart-types des moyennes établies

Molécule	n	TC14	TC8	4M6
2	0	75,9 \pm 7,9	106,8 \pm 32,8	70,1 \pm 0,2
3	1	33,1 \pm 13,5	66,4 \pm 21,4	63,8 \pm 13
11b*	2	32,6 \pm 10,2	104,4 \pm 22,8	72,9 \pm 4,8

* Issue des travaux de Andjouh (10)

Ces composés ont tous les trois montré une activité anti-biofilm sur bactéries marines. Le **3** (à un atome de carbone) est globalement le plus actif et a même démontré sa capacité à inhiber la formation d'un biofilm constitué de trois souches bactériennes.

En utilisant ces composés, il est ainsi possible de vérifier l'activité anti-biofilm de cette famille de molécules sur d'autres biofilms que ceux formés par des bactéries marines. Il est également possible d'entamer un travail comparatif d'étude des relations structure-activité sur bactéries marines et sur *C. albicans*.

II-2 Activités biologiques

II-2-1 Sélection de la souche

La sélection des souches a été réalisée à partir de 3 souches fournies par l'institut pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Il s'agit de souches cliniques prélevées au niveau vaginal dans le cadre d'une enquête menée en 2017 chez des professionnelles du sexe. Il s'agissait de patientes séronégatives au VIH présentant des signes cliniques de candidoses vaginales. Des souches issues de ce site anatomique ont été choisies car régulièrement responsables d'infections chroniques et/ou récidivantes dues à des biofilms. Elles ont été également choisies pour leur sensibilité aux antifongiques usuels, notamment les antifongiques azolés.

La capacité à former des biofilms par ces souches étudiées (pour lesquelles cette aptitude n'avait pas été évaluée précédemment) a été adaptée et optimisée à partir de celles mises au point et optimisées pour des souches de références connues pour former des biofilms (SC5314 et 3153A) et dans le cadre d'études de désorganisation de biofilms préformés (204,220,221). La révélation a été réalisée à l'aide du cristal violet (CV). La souche présentant les D.O. les plus élevées étant considérant comme formant le biofilm le plus important, celle-ci a été retenue pour réaliser les tests anti-biofilm. Le cristal violet a été choisi préférentiellement au 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) décrit. En effet, ce

dernier est un indicateur de l'activité respiratoire des organismes couramment utilisé pour les tests anti-biofilm de *C. albicans*. Évalué et ayant donné des résultats intéressants dans ce contexte, il a aussi l'avantage de présenter une manipulation plus rapide pour les étapes de marquage (mise en contact, lavage et lecture) par rapport au CV. Cependant, ses coûts d'acquisition sont plus élevés et il demande des conditions de conservations et d'utilisation plus rigoureuses (obscurité, conservation à +4°C etc.) Pour ces travaux visant à mettre au point la méthode dans un environnement où cela n'avait pas encore été réalisé, sélectionner une souche et réaliser des essais préliminaires, le choix s'est donc porté sur le CV comme révélateur. L'utilisation du XTT sera réservé pour des travaux en perspective, notamment pour évaluer la viabilité des microorganismes après exposition aux composés.

II-2-2 Test d'activité anti-biofilm

Les molécules ont été évaluées selon les méthodes décrites au chapitre 2, en triplicat, avec calcul des CE₅₀, et calcul des moyennes et écart-types obtenus, avec comme révélateur le CV. L'efficacité des molécules a été comparée sur cette base. Le composé considéré comme le plus actif était celui présentant la CE₅₀ la plus faible.

II-2-3 Observation des biofilms de *C. albicans*

Les biofilms une fois formés ont tout d'abord été observés en microscopie optique en phase inverse.

Ensuite, des observations ont été réalisées par microscopie confocale après marquage des biofilms formés par le cytochrome Syto 9. Les données des images ont été extraites pour permettre de calculer les biovolumes et l'épaisseur moyenne des biofilms, en présence ou non de 100 µM de l'inhibiteur le plus actif.

II-2-3 Activité anti-fongique

Afin de déterminer si l'activité des composés est, une fois encore, strictement anti-biofilm ou liée à une activité antifongique, cette évaluation a été menée sur le composé présentant l'activité anti-biofilm la plus importante. Il a été mené selon la méthode du Clinical & Laboratory Standard Institute (CLSI), avec comme composé de référence le fluconazole.

II-3 Résultats

II-3-1 Sélection de la souche

L'application des méthodes a permis de mettre en évidence la capacité des 3 souches à effectivement former des biofilms. Cependant, bien que toutes les 3 provenant de conditions comparables (souches issues de prélèvements vaginaux chez des femmes présentant des signes de candidoses vaginales), les densités respectives de biofilms étaient différentes (Fig. 51).

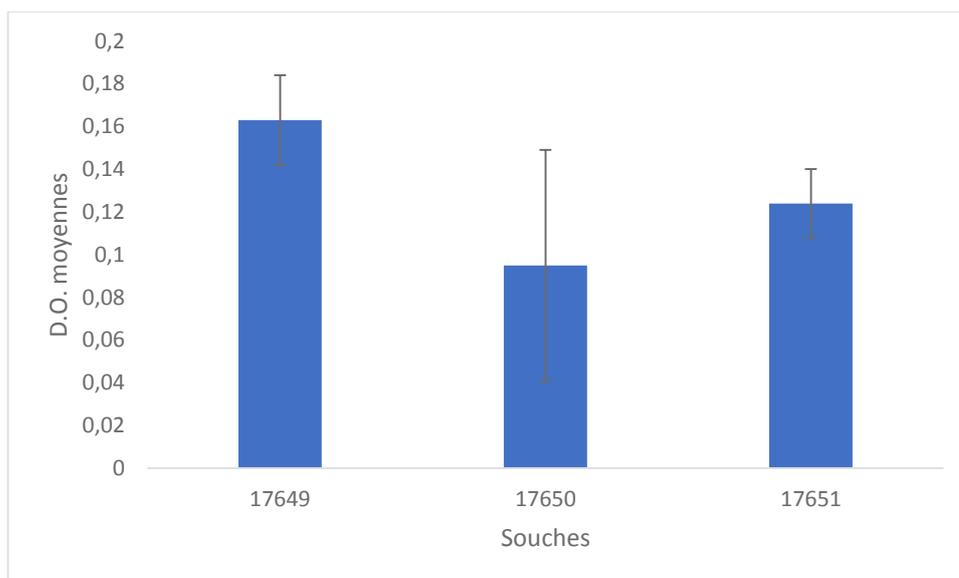


Figure 51: valeur comparée des D.O. des biofilms des 3 souches de *C. albicans*

La souche IPCI n°17649 est celle qui a montré la D.O. la plus élevée (0,16), donc le biofilm le plus important.

Les figures 52 et 53 montrent l'aspect des biofilms, respectivement en microscopie optique et confocale.

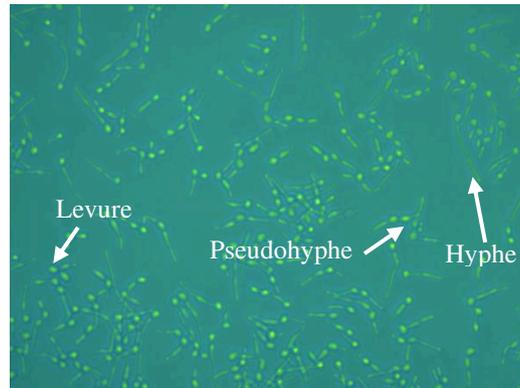


Figure 52: biofilm de la souche *C. albicans* n°17649 observé en microscopie optique grossissement x40

Les images permettent d'observer une forte densité de cellules, en plusieurs couches, ainsi que la présence d'hyphe, de levures et de pseudohyphes.

Ces éléments sont également observés en microscopie confocale.

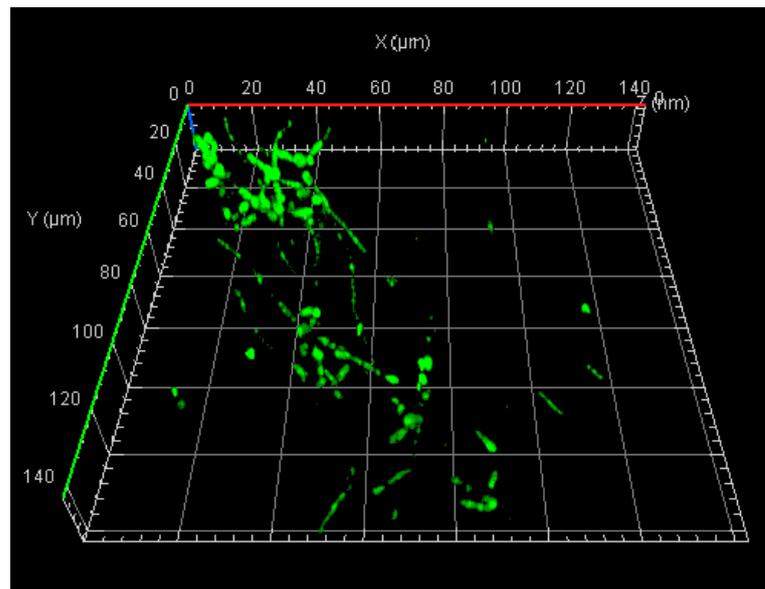


Figure 53: images en microscopie confocale de la souche de *C. albicans*

Le recours à la microscopie confocale permet de quantifier le biofilm formé. Cette souche forme, dans les conditions choisies, un biofilm dont le biovolume moyen est de $0,14 \pm 0,04 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ avec une biomasse présentant une épaisseur moyenne de $7,15 \pm 0,84 \mu\text{m}$.

II-3-2 Test d'activité anti-biofilm

La souche ayant montré sa capacité à former des biofilms, il était à présent possible d'envisager l'adaptation des tests anti-adhésion. Les composés ont été évalués dans les mêmes conditions que celles déjà décrites pour la formation de biofilm et la sélection de la souche.

L'activité anti-biofilm des 3 molécules évaluée sur la souche ° 17649 est reportée dans la figure 54 et le tableau 15.

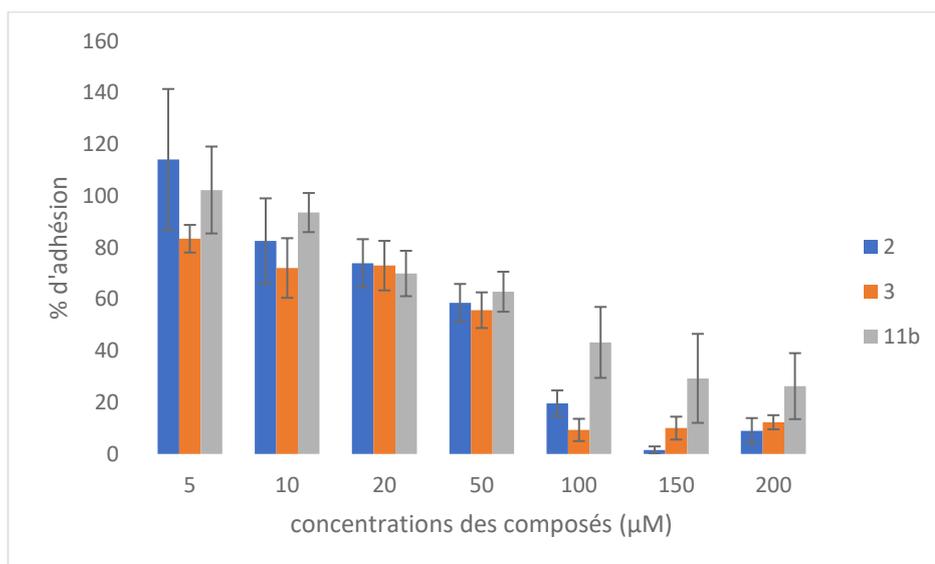


Figure 54: activité comparée des molécules testées en fonction de la concentration

Tableau 15: activité des molécules en $\mu\text{M} \pm$ exprimant les écart-types)

Composé	% d'adhésion	CE ₅₀ (μM)
2	8,7 \pm 4,6	40,9 \pm 10,3
3	12,3 \pm 2,7	34,4 \pm 9,6
11b	25,9 \pm 13	71 \pm 19,3

Les résultats permettent de constater que les trois composés possèdent une activité antibiofilm sur *C. albicans*, mais celle-ci est toutefois variable. En effet, si la molécule **2** a le pourcentage d'adhésion à 200 μM le plus faible (8,7% \pm 4,6), c'est le **3** qui a la CE₅₀ la plus faible et peut donc être considérée comme la plus active (34,4 $\mu\text{M} \pm$ 9,6).

II-3-3 Visualisation de l'effet du composé 3

La figure 55 présente l'aspect du biofilm en présence du composé 3.

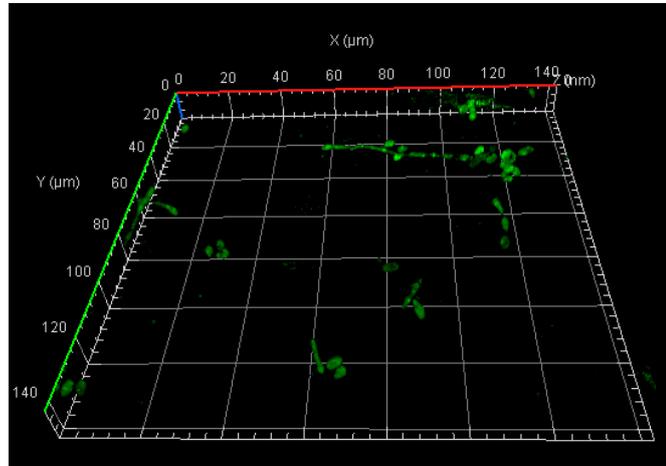


Figure 55: biofilm de *C. albicans* en présence du composé n°3 en microscopie confocale

Les images semblent présenter un biofilm peu important, ce qui sera confirmée par les données de biovolumes et d'épaisseur moyenne du biofilm (Fig. 53).

La figure 56 permet de comparer les données extraites des images de microscopie confocale.

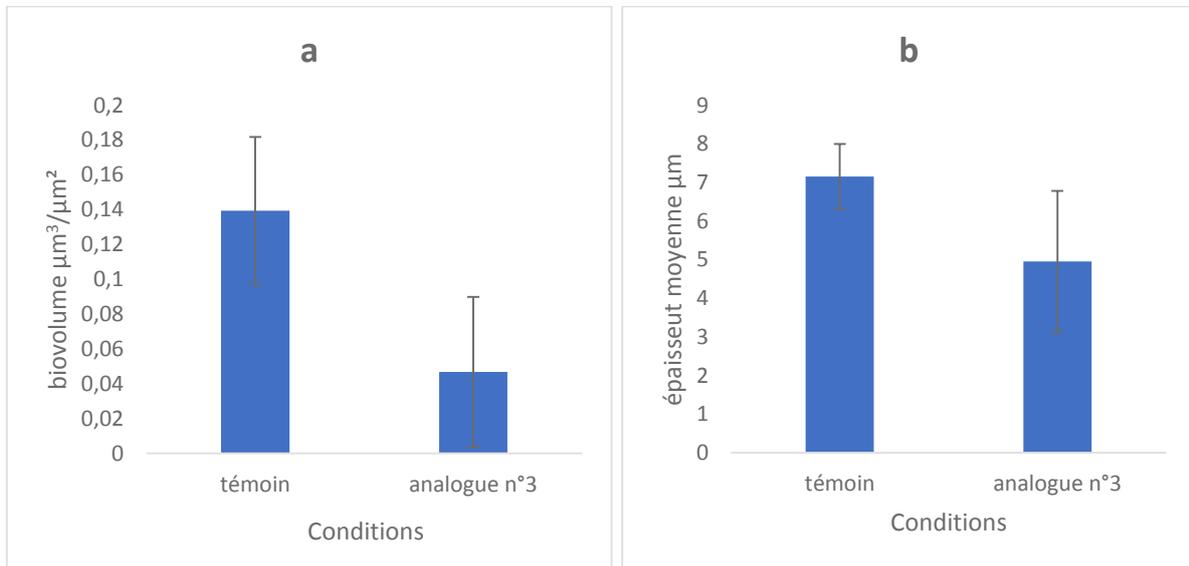


Figure 56: biovolumes(a) et épaisseurs moyennes (b) de la souche test de *C. albicans* en présence ou non du composé 3

Comme cela avait déjà été mis en évidence avec les souches bactériennes, la microscopie confocale permet de confirmer l'effet inhibiteur du composé 3. Le biovolume du

témoin sans composé, de $0,14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, est de $0,05 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ en présence de cet inhibiteur. De même, l'épaisseur moyenne du biofilm de $7,15 \mu\text{m}$ passe à $4,9 \mu\text{m}$ en présence de l'inhibiteur.

L'ensemble de ces résultats permet de montrer que les analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole, en particulier le composé **3**, présentent une activité inhibitrice de l'adhésion et de la formation de biofilm par *C.albicans*. Pour pouvoir déterminer si cet effet inhibiteur est un effet spécifiquement anti-biofilm ou s'il est dû à un effet antifongique, la détermination de la CMI s'avère nécessaire.

II-3-4 Mesure de l'activité antifongique

La CMI de l'analogue n°3 et du fluconazole ont été évaluées comparativement

Les tests ont permis de montrer que la CMI de la molécule est supérieure à $64 \mu\text{g/mL}$ contre $4,06 \mu\text{g/mL}$ pour le fluconazole. Selon la norme du CLSI, la molécule peut être considérée comme inactive vis-à-vis de *C. albicans* en ce qui concerne l'activité antifongique.

II-4 Discussion

Face aux problèmes posés par les biofilms fongiques en général et en particulier ceux dus à *C. albicans*, il s'est avéré utile de mettre en place les techniques d'évaluation d'activités de composés sur biofilm au sein de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et de proposer des composés à activité anti-biofilm strict. Dans cette double perspective, la validation des méthodes visait à sélectionner une souche pouvant servir de modèle pour les tests et à permettre l'évaluation de l'activité anti-biofilm d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole dont l'activité a été mise en évidence sur bactéries marines.

Compte tenu de la fréquence des infections génitales à *C. albicans* récurrentes, le choix s'est porté sur des souches d'origine vaginale (188). Afin de réaliser un premier niveau de screening, le choix s'est porté sur des souches non résistantes aux antifongiques d'usage courant, comme la majorité des souches circulant localement (189). Ces éléments permettent ainsi d'avoir une souche modèle représentative des conditions courantes, permettant de les reproduire au mieux *in vitro*.

Les tests de sélection (sans molécule) ont permis de montrer que parmi ces souches, celle référencée IPCI 17649 présentait le biofilm le plus important (D.O 0,16 à 48H), comparativement à celui des souches 17650 (D.O. 0,09) et 17651(D.O. 0,12). La constitution et l'importance du biofilm de *C. albicans* sont très variables (222). Cette variabilité, observée déjà *in vivo* et variant en fonction de plusieurs paramètres (site anatomique, surface biotique ou abiotique) l'est également *in vitro*, et ce, entre souches différentes. En effet, toutes les souches ne forment pas de biofilms de la même manière. Des travaux comparant la formation de biofilm par 15 souches de *C. albicans* sur des disques de 0,5 cm² découpés dans des cathéter ont montré que la masse sèche de biofilm pouvait varier de 0,44 mg ou 0,51 mg (milieu enrichi en glucose ou galactose) à 1,04 à 1,96 mg en fonction de la souche (203). L'état clinique des patients peut participer à sélectionner des souches présentant des caractéristiques différentes en termes de capacité de formation de biofilm. Une étude comparant les capacités de formation de biofilm par des souches provenant de la muqueuse vaginale de femmes VIH+ et – et distinguant colonisation et infection a ainsi été menée (223). Elle a permis de mettre en évidence que les souches isolées provenant de femmes VIH- formaient des biofilms plus importants que celles provenant de femmes VIH+, même si ces dernières développaient plus de facteurs de virulence. Les résultats étaient cependant différents dans une autre étude menée cette fois sur les *Candida* issus de la sphère buccale (224). Le biofilm permet aux microorganismes de résister au système immunitaire mais également de s'imposer dans les phénomènes de compétition entre

microorganismes. Dans des environnements à forte pression seront donc favorisées les souches et mutants à forte capacité de formation de biofilm et vice versa.

La souche IPCI 17649 observée en microscopie optique permet de voir l'hétérogénéité caractéristique du biofilm de *C. albicans*, avec aussi bien levures, pseudohyphes et hyphes. Ces structures, comme nous l'avons vu, jouent un rôle dans la pathogénicité des souches. Leur prédominance relative va cependant varier également en fonction de la souche, ou de l'environnement.

En somme, cette souche, prélevée au niveau vaginal, possède la capacité de former des biofilms et également les propriétés et caractéristiques d'un biofilm classique de *C. albicans*. Si toutes ses caractéristiques, notamment au niveau génétique et ses capacités d'adaptation en fonction des conditions doivent encore être explorées, elle peut cependant déjà être utilisée pour des évaluations d'activité anti-biofilm.

Cette évaluation a permis de confirmer la capacité de ces analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole à inhiber la formation de biofilms de *C. albicans*. Divers travaux ont déjà montré l'étendue des activités des hémibastadines sur des organismes marins et sur des bactéries GRAM négatif. La dibromohémibastadine par exemple inhibe l'adhésion et la formation de biofilm par divers bactéries GRAM négatif, aussi bien marines que terrestres (*Paracoccus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* etc.) et également sur divers microalgues (177,178,181). Par ailleurs, les précédents travaux menés avec des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole avaient déjà permis de démontrer la validité du recours à ce noyau comme bioisostère de l'oxime des hémibastadines (10,182). Le présent travail permet d'envisager que le spectre d'activité anti-biofilm s'étend également aux fungi, notamment à *C. albicans*. Un large spectre d'activité anti-biofilm est important car il permet d'obtenir des substances et/ou des revêtements utilisables dans un large éventail de situations. *C. albicans* étant un pathogène dont les biofilms sont largement impliqués en pathologie humaine, posséder une molécule active aussi bien sur des bactéries, que sur cette levure pourrait donc permettre de proposer des solutions anti-biofilm utilisables face aux contraintes microbiologiques diverses.

L'activité comparée de ces 3 molécules montre que la plus active est la « 3 », caractérisée par la présence d'une chaîne carbonée à un seul atome de carbone, avec une CE₅₀ de 34,4 µM. Les résultats obtenus avec *C. albicans* sont donc globalement superposables à ceux obtenus avec les bactéries marines. Il apparaît ainsi que ces molécules vont non seulement présenter une activité anti-biofilm aussi bien sur bactéries que sur *C. albicans*, mais également

que l'action se déploie de la même manière, avec des similitudes en termes de relations structure-activité anti-biofilm. En effet, ce composé, comparé aux 2 autres ici évalués étaient le plus actif, mais est également l'un des plus actifs au terme de l'étude des relations structure-activités effectuée au chapitre précédent. Le recours à la microscopie confocale permet de confirmer cet effet en visualisant le biofilm. Comme cela avait été établi, le biovolume est affecté, de même que l'épaisseur du biofilm. Ces éléments montrent l'efficacité de ces composés comme inhibiteurs de biofilms, apte à inhiber la formation de biofilms aussi bien bactériens que fongiques. Le mécanisme d'action mis en jeu pourrait être le même, d'autant plus que ces molécules semblent également ne pas posséder d'activité antifongique classique.

En effet, la molécule possédant l'activité anti-biofilm la plus élevée, la molécule **3**, a une CMI > 64 µg/ml, soit > 148 µM. Cette molécule est inactive. L'effet anti-biofilm ne serait donc pas la conséquence d'une activité antifongique, mais, comme cela avait déjà été montré sur les bactéries marines, bien la conséquence d'une action inhibitrice spécifique. Les analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole semblent être strictement anti-biofilm, sans activité antimicrobienne, tant sur les bactéries que sur *C. albicans*. Ce fait présente en outre l'avantage de pouvoir proposer des stratégies anti-biofilms entraînant une faible pression de sélection de mutants résistants aux anti-infectieux classiques. Il permet également d'envisager des possibilités des essais de combinaison pour évaluer la synergie entre ces composés et des antifongiques classiques en cas d'infections à biofilms candidosiques.

Les mécanismes de cette activité sont encore non élucidés. Cependant, vue la similarité d'activité tant sur bactéries GRAM négatif que sur levures, l'hypothèse d'une action sur un mécanisme spécifique à la formation de biofilms mais présent tant chez les levures que chez les bactéries (voire chez les microalgues), peut être envisagée, bien que restant encore à déterminer. Le QS, qui a cette particularité, pourrait être concerné, d'autant que l'activité de la dibromohémibastadine sur ce mécanisme a été mise en évidence (177).

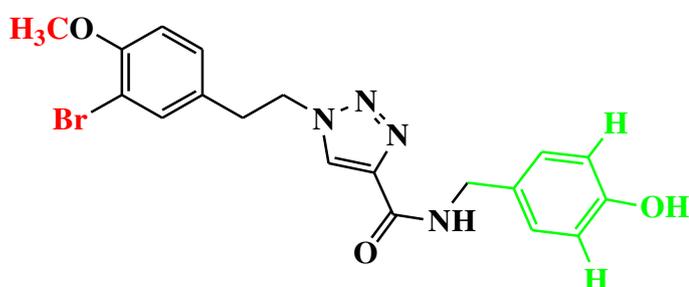
Conclusion

Cette partie du travail visait à évaluer l'activité antibiofilm sur *C. albicans* d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole ayant montré une activité similaire sur des bactéries marines. Pour cela, il a été nécessaire d'utiliser une souche provenant d'un prélèvement vaginal et fourni par l'institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Cette souche s'est avérée apte à former un biofilm présentant toutes les caractéristiques du biofilm de *C. albicans*. A partir de ces résultats, trois analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole se distinguant par la longueur de la chaîne carbonée de la région « est » ont été évaluées. Les trois molécules possèdent une activité anti-biofilm sur la souche. La molécule la plus active a été celle possédant une longueur de chaîne à 1 atome de carbone ($CE_{50}=34,4 \mu\text{M}$), comme cela avait préalablement été constaté avec les bactéries marines. L'évaluation de la sensibilité de la souche de *C. albicans* vis-à-vis de la molécule a permis de montrer qu'elle ne possédait pas d'activité antifongique ($\text{CMI} > 64 \mu\text{g/mL}$).

Ces résultats permettent de montrer que ces molécules de synthèse possèdent une activité anti-biofilm large, couvrant non seulement les bactéries marines mais également les levures. La similarité d'activité permet d'envisager une action sur des mécanismes anti-biofilm spécifiques et probablement similaires entre levures et bactéries, bien qu'ils doivent encore être optimisés. Il pourrait également s'avérer utile d'évaluer la capacité de ces molécules à disperser un biofilm préformé et d'évaluer leur action sur les différents constituants du biofilm (microorganismes, constituants de la matrice).

Conclusion générale et perspectives

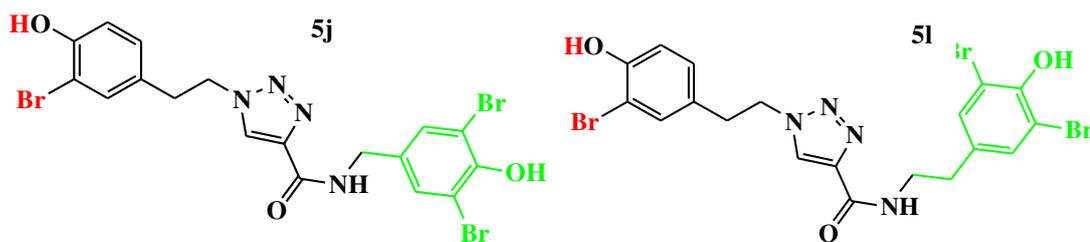
Cette thèse visait à approfondir l'étude de l'activité anti-biofilm d'analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole. Elle s'inscrivait dans la continuité de travaux ayant démontré la capacité de tels composés à inhiber l'adhésion de bactéries marines. Pour cela, une série de composés a été synthétisée, afin d'obtenir une plus grande bibliothèque d'analogues. Ceux-ci ont tout d'abord été évalués de façon classique sur les souches TC8, TC14 et 4M6. Mais en plus, différentes méthodes ont été mises au point ou adaptées afin d'évaluer l'étendue des activités anti-biofilm de ces composés, notamment l'évaluation de l'activité sur les souches TC4, TC11 et TC10-pX5-GFP ainsi que sur des biofilms complexes constitués de ces 3 souches, l'écotoxicité sur communautés planctoniques et l'activité anti-biofilm sur souche clinique de *C. albicans*.



Une première série de tests a mis en évidence l'activité particulière d'un composé, le n°**3**, à région « est » à un seul méthylène et dépourvue d'atomes de brome.

Ce composé présentait des CE_{50} de 33,1 μM sur TC14, 66,4 sur TC8 et 63,8 sur 4M6 119,2 μM sur TC10 sur 86,2 μM et 85 μM sur TC11). Il s'est également avéré capable d'inhiber la formation d'un biofilm formé de ces 3 dernières souches bactériennes, conduisant à un biovolume total < 0,05 $\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. Cependant, si celui-ci n'avait aucune activité tant sur la croissance que sur la viabilité bactérienne à 100 μM , il s'est avéré toxique à cette même concentration vis-à-vis d'organismes phyto et zooplanctoniques.

Forts de ces résultats, des variations de structures plus approfondies ont été entreprises. Elles ont permis d'identifier 2 autres analogues d'hémibastadine à forte activité anti-biofilm, également capables d'inhiber un biofilm multi-souches. Il s'agit des composés **5j** et **5l**. Ils ont présenté les CE_{50} suivantes **5j** 91,5 μM sur TC8, 32,4 μM sur TC14 et 27,1 μM sur 4M6. Pour **5l**, les CE_{50} étaient respectivement de 28,8 μM sur 4M6, 131,7 μM sur TC8 et 28,6 μM sur TC14.



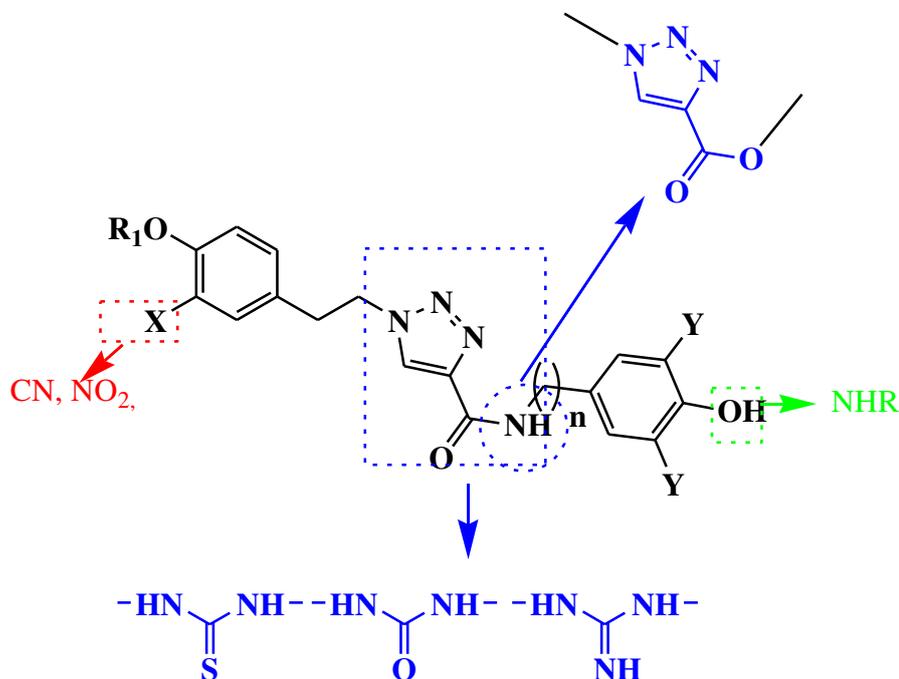
La compilation de ces résultats et leur confrontation avec les précédents travaux menés sur cette série de composés analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole a permis l'établissement de relations structures-activités dans cette série de composés, permettant de mettre en avant un certain nombre de propriétés structurales importantes à considérer pour obtenir une activité anti-biofilm optimale. Il s'agit notamment :

- De la nécessité d'avoir au moins un groupement OH-phénolique sur l'un des noyaux aromatiques ;
- La présence d'au moins un groupement méthoxyle est favorable, préférentiellement en région « ouest », relié au linker central par deux atomes de carbone.
- L'intérêt des atomes de brome, la présence d'au moins un s'avérant favorable à l'activité, l'hyperbromation exaltant généralement celle-ci. L'hyperbromation permet de compenser l'absence de groupement méthoxylé ;
- Les chaînes N,N-diméthyléthylamine sont défavorables à l'activité.

Ces composés ayant démontré leur activité sur bactéries marines, il a été entrepris une évaluation de cette activité en-dehors du milieu marin, sur microorganismes pathogènes, notamment des levures du genre *C. albicans*. Pour cela, des souches cliniques d'origine vaginale provenant de la collection de l'institut Pasteur d'Abidjan ont été utilisées. Après mise au point et validation de la méthode, une souche a été sélectionnée comme modèle pour les évaluations de composés. Parmi les trois analogues d'hémibastadines ayant précédemment démontré leur activité sur bactéries marines et se différenciant uniquement par la longueur de la chaîne carbonée en région « est », c'est le même composé **3** qui s'est avéré le plus actif (CE_{50} 34,4 μ M). Les calculs de CMI ont permis de montrer que ce composé agit également avec une activité anti-biofilm stricte, sans activité antifongique.

L'obtention de ces résultats et le développement des méthodes d'investigation d'activité anti-biofilm permettent d'envisager un certain nombre de perspectives à ces travaux.

D'un point de vu chimique, des modulations et des investigations QSAR sont à envisager. Une autre variation de structure importante et dont l'évaluation biologique serait intéressante résiderait dans le remplacement du noyau 1,2,3-triazole par d'autres structures chimiques, notamment des fonctions de type urée, thiourée ou guanidine.



En termes d'activités biologiques, une évaluation plus fine de la toxicité sur organismes marins, notamment par détermination des doses létales 50% (DL₅₀) sur phyto et zooplancton.

Sur *C. albicans*, étendre les essais anti-biofilm aux autres composés synthétisés, afin de vérifier que les relations structure-activités anti-biofilm établies pour les bactéries marines s'applique également à cette espèce.

Enfin, de façon générale, étendre les essais d'activité à un plus grand nombre de microorganismes, notamment à des bactéries GRAM positif (notamment staphylocoques, streptocoques) et d'autres espèces fongiques (*Candida non albicans*, cryptocoques).

Des essais également pour évaluer la capacité à désorganiser un biofilm préformé pourraient être envisagés.

Il faudrait également évaluer l'activité de ces composés sur les composants de la matrice extracellulaire. Enfin, des explorations afin de déterminer le mécanisme d'action de ces composés pourront être réalisés.

Partie expérimentale

I- Voies d'obtention des composés

I-1 Réactifs et solvants

Tous les réactifs et solvants sont disponibles chez les fournisseurs suivants : (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Alfa Aesar (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Zeppelinstrasse 7b, 76185 Karlsruhe, Allemagne), Acros Organics (New Jersey, USA) VWR International (Radnor, Pennsylvanie, États-Unis). Ils ont été utilisés sans purifications supplémentaires.

I-2 Purification des composés

Après synthèse et traitement, les solvants ont été éliminés par purification sous vide à l'évaporateur rotatif. Pour certains solvants (eau, DMF), l'élimination s'est faite au lyophilisateur (THERMO SCIENTIFIC, HETO - powerdry LL1500 freeze dryer). Les composés étaient ensuite purifiés par chromatographie sur colonne.

I-3 Chromatographies

Les réactions, de même que le choix des solvants pour la chromatographie sur colonne ont été effectués par chromatographie sur couche mince, en recourant à des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice pour CCM 60 F-254 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Allemagne). La révélation était réalisée par lecture à la lampe UV (254 nm).

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées soit à l'aide de colonnes ouvertes en verre avec une phase stationnaire constituée d'un gel de silice (gel de silice 60, 0,040-0,063 mm, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Allemagne), soit par chromatographie flash (ARMEN INSTRUMENT - spot flash system).

I-4 Caractérisation des composés et analyse spectrale

I-4-1 Spectroscopie RMN

Les composés ont été analysés par spectrométrie RMN (Bruker Avance 400) à 400,13 MHz pour le proton (^1H) et 100,62 MHz pour le carbone 13 (^{13}C). Les déplacements chimiques sont exprimés (δ) en partie par million (ppm), le tétraméthylsilane (TMS) étant pris comme référence interne ($\delta = 0$ ppm). Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Les abréviations pour les différents signaux sont : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), m (multiplet).

I-4-2 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été réalisés par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS) : VWR-EliteLachrom/Bruker-Esquire 6000 avec une colonne Purospher STAR RP18e (5 μ m) 125-4.

I-4-3 Détermination des points de fusion

Les points de fusion (pf) ont été déterminés sur Point de Fusion M-560 de Büchi.

I-5 Synthèse des composés

I-5-1 Synthèse du 2-bromo-4-(2-chloroéthyl)-1-methoxybenzene

A une solution de **1-(2-chloroéthyl)-méthoxybenzène** (1 éq.) dans de l'acétonitrile anhydre (5 ml) et à 0 °C, a été additionné du N-bromosuccinimide (NBS, 1,5 éq.). Le mélange est ramené à température ambiante et agité pendant 4h. Le solvant a été évaporé sous vide et le résidu obtenu dissout dans du diéthyléther (Et₂O). La phase éthérée a été lavée avec une solution saturée de Na₂CO₃, solution saturée de NaCl et de l'eau puis séchée sur du Na₂SO₄ anhydre. Le solvant a été éliminé sous vide. Le résidu obtenu, constitué de 2-bromo-4-(2-chloroéthyl)-1-methoxybenzene après confirmation de la structure, a été utilisé pour les étapes suivantes sans autre purification.

I-5-2 Synthèse du 2-bromo-4-(2-chloroéthyl)phénol

Le 2-bromo-4-(2-chloroéthyl)-phenol est obtenu par déméthylation du 2-bromo-4-(2-chloroéthyl)-1-methoxybenzene par le tribromure de bore (BBr₃). Au composé méthoxylé (1éq) de départ a été ajouté dans un bain d'eau glacée (environ 5°C) a été ajouté goutte à goutte une solution à 1M de (BBr₃) dans du dichlorométhane (2équivalents). La solution a ensuite été ramenée à température ambiante et agitée pendant 4 heures. Ensuite, le mélange a été ramené à 0°C puis neutralisé par une solution saturée de chlorure d'ammonium (NH₄Cl). La phase organique a ensuite été lavée à l'eau, séchée sur Na₂SO₄ puis le solvant a été évaporé sous vide. Le composé obtenu, sous forme huileuse a été utilisé sans autre purification pour les étapes suivantes.

I-5-3 Synthèse des dérivés azidoéthyles

Les azidoéthyles sont obtenus par réaction des 2-bromo-4-(2-chloroéthyl)phénol avec du sodium azide (NaN₃). Un mélange de composé de départ (1 éq) et de NaN₃ dans du DMF anhydre a été mis sous agitation pendant 5 h à 90°C. Le mélange a ensuite été ramené à

température ambiante puis dilué dans du diéther. La phase organique a été lavée à l'aide d'une solution saturée de Na_2CO_3 , NaCl puis de l'eau, et séchée sur Na_2SO_4 . Le solvant a ensuite été évaporé sous vide Et le produit directement utilisé pour les étapes suivantes.

I-5-4 Préparation des triazole à fonction acide

A un mélange d'azoture (1 éq.) et d'acide propiolique (1,5 éq.) dans un mélange éthanol/eau (1/1) sont ajoutés du sulfate de cuivre pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (0,04 éq.) et de l'ascorbate de sodium (0,08 éq.). Après 12 h d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel a été dilué dans de l'eau. La phase aqueuse a été extraite trois fois avec le CHCl_3 . Puis cette phase chloroformique est extraite deux fois par une solution saturée de NaHCO_3 . La phase aqueuse est ramenée à pH5 par du HCl 1M. Le produit final est extrait 3 fois par du CHCl_3 . La phase organique, lavée à l'eau, est concentrée sous vide pour donner les triazoles acides. Les produits bruts obtenu n'ont pas nécessité de purifications supplémentaires et ont été utilisé directement dans la réaction suivante.

Acide 1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylique (1a):

Obtenu à partir de 4-(2-azidoethyl)-2-bromo-1-methoxybenzene et d'acide propiolique sous forme d'un solide blanc (Pf = 174-176 ; rdt = 90 %).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,06 (s, 1H, COOH), 8,60 (s, 1H), 7,44 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,11 (dd, $J = 8,4, 2,1$ Hz, 1H), 7,00 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 4,63 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,13 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161,7, 154,1, 139,5, 133,0, 131,0, 129,2, 128,9, 112,5, 110,5, 56,1, 50,6, 34,1.

Acide 1-(3-bromo-4-hydroxyphenethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxylique (1b) :

obtenu à partir de 4-(2-azidoethyl)-2-bromophenol et d'acide propiolique sous forme d'un solide jaune brun (Pf = 164-166°C, rdt : 81 %).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,11 (s, 1H, COOH), 10,06 (s, 1H, OH), 8,60 (s, 1H), 7,29 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 6,91 (dd, $J = 8,4, 2,1$ Hz, 1H, 1H), 6,82 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 4,60 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 3,07 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161,8, 153,2, 137,2, 133,3, 130,0, 129,3, 129,0, 116,9, 109,8, 51,5, 34,6.

I-5-5 Synthèse des dérivés 4-(aminoalkyl)-2,6-dibromophenol

Ces composés ont été obtenus par bromation soit de la 4-hydroxybenzylamine, soit de la tyramine. A une solution d'amine (1 éq.) dans de l'acide acétique, une solution de dibrome

(Br₂, 2éq) a été ajoutée goutte à goutte jusqu'à maintien de la coloration brune. La préparation est ensuite ramenée à 0°C jusqu'à formation d'un précipité. Le précipité a ensuite été lavé à l'éther jusqu'à disparition de la coloration. Les produits bruts n'ont pas nécessité de purification et ont été utilisés tels quels dans les étapes suivantes.

I-5-6 Procédure générale pour la réaction de couplage peptidique

A une solution de triazole acide (1 éq) dans CH₂Cl₂/méthanol (9/1) à température ambiante, ont été ajoutés le 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (1,2 éq.) et le 1-hydroxybenzotriazole (1,2 éq.). Le mélange a été agité pendant 10 min à la même température puis l'amine (1,2 éq) et la diisopropyléthylamine (2,5 éq.) ont été ajoutées. Après 8 h de réaction, le mélange a été dilué avec le CH₂Cl₂ (20 ml) et lavé avec l'eau (20 ml). La couche aqueuse a été extraite avec du CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). Les phases organiques ont été réunies, séchées sur du MgSO₄ et concentrées pour fournir un résidu qui a été ensuite purifié par Chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange de CH₂Cl₂-MeOH.

I-5-7 Procédure générale pour la réaction d'alkylation des analogues d'hémibastadine

A une solution d'analogue d'hémibastadine (1 eq) dans du DMF anhydre a été ajoutée 1,5 du 2-Chloro-N,N-diméthylethylamine hydrochloride (1,5 éq.), du K₂CO₃ (3 éq.) et un dérivé éther couronne (le 18-crown 6, 0,04 éq.). Le mélange a été mis sous agitation pendant 15 h à 70°C. Le mélange a ensuite été ramené à température ambiante puis dilué dans du chloroforme. La phase organique a ensuite été successivement lavée au Na₂CO₃, au Na Cl et à l'eau et évaporée sous vide. Le produit obtenu a ensuite été purifié par chromatographie sur gel de silice avec comme éluant un mélange CH₂Cl₂/EtOAc/TEA 90/8/2.

I-5-8 Composés obtenus

1-(3-bromo-4-hydroxyphenethyl)-N-(4-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5a)

Obtenu à partir de l'acide **1b** et de la para-anisidine sous forme d'un solide blanc (Rdt = 65%, pf = 214-216°C).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,30 (s, 1H), 10,10 (s, 1H) 8,61 (s, 1H), 7,72 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,35 (s, 1H), 6,96 (s, 1H) 6,93 (d, J = 8,2, 1H), 6,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 4,66 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,11 (t, J = 7,1 Hz, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-D₆) δ 158,3,

154,5, 149,8, 143,4, 133,5, 131,51, 130,50, 129,7, 127,6, 122,6 (2C), 115,4 (2C), 112,9, 111,2, 56,57, 51,2, 34,5. MS (ESI, m/z) pour $C_{18}H_{17}N_4O_3Br$: $[M+H]^+$: 416,84 $[M+H+2]^+$: 418,84

1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(4-methoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide1H (5b)

Obtenu à partir de l'acide **1a** et la para-anisidine sous forme d'un solide marron (Rdt =73%, pf > 250°C)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,30 (s, 1H), 8,64 (s, 1H), 7,72 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 7,49 (s, 1H), 7,14 (d, J = 8,3, 1H), 7,01 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 4,69 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 3,8 (s, 3H), 3,74 (s, 3H) 3,17 (t, J = 7,2 Hz, 2H). RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ 158,3, 154,2, 153,3, 143,4, 133,3, 130,5, 129,9 (2C), 127,4, 122,6, 116,7 (2C), 115,4, 109,6, 55,7, 51,3, 49,06, 34,7, MS (ESI, m/z) pour $C_{19}H_{19}N_4O_3 Br$: 430,87 $[M+H]^+$, 432,87 $[M+H+2]^+$.

N-(4-(2-(diméthylamino)éthoxy)phényl)-1-(3-bromo-4-méthoxyphénethyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5c)

Obtenu à partir du **2** et du 2-chloro-N,N-diméthylethanamine (Rdt =73%, pf = 219-221°C)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,29 (s, 1H), 8,64 (s, 1H), 7,71 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,48 (s, 1H), 7,14 (d, J = 8,4, 1H), 7,01 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 4,69 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 4,04 (t, J = 5,62, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,50 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,17 (t, J = 7,2 Hz, 2H). RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ 158,5, 154,4, 143,2, 143,4, 133,5, 131,5, 130,5, 129,7, 127,3, 114,9, 113,1, 110,8, 57,6, 56,6, 51,2, 34,7, 31,10, SM (ESI, m/z) pour $C_{22}H_{26}N_5O_3 Br$: 488,19 $[M+H]^+$, 490,18 $[M+H+2]^+$.

1-(3-bromo-4-hydroxyphénethyl)-N-(4-hydroxyphényl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5d)

Obtenu à partir de l'acide **1b** et du 4-aminophénol sous forme d'un solide de couleur marron (Rdt = 68%, pf > 250°C)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,17 (s, 1H), 10,10 (s,1H), 9,24 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,57 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,37 (s, 1H), 6,96 (d, J = 8,3, 1H), 7,01 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,72 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 4,68 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 3,16 (t, J = 7,1 Hz, 2H). RMN ^{13}C (100MHz, DMSO-

d₆) δ 158,3, 154,2, 153,3, 143,4, 133,3, 130,5, 129,9 (2C), 127,4, 122,6, 116,7 (2C), 115,4, 109,6, 51,3, 34,7, SM (ESI, *m/z*) 403,02 [M+H]⁺, 405,02, [M+H+2]⁺.

1-(3-bromo-4-hydroxyphenethyl)-N-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5e)

Ce composé a été obtenu à partir de l'acide **1b** et du 4-méthoxybenzylamine (Rdt = 78%, pf = 162-164°C).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10,10 (s, 1H, OH) 8,97 (t, J = 6,2 Hz, 1H, NHCO), 8,48 (s, 1H), 7,33 (d, J=2,1 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 6,95 (dd, J = 8,3 Hz, 1H), 6,87 (d, J=8,7 Hz, 1H), 6,83 (d, J=8,2 Hz, 1H), 4,61 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 4,36 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,08 (t, J = 7,1 Hz, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 159,9, 156,6, 153,1, 143,1, 133,3, 132,1, 129,9, 129,4, 129,1(2C), 126,8, 116,6, 114,1 (2C), 109,6, 55,5, 51,2, 41,8, 34,6, SM (ESI, *m/z*) pour C₁₉H₁₉N₄O₃Br : 431,03 [M+H]⁺, 433,02 [M+H+2]⁺.

1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(4-methoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5f)

Obtenu à partir de l'acide **1a** et du 4-méthoxybenzylamine sous forme d'un solide blanc (Rdt = 85%, pf= 141-143°C)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,98 (t, J = 6,3 Hz, 1H, NHCO), 8,5 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,23 (d, J = 6,3 Hz, 2H) 7, 11 (s, 1H), 7,00 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,64 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 4,34 (d, J=6,2 Hz, 2H), 3, 79 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,13 (t, J = 7,1 Hz, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 158,7, 154,7, 143,3, 133,4, 132,2, 131,6, 130,2, 129,8 (2C), 129,2, 126,9, 114,16 (2C), 113,07, 110,9, 56,6, 55,6, 51,2, 41,8, 34,5 : SM (ESI, *m/z*) pour C₂₀H₂₁N₄O₃Br : 445,12 [M+H]⁺, 447,12 [M+H+2]⁺.

1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(4-(2-(diméthylamino)éthoxy)benzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5g)

Obtenu à partir de **3** et du 2-chloro-N,N-diméthylethylamine sous forme d'un solide blanc (Rdt = 85%, pf= 99-101°C)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,97 (t, J = 6,3 Hz, 1H, NHCO), 8,48 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,22 (d, J = 8,7 Hz, 2H) 7, 12 (s, 1H), 7,00 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 4,64 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 4,35 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 4,02 (t, J = 5,8 Hz, 2H) 3, 8 (s, 3H), 3,13 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,65 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 2,24 (s, 6H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ 160,03,

157,8, 154,5, 143,3, 133,5, 132,1, 131,3, 129,7, 129,2, 126,2, 114,7, 112,9, 110,8, 66,1, 58,1, 56,6, 51,1, 45,8 41,8, 34,4, 31,1: SM (ESI, m/z) pour $C_{23}H_{28}N_5O_3Br$: 502,12 $[M+H]^+$, 504,11 $[M+H+2]^+$

1-(4-(2-(diméthylamino)éthoxy)-3-bromophényl)-N-(4-méthoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5h)

Obtenu à partir de **5e** et du 2-chloro-N,N-diméthylethanamine sous forme d'un solide blanc (Rdt = 93%, pf= 90-92°C)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,97 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H, NHCO), 8,48 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,22 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H) 7, 12 (s, 1H), 7,00 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,88 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,64 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 4,35 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 4,02 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H) 3, 8 (s, 3H), 3,13 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,65 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 2,24 (s, 6H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 160,03, 157,8, 154,5, 143,3, 133,5, 132,1, 131,3, 129,7, 129,2, 126,2, 114,7, 112,9, 110,8, 66,1, 58,1, 56,6, 51,1, 45,8 41,8, 34,4, 31,1: SM (ESI, m/z) pour $C_{23}H_{28}N_5O_3Br$: 502,20 $[M+H]^+$, 504,17 $[M+H+2]^+$

1-(3-bromo-4-hydroxyphényl)-N-(4-hydroxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5i)

Obtenu à partir de l'acide **1b** et de 4-hydroxybenzylamine sous forme d'un solide blanc (Rdt = 57%, pf = 173-175°C)

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,08 (s, 1H, OH) 9,25 (s, 1H, OH), 8,88 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H, NHCO), 8,47 (s, 1H), 7,34 (d, $J=2,1$ Hz, 1H), 7,11 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 6,94 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,82 (d, $J=8,3$, 1H), 6,69 (d, $J=8,3$ Hz, 2H), 4,60 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 4,31 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,07 (t, $J = 7,1$ Hz, 4H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 159,9, 156,6, 153,1, 143,1, 133,3, 130,2, 129,9, 129,4 (2C), 129,1, 126,8, 116,6 (2C), 115,4, 109,6, 51,2, 40,4, 34,6. SM (ESI, m/z) pour $C_{18}H_{17}N_4O_3Br$: 417,01 $[M+H]^+$; 419,01 $[M+H+2]^+$

N-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl)-1-(3-bromo-4-hydroxyphényl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5j)

Obtenu à partir de l'acide **1b** et du 3,5-dibromo-4-hydroxybenzylamine (Rdt = 85% ; pf: 214-216°C).

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,09 (s, 1H, OH), 9,83 (s, 1H, OH), 9,10 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H, NHCO), 8,50 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,96 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,83 (d, $J=8,3$, 1H), 4,61 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,32 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,07 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H). RMN

^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 160,2, 153,3, 150,1, 142,9, 133,5, 131,8, 130,0, 129,4, 127,0, 116,9, 112,2, 109,5, 79,6, 51,3, 34,5, 29,5. SM (ESI, m/z) pour $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3\text{Br}_3$: 572,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 574,8 $[\text{M}+\text{H}+2]^+$

1-(3-bromo-4-hydroxyphenethyl)-N-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5k)

Obtenu à partir de l'acide **1b** et du 4-methoxyphenethylamine (Rdt = 88%, pf 171-173°C).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 10,11 (s, 1H, OH), 8,48 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, NHCO), 8,44 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,13 (d, $J=8,7$ Hz, 2H), 6,94 (dd, $J = 8,2, 2,1$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J=8,7$, 2H), 6,82 (d, $J=8,3$ Hz), 4,60 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,41 (m, 2H), 3,07 (t, $J=7,2$ Hz, 2H), 2,76 (t, $J=7,2$ Hz). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 160,0, 158,1, 153,1, 143,1, 133,3, 131,7, 129,9 (2C), 129,4, 126,7, 116,7, 114,2, 109,6, 55,4, 51,3, 34,7, 34,6. SM (ESI, m/z) pour $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3\text{Br}$: 445,09 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 447,09, $[\text{M}+\text{H}+2]^+$

1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(4-hydroxyphenethyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5l)

Obtenu à partir de l'acide **1b** et du 4-aminoéthyle-2,6-dibromophénol (Rdt = 88%, pf = 164-166°C).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,09 (s, 1H, OH), 9,83 (s, 1H, OH), 9,10 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H, NHCO), 8,50 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,96 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,83 (d, $J=8,3$, 1H), 4,61 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,32 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,07 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- D_6) δ 160,2, 153,3, 150,1, 142,9, 133,5, 131,8, 130,0, 129,4, 127,0, 116,9, 112,2, 109,5, 79,6, 51,3, 34,5, 29,5. SM (ESI, m/z) pour $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3\text{Br}_3$: 572,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 574,8 $[\text{M}+\text{H}+2]^+$

1-(3-bromo-4-hydroxyphenethyl)-N-(4-methoxyphenethyl)-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide (5m)

Obtenu à partir du **5i** et du 2-chloro-N,N-dimethylethanamine (Rdt = 88%, pf 100-102°C).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 8,46 (s, 1H), 8,43 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, NHCO), 7,46 (s, 1H), 7,12 (d, $J=2,1$ Hz, 2H), 7,03 (dd, $J = 8,2, 2,1$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J=8,7$, 2H), 6,67 (d, $J=8,3$ Hz), 4,64 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,13 (t, $J = 5,1$ Hz, 4H), 4,04 (t, 4H), 3,38 (m, 2H), 3,07 (t, $J=7,2$ Hz, 2H), 2,76 (t, $J=7,2$ Hz), 2,68 (dd, 4H) 2,27 (s, 6H), 2,26 (s, 6H). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 160,0, 158,1, 153,1, 143,1, 133,3, 131,7, 129,9 (2C), 129,4, 126,7, 116,7, 114,2,

109,6, 55,4, 51,3, 34,7, 34,6. SM (ESI, m/z) pour $C_{27}H_{37}N_6O_3Br$: 573,22 $[M+H]^+$; 575,21, $[M+H+2]^+$.

II-Bio-essais

Les bio-essais ont consisté à évaluer les activités des différents analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole dans diverses conditions. Il y a eu trois principaux types de tests réalisés, en différents sites.

- Bio-essais anti-adhésion et anti-biofilms sur bactéries marines, réalisés au laboratoire MAPIEM (université de Toulon, France)
- Tests d'écotoxicité des molécules synthétisées, réalisées au laboratoire MIO (université de Toulon, France)
- Tests sur *Candida albicans*, réalisés au département de parasitologie-mycologie de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire)

Le matériel et les méthodes utilisés pour ces différents essais sont ici énumérés.

II-1 Matériel utilisé

Avant chaque utilisation, le matériel et les consommables, les solutions et les milieux de cultures ont été stérilisés à l'autoclave (Systec, 5050 MLV).

II-1-1 Solutions et milieux de culture

II-1-1-1 Väättänen Nine Salt Solution (VNSS) / VNSS Agar (225)

Le milieu VNSS a été utilisé pour la croissance des souches bactériennes. Pour 1L de solution, il est constitué de (NaCl (17,6 g), Na_2SO_4 (1,47 g), $NaHCO_3$ (0,08 g), KCl (0,25 g), KBr (0,04 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (1,87 g), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,41 g), $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,01 g) et H_3BO_3 (0,01g), peptone (1 g), extrait de levure (0,5 g), glucose (0,5 g), amidon soluble (0,5 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g) et Na_2HPO_4 (0,01 g). Après stérilisation par autoclavage, le VNSS peut être utilisé immédiatement ou conservé durant un mois à température ambiante.

Le milieu VNSS était utilisé soit sous forme liquide, soit sous forme solide. Dans ce second cas, 15 g d'agar bactériologique (Sigma Aldrich®) sont additionnés à 1L de la solution de VNSS [1,5% (p/v)]. L'agar est solubilisé dans le VNSS liquide par chauffage à ébullition. Après stérilisation à l'autoclave, le VNSS-agar a été coulé en boîtes de Pétri (ronde en Polystyrène de Ø 90 mm, Gosselin, Hazebrouck, France). Celles-ci sont conservées à 4°C.

II-1-1-2 Eau de mer artificielle (ASW : Artificial Sea Water)

Ce milieu, a une composition qui correspond approximativement à celle de l'eau de mer. Dépourvu de source de carbone, il permet de simuler les conditions physico-chimiques de l'environnement marin, milieu naturelle des souches bactériennes utilisées en les maintenant en vie tout en bloquant leur croissance. Il a été utilisé pour réaliser la formation de biofilms des souches bactériennes marines dans des conditions reproductibles.

L'eau de mer artificielle est préparée par la dissolution à une concentration de 36g.L⁻¹ de la poudre commerciale (Sigma Aldrich, France) dans de l'eau déminéralisée. Après solubilisation, la solution obtenue est filtrée, stérilisée par autoclavage et conservée à température ambiante.

II-1-1-3. Solution de chlorure de sodium (NaCl)

Les solutions de NaCl ont été utilisées pour réaliser des lavages des microplaques afin d'éliminer les bactéries planctoniques et ne conserver que celles ayant adhéré. Pour obtenir cette solution, 36 g de NaCl (Sigma Aldrich, France) sont introduits dans 1 L d'eau déminéralisée. Après stérilisation à l'autoclave, la solution de NaCl est conservée à température ambiante.

II-1-1-4 Yeast Peptone Dextrose (YPD)

Il s'agit d'un milieu riche, non sélectif, constitué à 20% de levure, 10% de peptone et 20% de glucose. Il permet la croissance des souches de *Candida albicans*.

Le milieu YPD liquide est préparé en dissolvant 50g de milieu dans 1l d'eau distillée. Après agitation, il est stérilisé à l'autoclave puis conservé à température ambiante pendant un mois au maximum.

Pour la préparation de milieu YPD solide, 15g d'agar a été ajouté pour obtenir un litre de solution YPD agar. Après stérilisation à l'autoclave, le milieu a été coulé en boîte de pétri de 90 mm de diamètre et les boîtes conservées à 4°C. Elles ont permis, après remise en température ambiante, de relancer la croissance des souches de levures conservées.

II-1-1-5 RPMI 1640 + L-glutamine

Le milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 est un milieu permettant la culture et le développement de cellules eucaryotes. Ici, supplémenté en L-glutamine et additionné de phénol rouge comme indicateur coloré (Gibco, GB), il a été utilisé pour réaliser les biofilms de

C. albicans. Dilué à raison de 2g pour 1 litre de solution et neutralisé avec le l'acide morphonlinopropanesulphonique (MOPS, Fisher, France) à pH7. Le milieu est ensuite stérilisé par filtration sur filtre à 0.2 µm.

II-1-1-6 Solution de tampon phosphate salin ou Phosphate Buffered Saline (PBS)

La solution de PBS a été utilisée pour laver des microplaques pour les tests antibiofilms et également, pour préparer diverses solutions de réactifs et de marquage. Elle est composée de NaCl 8 G/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L. Après dissolution des différents sels dans de l'eau déminéralisée, la solution obtenue est stérilisée à l'autoclave.

II-1-2 Fluorochromes et réactifs de révélation

II-1-2-1 SYTO[®] RED 61

Il permet de marquer la totalité des bactéries adhérees aux plaques. Il s'agit d'un marqueur des acides nucléiques. Utilisé dans la révélation des bio-essais anti-adhésions, il permet de quantifier les bactéries adhérees à la surface. La longueur d'onde d'excitation est de 633 nm et elle fluoresce dans le rouge, avec une longueur d'onde d'émission entre 645 et 700 nm.

II-1-2-2 Cristal Violet

Il s'agit d'une petite molécule qui diffuse à travers les membranes et pénètre à l'intérieur des cellules pour se complexer aux molécules chargées négativement, notamment les acides nucléiques. Il a été utilisé pour la quantification des biofilms de *C. albicans* par une lecture de la densité optique à 590 nm, par absorbance. En effet, celle-ci sera directement proportionnelle à la quantité de molécules présentes, donc à la densité de cellules présentes et à l'importance du biofilm.

II-1-2-3 Résazurine

La résazurine (Sigma Aldrich, France) a été utilisée pour l'évaluation de la toxicité des composés sur les bactéries marines. Il s'agit d'un indicateur d'oxydo-réduction, qui a permis la mesure de la viabilité des bactéries marines après contact avec les composés évalués. Non fluorescente et de couleur bleue sous sa forme réduite, elle devient rose et fluorescente (longueurs d'ondes : $\lambda_{ex} = 575$ nm et $\lambda_{em} = 585$ nm).

II-1-3 Matériel biologique : Souches

II-1-3-1 Souches bactériennes

6 souches de bactéries marines ont été utilisées pour les bio-essais de molécules. Il s'agissait de 5 souches méditerranéennes et d'une souche provenant de la côte bretonne. Les souches méditerranéennes ont été isolées à partir de biofilms naturels colonisant des plaques en silicone (20X15, Intersleek 760[®], International Paint Limited) immergés à une profondeur de 1 m. (226,227) il s'agissait de :

- *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8
- *Pseudoalteromonas ulvae* TC14
- *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4
- *Shewanella* sp. TC11
- *Shewanella* sp. TC10-pX5-GFP : cette souche a été obtenue par conjugaison en utilisant *E. coli* WM3064 comme donneur de plasmide. (16)

La souche *Paracoccus* sp. 4M6 a été quant à elle isolée à partir d'une lame de verre immergée dans le Golfe du Morbihan à une profondeur de 1m. Elle a été fournie par le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine (LBCM) de l'Université de Bretagne Sud (UBS) (228).

Les souches sont conservées en cryotubes à -80°C. Les cryotubes sont préparés à partir de mélange 50%/50% de glycérol stérile et suspension bactérienne en phase exponentielle dans du VNSS.

II-1-3-2 Souches de *Candida albicans*

Les 3 souches ont été fournies par l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Elles ont été prélevées chez des professionnelles du sexe de la ville d'Abidjan. Il s'agissait de souches sensibles aux antifongiques classiques.

- IPCI n° 17649 : sujet de 29 ans
- IPCI n° 17650 : sujet de 30 ans
- IPCI n° 17651 : sujet de 37 ans

II-2 Méthodes

II-2-1 Bio-essais *in vitro* sur bactéries marines

II-2-1-1 Bio-essais anti-adhésion

Ce test, mis au point lors des travaux de thèse de CAMPS (2011) et OTHMANI (2014) consiste à évaluer la capacité des composés à inhiber l'adhésion des souches modèles à une surface en polystyrène.

A partir des suspensions stock cryogénisées, les souches bactériennes sont au préalable ensemencées en boîte de pétri sur milieu VNSS-agar. La veille du test, au soir, une pré-culture est réalisée à partir d'une colonie de la souche bactérienne mise en croissance toute la nuit dans du VNSS liquide. A partir de cette culture, 10 ml de VNSS liquide sont ensemencés à une $D.O._{600nm}=0,1$). Cette nouvelle suspension bactérienne est mise en croissance à 20°C sous agitation (120 rpm) jusqu'à l'atteinte du début de la phase post-exponentielle. Le délai requis a été préalablement déterminé par étude des courbes de croissance des différentes souches (6 à 7h pour la TC8, 10 à 11h pour la TC14 et 6 à 7h pour la 4M6, 7-8h pour TC10, 7-8h pour TC11, 11-12h pour TC4).

Une fois la phase stationnaire atteinte, la suspension bactérienne est mise à centrifuger à 6000 rpm pendant 10 min. Ensuite le surnageant (milieu de culture) est éliminé et le culot bactérien est remis en suspension dans de l'ASW à un volume permettant d'obtenir une $D.O._{600nm}=0,8$. Cette suspension servira d'inoculum pour l'ensemencement des plaques utilisées pour le test.

Les microplaques utilisées sont des microplaques noires à fond plat. L'ensemencement de la microplaque est effectué selon le schéma représenté dans la Figure 2. Chaque plaque est remplie d'un volume de 200µl Le remplissage des plaques est basé sur le principe suivant

- Les colonnes extrêmes (1 et 12) : constituaient le « blanc plaque » et contiennent uniquement de l'ASW.
- Les lignes extrêmes (A et H) constituaient les blancs composés. Elles sont remplies avec 100 µL d'ASW et le composé à évaluer. Elles permettent de vérifier l'absence d'interaction entre le composé et le fluorochrome utilisé.
- Les bactéries ont été ensemencées dans tous les autres puits, avec 100 µL de suspension bactérienne (conduisant à une $D.O._{600nm} = 0,4$)

- Les colonnes 2 à 5 et 8 à 11 contiennent les gammes de concentration des composés à évaluer. Les composés, préalablement solubilisés dans du DMSO, ont été dissouts à 7 concentrations différentes dans de l'ASW. Les concentrations sont préparées au double de la concentration finale recherchée. Pour chaque concentration, 4 puits sont remplis : le plus externe (ligne A ou H) constituera le blanc composé (rempli avec 100 μ L du composé et 100 μ L d'ASW). Les 3 autres permettront de réaliser un triplicat de la mesure à la concentration considérée.
- Les puits E5 à H5 et E11 à H11 contenaient le témoin biocide positif d'activité, dans ce cas du TBTO à 15 μ M.
- La colonne 6 contenait le témoin bactérien, remplie uniquement de suspension bactérienne dans de l'ASW. Les puits de cette colonne constituent le témoin inoculum, servant de référence pour une adhésion sans biocide.
- La colonne 7 contenait le témoins solvant, réalisé avec une concentration de DMSO à 4% (2% en concentration finale dans les puits) qui correspond à la concentration maximale de DMSO retrouvée dans les puits avec composé. Il permet de s'assurer que l'effet rencontré n'est pas lié à l'action du DMSO.

Les plaques, une foisensemencées étaient mises à incuber le temps nécessaire pour leur permettre d'adhérer à la plaque, soit 15 à 20H.

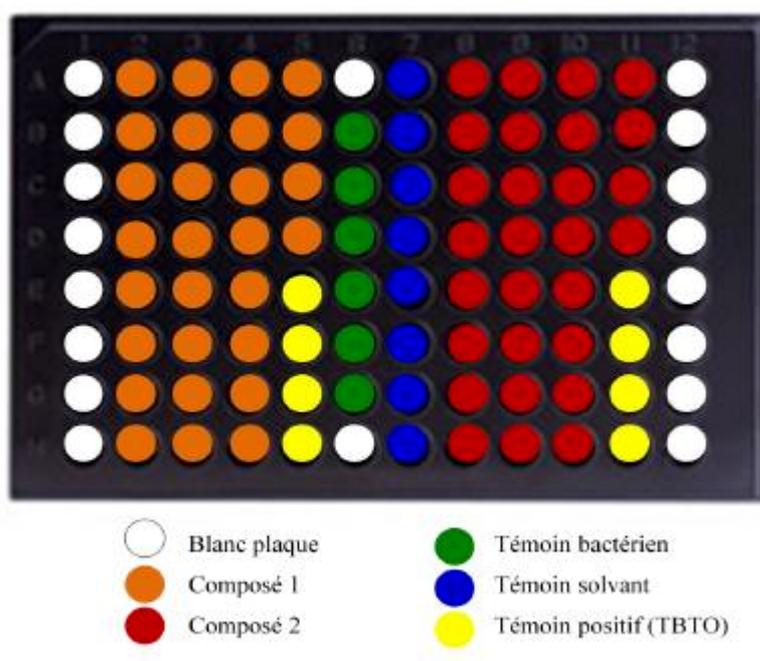


Figure 57 : Schéma d'ensemencement des microplaques pour le bio-essai anti-adhésion.

Après incubation, les plaques étaient préparées pour marquage et lecture. La première étape consiste en l'élimination des bactéries planctoniques pour ne conserver que celles ayant adhéré. La microplaque est retournée, puis lavée à 3 reprises avec une solution de NaCl (200 µL par puit). Les bactéries adhérentes sont alors marquées avec le SYTO® RED 61 (1µM) puis mises à l'obscurité pour une incubation de 20 min. L'excès de SYTO® RED 61 est ensuite éliminé par retournement de la microplaque et un seul lavage au NaCl (36 g.L⁻¹). La lecture de la microplaque est effectuée à l'aide du lecteur de microplaque Infit M 200 pro (TECAN) et la fluorescence (IF) est déterminée.

Pour l'analyse des données, le pourcentage d'adhésion pour chaque puits a été calculé de la manière suivante :

$$\% \text{adhésion} = (\text{IF}_T - \text{IF}_{\text{Pdt}}) / (\text{IF}_{\text{TB}} - \text{IF}_{\text{Blc}}) \times 100$$

Avec : * IF_T = Moyenne des triplicats d'IF pour chaque concentration testée (composé + bactéries + fluorochrome)

* IF_{Pdt} = IF du produit seul en présence du fluorochrome sans bactéries

* IF_{TB} = Moyenne des six replicats d'IF du témoin d'adhésion bactérienne (bactéries + fluorochrome)

* IF_{Blc} = Moyenne des blancs (ASW + fluorochrome).

Le ratio IF_T / IF_{Pdt} est un indicateur de l'adhésion bactérienne. Il doit être supérieur à 2,5 pour témoigner d'une bonne adhésion bactérienne (226)

Les analyses des résultats de bio-essais ont ensuite été déterminées par calcul à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) qui permet de tracer la courbe sigmoïde dose-réponse [% adhésion = f (Log Ci), et de déterminer une CE₅₀ pour chaque composé. Pour chaque couple bactérie/composé, le test a été réalisé à 3 reprises, ce qui a permis de déterminer les moyennes et écart-types des CE₅₀.

II-2-1-2 Test d'inhibition de croissance/toxicité

II-2-1-2-1 Inhibition de la croissance

Le suivi de la croissance lors de ce test se fait directement en microplaque transparente de 96 puits en polystyrène à fond plat. Il consiste à réaliser une courbe de croissance de la souche bactérienne en présence de 100 μM du composé étudié.

Le test débute, comme avec le test anti-adhésion, par la mise en croissance d'une colonie de la souche bactérienne dans du VNSS. Ensuite, une suspension bactérienne de $\text{D.O.}_{600\text{nm}}=0,1$ dans du VNSS est préparée et mise en croissance pendant une heure, puis transférée en microplaques de 96 puits. Les plaques sont remplies en suivant les mêmes principes que pour le test anti-adhésion, mais avec du VNSS plutôt que de l'ASW (pour permettre la croissance bactérienne) : blancs composés, témoins bactéries, et triplicat pour chaque molécule (mais avec des solutions à 200 μM , soit 100 μM en concentration finale). Le témoin d'inhibition choisi était l'éthanol.

Dès ajout de l'inoculum, la $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ est mesurée à l'aide du TECAN et la plaque est mise à incuber à 20°C et sous agitation (120 rpm). Cette première mesure permet de noter le T0. La plaque est retirée de l'incubation chaque heure pendant 6H, afin de tracer la courbe de croissance, grâce à l'évolution de la $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$.

II.2.1.2.2 Test de toxicité des composés

Ce test vise à déterminer si le composé a une activité bactéricide vis-à-vis des souches bactériennes cibles. Il est réalisé dans les mêmes microplaques que le test de croissance.

A la fin du temps imparti, 50 μL de résazurine (20 μM dans de l'ASW) sont ajoutés dans les puits. Les plaques sont mises à incuber 2H à l'obscurité sous agitation (20°C à 120 rpm). La fluorescence est ensuite lue au lecteur de microplaques TECAN ($\lambda_{\text{ex}} = 575 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 585\text{nm}$). Les données sont traitées comme avec le test anti-adhésion afin de déterminer le pourcentage de viabilité des bactéries en présence de composé anti-adhésion par rapport à la bactérie seule.

II.2.1.3 Evaluation de l'effet des molécules par microscopie confocale

La méthode d'évaluation de l'activité sur biofilm multisouches a été mise au point à partir de celle utilisée par Guilloneau pour l'étude des interactions souches bactériennes

différentes dans un biofilm (16). Elle a été réalisée avec les souches TC4, TC10-pX5-GFP et TC11.

II.2.1.3.1 Marquage des souches bactériennes

- Ensemencement et formation du biofilm

Les bactéries sont mises en croissance jusqu'à leur phase stationnaire en VNSS, comme vu précédemment pour le test anti-adhésion. Toutefois, l'heure de mise en culture prend en compte la nécessité de faire coïncider les phases stationnaires, avant de réaliser des biofilms multispécifiques. Après centrifugation, les souches sont remises en suspension dans de l'ASW à une D.O. de 0.6. Les bactéries sont mises à ensemercer dans des microplaques à 24 puits, ceux-ci ayant au préalable reçu des coverslip stérilisés 20 min aux UV. Les plaques sont ensemencées avec les suspensions bactériennes diluées au 1/6 avec ou sans molécule (concentration 600 μM dans ASW) selon le plan décrit dans la figure 2

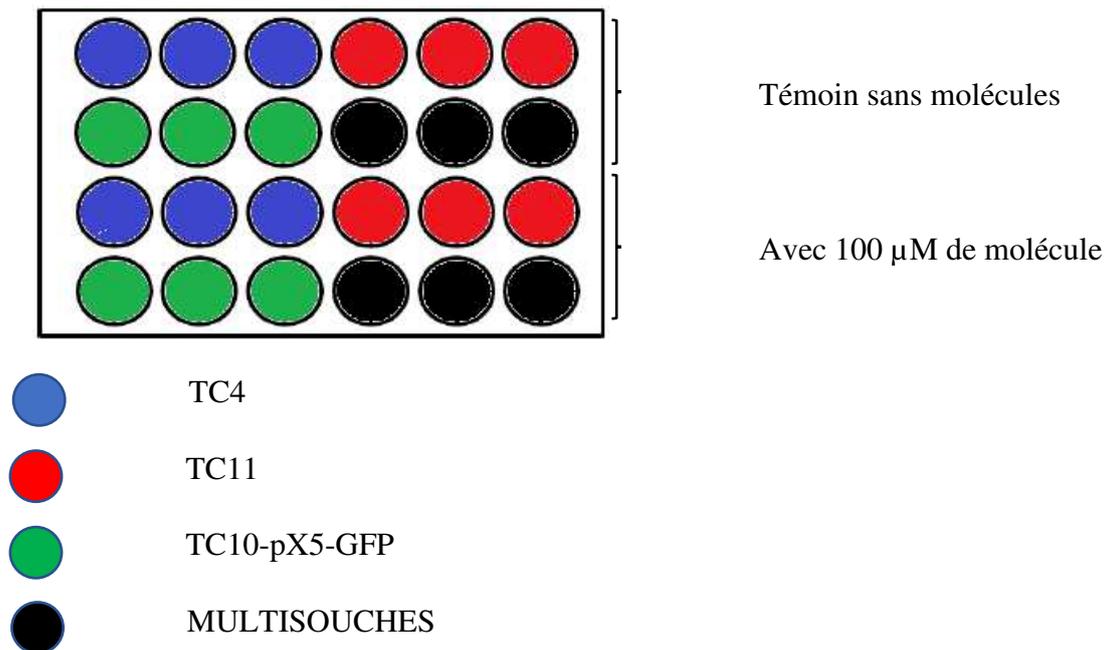


Figure 58: schéma d'ensemencement des microplaques pour le marquage des souches bactériennes

Afin d'obtenir une D.O. finale 0,1 dans les puits et une concentration de 100 μM dans chaque puits, dilution se fait comme suit

- Puits monospécifiques sans molécule : 1/6 de suspension bactérienne dans de l'ASW

- Puits multispécifiques sans molécule : 1/6 de chaque suspension bactérienne plus 1/2 d'ASW
- Puits monospécifiques avec molécule : 1/6 de suspension bactérienne, 1/6 de molécule et 2/3 d'ASW
- Puits multispécifiques avec molécule ! 1/6 de chaque bactérie, 1/6 de solution de molécule, 1/3 d'ASW

Après 24h d'incubation en condition statique, les plaques sont rincées 3 fois avec 1 mL d'ASW. Les cellules sont ensuite fixées par ajout d'une solution de formaldéhyde à 3,7% dans du PBS 1X durant 20 min. Les puits sont ensuite une nouvelle fois rincés 3 fois au PBS et conservés pour l'immunomarquage qui peut être effectué ultérieurement.

- Marquage
 - Blocage 1 : cette étape permet de masquer les sites antigéniques aspécifiques afin d'éliminer le bruit de fond. Il se fait par ajout de 500µL de BSA à 3% dans du PBS 1X. Les plaques sont alors laissées à incuber à 4°C durant la nuit.
 - Ajout des anticorps primaires : des solutions d'anticorps primaires sont préparées aux concentrations suivantes dans une solution de BSA

Souches	Espèce	de	Concentration
l'anticorps			
TC4	Poulet		1/300
TC11	Lapin		1/300

Les plaques sont vidées par retournement puis 300 µL des solutions d'anticorps sont ajoutés aux puits correspondant à leurs cibles. Une solution contenant les trois anticorps en même temps est préparée et ajoutée dans les puits de la plaque contenant le mélange bactérien. Les puits contenant uniquement la bactérie TC10 pX5-GFP subissent le même traitement avec uniquement la solution de BSA à 3%. Les plaques sont incubées durant une heure à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm.

- Blocage 2 : Les plaques sont vidées par retournement puis trois rinçages au PBS 1X sont effectués. Une solution de blocage de BSA à 3% est ajoutée dans chaque puits à hauteur de 700 µL/puits. Les plaques sont incubées durant 2h à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm.

- Ajout des anticorps secondaires : Des solutions d'anticorps secondaires sont préparées aux concentrations suivantes avec ou sans DAPI dans de la BSA à 3%, suivant qu'il s'agit de marquages mono ou multispécifiques

Tableau 16: préparation pour les marquages monospécifiques

Souches	Type	Espèces	Fluorochrome	Concentration
TC4	Anti-poulet	Chèvre	FITC (490/525)	1/2000
			DAPI	5µg /mL
TC11	Anti-lapin	Ane	Alexa fluor 594 (581/609)	45µL/mL
			DAPI	5µg/mL
TC10-PX5			DAPI	5µg/mL

Tableau 17: préparation pour les marquages multisouches

Souches	Type	Espèces	Fluorochrome	Concentration
TC4	Anti-poulet	Chèvre	Alexa fluor 405 (404/421)	1/500
TC11	Anti-lapin	Ane	Alexa fluor 594 (581/609)	45µL/mL

100 µL de marqueurs AcII sont déposés sur une feuille de parafilm. Les coverslips sont retirés des microplaques à l'aide d'un cure-dents et d'une pince plate. Après avoir été égouttées elles sont déposées sur la goutte de fluorochrome. Elles sont incubées 1h pour TC4 et les multisouches et 30 minutes pour les TC11 et TC10-pX5-GFP. Les coverslips sont ensuite rincés en étant plongés dans des gouttes d'eau distillée. Après avoir été égouttés, les coverslips sont montés sur lame porte-objet avec du prolong diamond antifade. Les montages sont laissés à polymériser 24h au moins pour observation ultérieure. Les échantillons peuvent être conservés 6 mois à 1 an à 4°C.

Les biofilms sont observés par microscopie confocale en utilisant comme longueurs d'onde

- TC4 405 nm
- TC10-pX5-GFP : 488 nm
- TC11 : 594 nm

II-2-1-3-2 Traitement des données

Les images ont été traitées en utilisant le plugin COMSTAT2 utilisé sur ImageJ (229,230). Le biofilm étant une structure tridimensionnelle, le traitement d'images à l'aide de ses outils permet d'apprécier le biovolume du biofilm, avec ou sans molécule, permettant ainsi de mesurer l'impact de celles-ci sur le biofilm.

II-2-2 Evaluation de l'impact des molécules sur la viabilité d'organismes marins

Il s'est agi d'une étude préliminaire des potentiels effets écotoxiques de composé sur les communautés planctoniques (zoo, pico et nanoplancton) de la rade de Toulon.

II-2-2-1 Site d'étude et mode de prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés dans la Petite rade de Toulon, dont la situation géographique est présentée sur la figure 56.

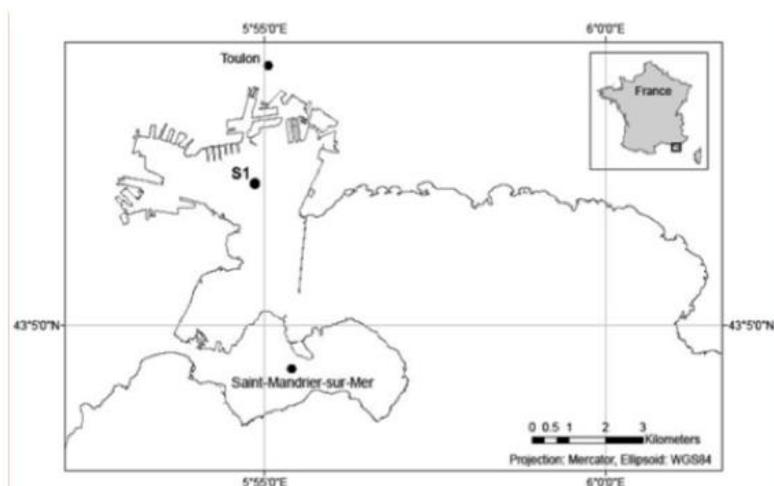


Figure 59: carte représentant la situation de la rade de Toulon avec S1, point de prélèvement

La rade de Toulon (Lat. 43°5'N et Long. 6°0'E) est délimitée au Sud par la presqu'île de St-Mandrier et à l'Est par la presqu'île de Giens. Elle est séparée en deux parties par une digue formant ainsi 2 écosystèmes couplés : la Petite rade et la Grande rade. La petite rade est un système semi-fermé avec une grande activité humaine : Port militaire, transport maritime, industries (231–233). La Grande rade par contre présente une concentration plus faible en contaminants et se caractérise par une plus grande diversité de zooplancton mais avec des abondances plus faibles (234).

En ce qui concerne le zooplancton, si de nombreux crustacés, mollusques et protozoaires sont retrouvés, l'espèce prédominante pour le zooplancton est, *Oithona nana* en particulier dans

la petite rade (235). Concernant les communautés pico et nano phytoplanctoniques locales, plusieurs populations ont été mises en évidence : les picoeucaryotes, les *Cryptophycées*, *Synechococcus sp.*, *Prochlorococcus sp.* ou encore les nanoeucaryotes qui sont le plus représentés.

Les prélèvements d'organismes ont été réalisés à l'aide d'un trait de filet de 90µm de vide à maille en prenant un échantillon sur 6m de profondeur pour le zooplancton. Le pico/nanophytoplancton, a été prélevé au niveau des eaux de surface et filtrées à 90µm.

Une fois prélevés, les échantillons ont été rapidement transportés au laboratoire MIO de l'université de Toulon pour être préparés en vue des tests.

II-2-2-2 Préparation des cultures zooplanctoniques

La préparation a consisté à séparer l'eau de mer prélevée pour les tests sur le zooplancton de façon à réaliser 3 conditions de culture

- Une condition témoin, avec uniquement de l'eau de mer
- Une condition témoin solvant, contenant du DMSO : la molécule ayant été au préalable solubilisée dans ce solvant, cette condition visait, comme précédemment, à vérifier que l'effet observé n'était pas dû au solvant
- La condition test, avec le composé dissout à 100 µM

Chaque condition a été réalisée en triplicat.

Les échantillons ont été placés en culture en chambre thermostatée à 20°C en suivant un cycle jour/nuit (12H/12H) et oxygénés par le biais d'une pompe *AP500L Grauvell*.

II-2-2-3 Préparation des cultures phytoplanctoniques

500mL de l'échantillon d'eau de mer préalablement filtrée sur un tamis avec des mailles de 90µm sont de nouveau filtrés sur des membranes en polycarbonate à 10µm (Wathmann nuclepore), puis insérés dans des bouteilles présentant les différentes conditions d'études, comme précédemment, réalisées en triplicat Les bouteilles sont conservées en chambre thermostatée à 20°C en suivant un cycle jour/nuit (12h :12h).

II-2-2-2-4 Suivi de la communauté zooplanctonique

Quotidiennement, 25 mL d'échantillon étaient prélevés dans chacun des erlenmeyers. A ce stade, une première observation était réalisée au microscope optique afin d'évaluer la

vitalité des organismes en fonction de l'échelle de vitalité : numérotée de 0 à 5, où 0 représente un groupe d'organismes en mauvais état ou au fonctionnement altéré et à l'opposé, 5 un groupe d'organismes en parfait état et au fonctionnement non altéré. En comparant les résultats obtenus entre les différentes conditions, il était possible de constater l'effet du composé sur la vitalité.

Tableau 18: estimation de la vitalité en fonction de la proportion d'individus en état de fonctionnement ou non altéré

Vitalité	0	1	2	3	4
Proportion d'individus	0%	20%	40%	60%	80%

Après la première observation au microscope, les échantillons étaient fixés au formaldéhyde à 5% et un comptage était effectué selon la méthode de Hensen-Stemple (236), permettant d'évaluer l'évolution de l'abondance des espèces étudiées

II-2-2-5 Suivi des populations pico- et nano-phytoplanctoniques et bactériennes

Il s'est également ici agi de suivre quotidiennement l'abondance et la viabilité des populations, mais cette fois-ci par cytométrie en flux. Les bactéries sont marquées par le SYBR GREEN[®] qui permet de marquer les acides nucléiques. En complément, l'état de viabilité a été obtenu en marquant les cellules au SytoxGreen pour le pico/nanophytoplancton et à l'iodure de propidium pour les bactéries. Ces marqueurs, qui se fixent également à l'ADN, n'ont la capacité de pénétrer uniquement dans les cellules dont la membrane est altérée. Pour le phytoplancton, le SytoxGreen a été ajouté à une concentration de 0,5 μ M, avec incubation 20 minutes à l'obscurité. Dans le cas des bactéries, l'iodure de propidium a été ajouté à une concentration de 1mg/mL.

II-2-2-6 Indices de diversité

La richesse spécifique (S) à T₀ et T_{final}, les indices de diversité de Shannon et de Piélu ont été calculés (234). Ils ont permis, en comparant les différentes conditions, d'évaluer l'impact du composé sur la structure et l'abondance des communautés étudiées.

II-2-2-7 Analyses statistiques

L'ensemble des expériences a été réalisée en triplicat, les valeurs douteuses ont été testées par le biais d'un test de *Dixon* et enlevées si elles s'avéraient aberrantes. Les différences ont été pour la plupart comparées par tests Anova afin de déterminer si celles-ci étaient

statistiquement significatives. Les tests de *Wilcoxon-Mann-Withney* et de *Tukey* ont été réalisés afin de comparer la distribution des données dans les différentes conditions deux à deux. L'ensemble du traitement statistiques a été réalisé via le logiciel *Rstudio*. Plusieurs annotations seront présentées en fonction du degré de différence significative ; (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ et (***) $p < 0,001$, ainsi que les lettres *a, b, c* en cas de différence significative à un temps T, et A, B et C en cas de différence significative sur toute la courbe.

II-2-3 Bio-essais sur *Candida albicans*

Ces tests ont consisté à évaluer l'activité anti-biofilm de molécules sur *C. albicans* puis à mesurer leur CMI en comparaison au fluconazole pour vérifier s'il s'agit d'une activité antibiofilm spécifique, comme dans le cas des bactéries marines.

II-2-3-1 Test anti-biofilm

Il s'agit également d'évaluer la capacité des molécules à inhiber la formation d'un biofilm par *C. albicans* en microplaques de polystyrène, mais cette fois transparentes et à fonds plats. (220,221,237)

A partir de colonie d'une souche de *C. albicans* mise en culture sur milieu YPD solide, 10 ml de YPD liquide sont ensemencés stérilement et mise à incuber à 30°C toute la nuit (12-14H). La suspension est ensuite mise à centrifuger à 3000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est rejeté et le culot est mis en suspension dans du PBS puis centrifugé afin d'être débarrassée de toute trace de YPD. Après lavage, Une suspension de densité cellulaire 10^6 cellules /ml dans du RPMI 1640 est préparée et permet d'ensemencer les microplaques, selon le même plan que pour les tests anti-adhésion.

Après 48H d'incubation en mode statique, les puits sont rincés 3 fois avec du PBS. Le cristal violet à une concentration de 1% est ensuite ajouté dans les puits et la plaque est mise à incuber 30 minutes. Les plaques sont à nouveau lavées et le colorant fixé par le champignon est remis en solution par l'acide acétique à 30 volumes pendant 15 min. La densité optique est lue à 590 nm au lecteur de plaque ELISA et les résultats obtenus sont analysés comme précédemment.

II-2-3-2 Test de sensibilité

La méthode utilisée a été la méthode standard du CLSI, la microméthode de dilution en milieu liquide (238). Elle permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des molécules. La méthode a été réalisée en utilisant une culture de 24H de levure sur une boîte de

YPD solide. Les gammes de dilution des molécules et des levures sont préparées afin de réaliser la méthode. Les molécules à tester et le fluconazole comme référence sont pesés pour la préparation de solution stock selon la formule

$$\text{Masse (mg)} = \text{volume (ml)} \times \text{concentration } (\mu\text{g/ml}) / \text{activité spécifique } (\mu\text{g/mg})$$

L'activité spécifique du fluconazole selon la fiche technique est de 99.64% et celle de la molécule à tester considérée à 100%.

A partir d'une solution mère, avec la molécule, les concentrations testées vont de 0,125 à 64 $\mu\text{g/mL}$, diluées dans du RPMI 1640. La solution mère de levure quant-à elle est préparée à 10^6 cellules/ml. Cet inoculum est dilué au 1/1000^{ème} dans du RPMI. . Ensuite, 100 μl sont répartis dans chaque puits de la plaque excepté la colonne 11 (contrôle de stérilité) (tableau 6). Les plaques sont incubées à 37°C pendant 72 heures. La plaque est remplie selon le plan suivant

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0	0
--	----	----	----	---	---	---	---	-----	------	-------	---	---

Figure 60: schéma du plan de plaque pour la détermination de la CMI

Colonne 11 : Milieu sans antifongique et sans levures

Colonne 12 : Milieu sans antifongique mais avec levure

Les plaques sont lues après 48H au lecteur de plaques.

II-2-3-3 Marquage et visualisation en microscopie confocale

Les levures sont mises en croissance et comptées dans les mêmes conditions que pour le test anti-biofilm (II-2-3-1). La culture est ensuite transférée dans du RPMI 1640 et mise à incuber dans des microplaques à 24 puits contenant des coverslips, avec ou sans inhibiteur (100 μM de concentration finale). A la fin des 48H d'incubation, les coverslips sont lavés comme précédemment au PBS, puis marquées au SYTO 9 (2,5 μM de SYTO 9, incubation 20 min à 35°C). Après un dernier lavage, les coverslips ont été fixées au prolong Diamond antifade sur lames. La lecture se fait à une longueur d'onde de 488 nm.

Références bibliographiques

1. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*. 2013 ; 121:1-58.
2. Natarajan KA. Biofouling and Microbially Influenced Corrosion. In: *Biotechnology of Metals Elsevier*; 2018 p. 355-93.
3. Videla HA. Biofouling and Microbially Influenced Corrosion. 1992 ; 29 195-212
4. *BIOFILM-BASED NOSOCOMIAL INFECTIONS*. S.l.: MDPI AG ; 2015.
5. Amara I, Miled W, Slama RB, Ladhari N. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018 ; 57:115-30.
6. Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 2011 ; 27 (9) : 1017-32.
7. Almeida JR, Vasconcelos V. Natural antifouling compounds: Effectiveness in preventing invertebrate settlement and adhesion. *Biotechnol Adv*. 2015 ; 33 (3-4) : 343-57.
8. Qian P-Y, Li Z, Xu Y, Li Y, Fusetani N. Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. *Biofouling*. 2015 ; 31(1):101-22.
9. Peng J, Li J, Hamann MT. The Marine Bromotyrosine Derivatives. In: *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 2005 ; 61 : 59-262.
10. Andjouh S, Blache Y. Click-based synthesis of bromotyrosine alkaloid analogs as potential anti-biofilm leads for SAR studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015 ; 25 (24) : 5762-6.
11. van Leeuwenhoek A. Microscopical observations about animals in the scurf of the teeth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 14^e éd. 1684 ; 568–74.
12. Rogovska T, Lazareva M. Microbiological characteristics of biofilm purifying hydrogen sulphide containing sewage. 1961.
13. Jefferson K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 2004 ; 236(2) : 163-73.
14. Flemming H-C, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 2019 ; **17** : 247–60.
15. Sutherland I. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. 2001 ; 9 (5) : 222-7.
16. Guillonneau R, Baraquet C, Bazire A, Molmeret M. Multispecies Biofilm Development of Marine Bacteria Implies Complex Relationships Through Competition and Synergy and Modification of Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* 2018 ; 9.
17. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*. 2015 ; 7 (4) : 493-512.

18. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006 ; 6 (1) : S14.
19. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 1998 ; 30 (2) : 285-93.
20. Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS*. 2014 ; 122 : 1-51.
21. Rasigade JP. Physiopathologie des infections ostéoarticulaires chroniques : rôle des biofilms et de la persistance bactérienne intracellulaire. : *La Lettre de l'Infectiologue* • Tome XXVII - n° 3. 2012 ; 110-115.
22. Gutierrez L, Aubry C, Valladares Linares R, Croue J-P. Natural organic matter interactions with polyamide and polysulfone membranes: Formation of conditioning film. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015 ; 477:1-8.
23. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*. 2009 ; 14 (7) : 2535-54.
24. Parkar SG, Flint SH, Palmer JS, Brooks JD. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*. 2001 ; 90 (6) : 901-8.
25. Petrova OE, Sauer K. SagS Contributes to the Motile-Sessile Switch and Acts in Concert with BfiSR To Enable *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*. 2011 ; 193 (23) : 6614-28.
26. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 1998 ; 30 (2) : 295-304.
27. Gauthier MJ, Munro PM, Breittmayer VA. Influence of prior growth conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater. *Canadian Journal of Microbiology*. 1989 ; 35 (3) : 379-83.
28. Castonguay M-H, van der Schaaf S, Koester W, Krooneman J, van der Meer W, Harmsen H, Landini P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Research in Microbiology*. 2006 ; 157(5):471-8.
29. Klausen M, Gjermansen M, Kreft J-U, Tolker-Nielsen T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;261 (1) : 1-11.
30. Kim S-K, Lee J-H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*. 2016 ; 54 (2) : 71-85.
31. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2007;121 (1) : 1-17.

32. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002 ; 15 (2) :1 67-93.
33. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003 ; 47 (1) : 317-23.
34. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 ; 48 (7) : 2659-64.
35. Barraud N, Hassett DJ, Hwang S-H, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS. Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 2006 ; 188 (21) : 7344-53.
36. Barraud N, Schleheck D, Klebensberger J, Webb JS, Hassett DJ, Rice SA, Kjelleberg S. Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. *Journal of Bacteriology*. 2009 ; 191 (23) : 7333-42.
37. Kim S-K, Park H-Y, Lee J-H. Anthranilate Deteriorates the Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Antagonizes the Biofilm-Enhancing Indole Effect. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81 (7) : 2328-38.
38. Kim J, Park W. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *Journal of Microbiology*. 2015 ; 53 (7) : 421-8.
39. Ha D-G, O'Toole GA. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbiol Spectr*. 2015 ; 3(2).
40. Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*. 2017 ; 152 (2) : 327-339 e4.
41. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2013 ; 11 (4) : 227-38.
42. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H-P, Jegou S, Landman C, Cohen D, Liguori G, Bourrier A, Nion-Larmurier I, Cosnes J, Seksik P, Langella P, Skurnik D, L Richard ML, and Beaugerie L. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2017 ; 66 (6) : 1039-48.
43. García-Velasco JA, Menabrito M, Catalán IB. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017 ; 35 (1) : 103-12.
44. Reid G. Therapeutic Opportunities in the Vaginal Microbiome. *Microbiology Spectrum* 2017 ; 5 (3).

45. Green KA, Zarek SM, Catherino WH. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. *Fertility and Sterility*. 2015 ; 104 (6) : 1351-7.
46. Ackerman AL, Underhill DM. The mycobiome of the human urinary tract: potential roles for fungi in urology. *Annals of Translational Medicine*. 2017 ; 5 : 31-31.
47. Aragón IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuño MI, Castillo E, Del Moral JS-G, Gómez-Millán J, Yucelf G, Lara MF. The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. *European Urology Focus*. 2018 ; 4 (1) : 128-38.
48. Ng DHP, Kumar A, Cao B. Microorganisms meet solid minerals: interactions and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016 ; 100 (16) : 6935-46.
49. Lladó S, López-Mondéjar R, Baldrian P. Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017 ; 81(2).
50. Yurkov AM. Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*. 2018 ; 35 (5) : 369-78.
51. Edwards SJ, Kjellerup BV. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013 ; 97 (23) : 9909-21.
52. Mangwani N, Kumari S, Das S. Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2016 ; 32 (1-2) : 43-73.
53. Wang J, Salem DR, Sani RK. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers*. 2019 ; 205 : 8-26.
54. Heymann D, Ruiz-Velasco C, Chesneau J, Ratiskol J, Siquin C, Collic-Jouault S. Anti-Metastatic Properties of a Marine Bacterial Exopolysaccharide-Based Derivative Designed to Mimic Glycosaminoglycans. *Molecules* 2016 ; 21(3).
55. Wang L, Hu Y, Liu R, Liu J, Sun W. Synergistic adsorption of DDA/alcohol mixtures at the air/water interface: A molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Liquids*. 2017 ; 243:1-8.
56. Bai Y, Zhang P, Chen G, Cao J, Huang T, Chen K. Macrophage immunomodulatory activity of extracellular polysaccharide (PEP) of Antarctic bacterium *Pseudoaltermonas* sp.S-5. *International Immunopharmacology*. 2012 ; 12(4):611-7.
57. Wang H, Liu Y, Qi Z, Wang S, Liu S, Li X, Wang HJ, Xia XC. An Overview on Natural Polysaccharides with Antioxidant Properties. *Current Medicinal Chemistry*. 2013 ; 20 (23) : 2899-913.

58. Carrión O, Delgado L, Mercade E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. *Carbohydrate Polymers*. 2015 ; 117 : 1028-34.
59. Freitas F, Alves VD, Carvalheira M, Costa N, Oliveira R, Reis MAM. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*. 2009 ; 78 (3) : 549-56.
60. Assembly of HE800 exopolysaccharide produced by a deep-sea hydrothermal bacterium into microgels for protein delivery applications 2016 ; 142: 213–221
61. Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*. 2004 ; 50 (2) : 75-104.
62. Liu H, Frank Cheng Y. Mechanism of microbiologically influenced corrosion of X52 pipeline steel in a wet soil containing sulfate-reduced bacteria. *Electrochimica Acta*. 2017 ; 253 : 368-78.
63. Usher KM, Kaksonen AH, Cole I, Marney D. Critical review: Microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014 ; 93:84-106.
64. Phillippi AL, O'Connor NJ, Lewis AF, Kim YK. Surface flocking as a possible anti-biofoulant. *Aquaculture*. 2001 ; 195 (3) : 225-38.
65. Cronin ER, Cheshire AC, Clarke SM, Melville AJ. An investigation into the composition, biomass and oxygen budget of the fouling community on a tuna aquaculture farm. *Biofouling*. 1999 ; 13 (4) : 279-99.
66. Eckman JE, Thistle D, Burnett WC, Paterson GLJ, Robertson CY, Lamshead PJD. Performance of cages as large animal-exclusion devices in the deep sea. *Journal of Marine Research*. 2001 ; 59 (1) : 79-95.
67. Folke C, Kautsky N, Troell M. Salmon Farming in Context: Response to Blacket al. *Journal of Environmental Management*. 1997 ; 50 (1) : 95-103.
68. Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homøe P, Tvede M, Nyvad B, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Moser C, Kirketerp-Møller K, Johansen HK, Høiby N, Jensen PØ, Sørensen SJ, Bjarnsholt T. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2010 ; 59 (3) : 324-36.
69. Mystkowska J, Niemirowicz-Laskowska K, Łysik D, Tokajuk G, Dąbrowski JR, Bucki R. The Role of Oral Cavity Biofilm on Metallic Biomaterial Surface Destruction–Corrosion and Friction Aspects. *Int J Mol Sci*. 2018 ; 19 (3).
70. Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS*. 2014 ; 122 : 1-51.

71. Charles RC, Ryan ET. Cholera in the 21st century: Current Opinion in Infectious Diseases. 2011 ; 24 (5) : 472-7.
72. Kumar S, Basu S, Bhartiya SK, Shukla VK. The Buruli Ulcer. The International Journal of Lower Extremity Wounds. 2015 ; 14 (3) : 217-23.
73. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, Aubry J, Milon G, Legras P, Saint Andre JP, Leroy C, Cottin J, Joly Guillou ML, Reysset G, Cole ST. Impact of Mycobacterium ulcerans Biofilm on Transmissibility to Ecological Niches and Buruli Ulcer Pathogenesis. PLoS Pathog 2007 ; 3 (5).
74. Zingue D, Bouam A, Tian RBD, Drancourt M. Buruli Ulcer, a Prototype for Ecosystem-Related Infection, Caused by Mycobacterium ulcerans. Clin Microbiol Rev [Internet]. 13 2017 ; 31 (1).
75. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2008 ; 52 (1) : 13-22.
76. Muzny CA, Schwebke JR. Biofilms: An Underappreciated Mechanism of Treatment Failure and Recurrence in Vaginal Infections. Clin Infect Dis. 2015 ; 61 (4) : 601-6.
77. Rodríguez-López P, Rodríguez-Herrera JJ, Vázquez-Sánchez D, López Cabo M. Current Knowledge on Listeria monocytogenes Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. Foods. 2018 ; 7(6).
78. Srey S, Jahid IK, Ha S-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control. 2013 ; 31 (2) : 572-85.
79. Singh NK, Wood JM, Karouia F, Venkateswaran K. Succession and persistence of microbial communities and antimicrobial resistance genes associated with International Space Station environmental surfaces. Microbiome 2018 ; 6.
80. Cao S, Wang J, Chen H, Chen D. Progress of marine biofouling and antifouling technologies. Chinese Science Bulletin. 2011 ; 56 (7) : 598-612.
81. Almeida E, Diamantino TC, de Sousa O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. Progress in Organic Coatings. 2007 ; 59 (1) : 2-20.
82. Bjarnsholt T, Buhlin K, Dufrêne YF, Gomelsky M, Moroni A, Ramstedt M, Rumbaugh KP, Schulte T, Sun L, Åkerlund B, Römling U. Biofilm formation – what we can learn from recent developments. Journal of Internal Medicine. 2018 ; 284 (4) : 332-45.
83. Römling U, Kjelleberg S, Normark S, Nyman L, Uhlin BE, Åkerlund B. Microbial biofilm formation: a need to act. Journal of Internal Medicine. 2014 ; 276 (2) : 98-110.
84. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. The Lancet. 2004 ; 364 (9431) : 369-79.
85. Esposito S, Leone S. Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008;32(4):287-93.

86. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonology*. 2009 ; 44 (6) : 547-58.
87. Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. In *J Oral Sci*. 2015 ; 7 (1) : 1-7.
88. Fernández-Hidalgo N, Almirante B. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2014 ; 12 (1) : 117-29.
89. Noelting J, Jurewitsch B, Allard JP. Non-Antibiotic Antimicrobial Catheter Lock Solutions in Patients on Home Parenteral Nutrition. *Nutrients*. 2018 ; 10 (9).
90. Mikulskis P, Hook A, Dundas AA, Irvine D, Sanni O, Anderson D, • Langer R, Alexander MR, Williams P, Winkler DA. Prediction of Broad-Spectrum Pathogen Attachment to Coating Materials for Biomedical Devices. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 ; 10 (1) : 139-49.
91. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms*. 2017 ; 5 (2) : 15.
92. Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Current Opinion in Microbiology*. 2016 ; 33 : 35-40.
93. Wang Y, Wu X, Chen J, Amin R, Lu M, Bhayana B, Zhao J, Murray CK, Hamblin MR, Hooper DC, Dai T. Antimicrobial Blue Light Inactivation of Gram-Negative Pathogens in Biofilms: In Vitro and In Vivo Studies. *J Infect Dis*. 2016 ; 213 (9) : 1380-7.
94. Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. Microbiological interactions with cold plasma. *Journal of Applied Microbiology*. 2017 ; 123 (2) : 308-24.
95. Granick MS, Paribathan C, Shanmugam M, Ramasubbu N. Direct-Contact Low-Frequency Ultrasound Clearance of Biofilm From Metallic Implant Materials. *Eplasty* 2017 ; 17.
96. Cai Y, Wang J, Liu X, Wang R, Xia L. A Review of the Combination Therapy of Low Frequency Ultrasound with Antibiotics *BioMed Research International*. 2017, 14p.
97. Bjarnsholt T, Alhede M, Jensen PØ, Nielsen AK, Johansen HK, Homøe P, Høiby N, Givskov M, Kirketerp-Møller K. Antibiofilm Properties of Acetic Acid. *Advances in Wound Care*. 2014 ; 4 (7) : 363-72.
98. Barraud N, Kelso MJ, Kjelleberg SAR and S. Nitric Oxide: A Key Mediator of Biofilm Dispersal with Applications in Infectious Diseases *Current Pharmaceutical Design*. 2014.
99. Serhan Sakarya, Necati Gunay, Meltem Karakulak, Barcin Ozturk, Bulent Ertugrul Hypochlorous Acid: An Ideal Wound Care Agent With Powerful Microbicidal, Antibiofilm, and Wound Healing Potency *Wounds Research*. WOUNDS. 2014 ; 26 (12) : 342-350.

100. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018 ; 9 (1) : 522-54.
101. Schroeder G, Bates SS, La Barre S. Bioactive Marine Molecules and Derivatives with Biopharmaceutical Potential. In: *Blue Biotechnology* Weinheim, Germany: 2018 ; 611-41.
102. Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2019 ; 36 (1) : 122-73.
103. Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2018 ; 35 (1) : 8-53.
104. Putz A, Proksch P. Chemical Defence in Marine Ecosystems. In: Wink M. *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* 2010 ; 162-213.
105. Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther*. 2005 ; 4 (2) : 333-42.
106. Ryu MJ, Kim AD, Kang KA, Chung HS, Kim HS, Suh IS, Chang WY, Hyun JW. The green algae *Ulva fasciata* Delile extract induces apoptotic cell death in human colon cancer cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2013 ; 49 (1) : 74-81.
107. Buchanan MS, Carroll AR, Fechner GA, Boyle A, Simpson MM, Addepalli R, Avery VM, Avery JNA, Su N, Chen H, Quinn RJ. Spermatinamine, the first natural product inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase, a new cancer target. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007 ; 17 (24) : 6860-3.
108. Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*. 2012 ; 90 (4) : 1395-410.
109. Lauritano C, Ianora A. Marine Organisms with Anti-Diabetes Properties. *Marine Drugs*. 2016 ; 14 (12) : 220.
110. BelHadj S, Hentati O, Elfeki A, Hamden K. Inhibitory activities of *Ulva lactuca* polysaccharides on digestive enzymes related to diabetes and obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2013 ; 119 (2) : 81-7.
111. Shi Q, Wang A, Lu Z, Qin C, Hu J, Yin J. Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. *Carbohydrate Research*. 2017 ; 453-454 : 1-9.
112. Yasuhara-Bell J, Lu Y. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*. 2010 ; 86 (3) : 231-40.
113. Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A. Antiparasitic Secondary Metabolites from Marine Actinobacteria. In: *Marine Pharmacognosy* 2012 ; 373-84.

114. Arevabini C, Crivelenti YD. Antifungal Activity of Metabolites from the Marine Sponges Amphimedon sp. and Monanchora arbuscula against Aspergillus flavus Strains Isolated from Peanuts (Arachis hypogaea). :2013 ; 9 (1) : 33-6
115. Shannon E, Abu-Ghannam N. Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. Marine Drugs. 2016 ; 14 (4) : 81.
116. Dahms HU, Dobretsov S. Antifouling Compounds from Marine Macroalgae. Mar Drugs 2017 ; 15 (9) : 265.
117. Wang K-L, Wu Z-H, Wang Y, Wang C-Y, Xu Y. Mini-Review: Antifouling Natural Products from Marine Microorganisms and Their Synthetic Analogs. Mar Drugs [Internet]. 2017 ; 15 (9) ; 266-87.
118. Sharma GM, Burkholder PR. Studies on the antimicrobial substances of sponges II. Structure and synthesis of a bromine-containing antibacterial, compound from a marine sponge. Tetrahedron Letters. 1967 ; 8 (42) : 4147-50.
119. Tsuda M, Shigemori H, Ishibashi M, Kobayashi J. Puralidins E-G, New Bromotyrosine Alkaloids from the Okinawan Marine Sponge Psammaplysilla pura. J Nat Prod. 1992 ; 55 (9) : 1325-7.
120. Hunt S, Breuer SW. Isolation of a new naturally occurring halogenated amino acid: Monochloromonobromotyrosine. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1 1971 ; 252 (2) : 401-4.
121. Kernan MR, Cambie RC, Bergquist PR. Chemistry of Sponges, VIII. Anomoian A, a Bromotyrosine Derivative from Anomoiantbella popeae. Journal of Natural Products. 1990 ; 53 (3) : 720-3.
122. Litaudon M, Guyot M. Ianthelline, un nouveau derive de lfl dibromo-3,5 tyrosine, isole de l'eponge ianthella ardis (bahamas). Tetrahedron Letters. 1986 ; 27 (37) : 4455-6.
123. Thirionet I, Daloz D, Braeckman JC, Willemsen P. 5-Bromoverongamine, a Novel Antifouling Tyrosine Alkaloid from the Sponge Pseudoceratina sp. Natural Product Letters. 1998 ; 12 (3) : 209-14.
124. Quiñoà E, Crews P. Phenolic constituents of Psammaplysilla. Tetrahedron Letters. 1987 ; 28 (28) : 3229-32.
125. Kazlauskas R, Lidgard RO, Murphy PT, Wells RJ, Blount JF. Brominated tyrosine-derived metabolites from the sponge Ianthella basta. Aust J Chem. 1981 ; 34 (4) : 765-86.
126. Fetterolf B, Bewley CA. Synthesis of a bromotyrosine-derived natural product inhibitor of mycothiol-S-conjugate amidase. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2004;14(14):3785-8.
127. Ross SA., Weete JD., Schinazi RF, Wirtz SS, Tharnish P, Scheuer PJ, Hamann MT. Mololipids, A New Series of Anti-HIV Bromotyramine-Derived Compounds from a Sponge of the Order Verongida 2000, 63 (4), 501–503

128. Galeano E, Thomas OP, Robledo S, Munoz D, Martinez A. Antiparasitic Bromotyrosine Derivatives from the Marine Sponge *Verongula rigida*. *Marine Drugs*. 2011;9(10):1902-13.
129. Copp BR, Ireland CM, Barrows LR. Psammaplysin C: A New Cytotoxic Dibromotyrosine-Derived Metabolite from the Marine Sponge *Druinella (=Psammaplysia) purpurea* 1992, 55 (6), 822–823
130. Lipowicz B, Hanekop N, Schmitt L, Proksch P. An Aeropylsinin-1 Specific Nitrile Hydratase Isolated from the Marine Sponge *Aplysina cavernicola*. *Marine Drugs*. 2013 ; 11 (8) : 3046-67.
131. John Faulkner D. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 2001 ; 18 (1) : 1R-49R.
132. Bonandi E, Christodoulou MS, Fumagalli G, Perdicchia D, Rastelli G, Passarella D. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry. *Drug Discovery Today*. 2017 ; 22 (10) : 1572-81.
133. Totobenazara J, Burke AJ. New click-chemistry methods for 1,2,3-triazoles synthesis: recent advances and applications. *Tetrahedron Letters*. 2015 ; 56 (22) : 2853-9.
134. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2002 ; 41 (14) : 2596-9.
135. Christian W. Tornøe, Caspar Christensen, and Morten Meldal*Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides - *The Journal of Organic Chemistry*. 2002, 67 (9): 3057–64
136. Johansson JR, Beke-Somfai T, Said Stålsmeden A, Kann N. Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications. *Chemical Reviews*. 2016 ; 116 (23) : 14726-68.
137. Rasmussen LK, Boren BC, Fokin VV. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Aryl Azides and Alkynes. *Org Lett*. 2007 ; 9 (26) : 5337-9.
138. Meldal M, Tornøe CW. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem Rev*. 2008 ; 108(8) : 2952-3015.
139. McNulty J, Keskar K. Discovery of a Robust and Efficient Homogeneous Silver(I) Catalyst for the Cycloaddition of Azides onto Terminal Alkynes. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012 ; 2012 (28) : 5462-70.
140. Krasiński A, Fokin VV, Sharpless KB. Direct Synthesis of 1,5-Disubstituted-4-magnesio-1,2,3-triazoles, Revisited. *Org Lett*. 2004 ; 6 (8) : 1237-40.
141. Smith CD, Greaney MF. Zinc Mediated Azide–Alkyne Ligation to 1,5- and 1,4,5-Substituted 1,2,3-Triazoles. *Org Lett*. 2013 ; 15 (18) : 4826-9.

142. Ding S, Jia G, Sun J. Iridium-Catalyzed Intermolecular Azide–Alkyne Cycloaddition of Internal Thioalkynes under Mild Conditions. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014 ; 53 (7) : 1877-80.
143. Hong L, Lin W, Zhang F, Liu R, Zhou X. Ln[N(SiMe₃)₂]₃-catalyzed cycloaddition of terminal alkynes to azides leading to 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles: new mechanistic features. *Chemical Communications*. 2013 ; 49 (49) : 5589.
144. Ramachary DB, Shashank AB. Organocatalytic Triazole Formation, Followed by Oxidative Aromatization: Regioselective Metal-Free Synthesis of Benzotriazoles. *Chemistry – A European Journal*. 2013 ; 19 (39) : 13175-81.
145. Cai Z-J, Lu X-M, Zi Y, Yang C, Shen L-J, Li J, Wang SY, Ji SJ. I₂/TBPB Mediated Oxidative Reaction of N-Tosylhydrazones with Anilines: Practical Construction of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles under Metal-Free and Azide-Free Conditions. *Org Lett*. 2014 ; 16 (19) : 5108-11.
146. Thomas J, John J, Parekh N, Dehaen W. A Metal-Free Three-Component Reaction for the Regioselective Synthesis of 1,4,5-Trisubstituted 1,2,3-Triazoles. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014 ; 53 (38) : 10155-9.
147. Ali A, Corrêa AG, Alves D, Zukerman-Schpector J, Westermann B, Ferreira MAB, Paixão MW. An efficient one-pot strategy for the highly regioselective metal-free synthesis of 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles. *Chem Commun*. 2014 ; 50 (80) : 11926-9.
148. Agalave SG, Maujan SR, Pore VS. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem Asian J*. 2011 ; 6 (10) : 2696-718.
149. Whiting M, Tripp JC, Lin Y-C, Lindstrom W, Olson AJ, Elder JH, K. Sharpless B, Fokin VV. Rapid Discovery and Structure–Activity Profiling of Novel Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Enabled by the Copper(I)-Catalyzed Synthesis of 1,2,3-Triazoles and Their Further Functionalization. *J Med Chem*. 2006 ; 49 (26) : 7697-710.
150. Brik A, Muldoon J, Lin Y-C, Elder JH, Goodsell DS, Olson AJ, Fokin VV, Sharpless KB, Wong CH. Rapid Diversity-Oriented Synthesis in Microtiter Plates for In Situ Screening of HIV Protease Inhibitors. *ChemBioChem*. 2003 ; 4 (11) : 1246-8.
151. Brik A, Alexandratos J, Lin Y-C, Elder JH, Olson AJ, Wlodawer A, Goodsell DS, Wong CH. 1,2,3-Triazole as a Peptide Surrogate in the Rapid Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors. *ChemBioChem*. 2005 ; 6 (7) : 1167-9.
152. Saito Y, Escuret V, Durantel D, Zoulim F, Schinazi RF, Agrofoglio LA. Synthesis of 1,2,3-triazolo-carbanucleoside analogues of ribavirin targeting an HCV in replicon. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2003 ; 11 (17) : 3633-9.
153. Mohapatra DK, Maity PK, Shabab M, Khan MI. Click chemistry based rapid one-pot synthesis and evaluation for protease inhibition of new tetracyclic triazole fused benzodiazepine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009 ; 19 (17) : 5241-5.

154. Olomola TO, Klein R, Lobb KA, Sayed Y, Kaye PT. Towards the synthesis of coumarin derivatives as potential dual-action HIV-1 protease and reverse transcriptase inhibitors. *Tetrahedron Letters*. 2010 ; 51 (48) : 6325-8.
155. Kaushik CP, Kumar K, Singh SK, Singh D, Saini S. Synthesis and antimicrobial evaluation of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles with aromatic ester functionality. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016 ; 9 (6) : 865-71.
156. Jadhav RP, Raundal HN, Patil AA, Bobade VD. Synthesis and biological evaluation of a series of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives as possible antimicrobial agents. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2017 ; 21 (2) : 152-9.
157. Somu RV, Boshoff H, Qiao C, Bennett EM, Barry CE, Aldrich CC. Rationally Designed Nucleoside Antibiotics That Inhibit Siderophore Biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem*. 2006 ; 49 (1) : 31-4.
158. Costa MS, Boechat N, Rangel ÉA, da Silva F de C, de Souza AMT, Rodrigues CR, Castro HC, Junior IN, Lourenço MC, Wardell SMS, Ferreira VF. Synthesis, tuberculosis inhibitory activity, and SAR study of N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006 ; 14 (24) : 8644-53.
159. Tripathi RP, Yadav AK, Ajay A, Bisht SS, Chaturvedi V, Sinha SK. Application of Huisgen (3+2) cycloaddition reaction: Synthesis of 1-(2,3-dihydrobenzofuran-2-yl-methyl [1,2,3]-triazoles and their antitubercular evaluations. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010 ; 45 (1) : 142-8.
160. Dabak K, Sezer Ö, Akar A, Anaç O. Synthesis and investigation of tuberculosis inhibition activities of some 1,2,3-triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2003 ; 38 (2) : 215-8.
161. Gupte A, Boshoff HI, Wilson DJ, Neres J, Labello NP, Somu RV, Xing C, Barry CE, Aldrich CC. Inhibition of Siderophore Biosynthesis by 2-Triazole Substituted Analogues of 5'-O-[N-(Salicyl)sulfamoyl]adenosine: Antibacterial Nucleosides Effective Against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem*. 2008 ; 51 (23) : 7495-507.
162. Gill C, Jadhav G, Shaikh M, Kale R, Ghawalkar A, Nagargoje D, Shiradkar M. Clubbed [1,2,3] triazoles by fluorine benzimidazole: A novel approach to H37Rv inhibitors as a potential treatment for tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008 ; 18 (23) : 6244-7.
163. Conte ML, Marra A, Chambery A, Gurcha SS, Besra GS, Dondoni A. Modular Approach to Triazole-Linked 1,6- α -D-Oligomannosides to the Discovery of Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall Synthetase. *J Org Chem* 2010 ; 75 (19).
164. Pore VS, Aher NG, Kumar M, Shukla PK. Design and synthesis of fluconazole/bile acid conjugate using click reaction. *Tetrahedron*. 2006 ; 62 (48) : 11178-86.
165. Chaudhary PM, Chavan SR, Shirazi F, Razdan M, Nimkar P, Maybhatte SP, Likhite AP, Gonnade R, Hazara BG, Deshpande MV, Deshpande SR. Exploration of click reaction for

- the synthesis of modified nucleosides as chitin synthase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009 ; 17 (6) : 2433-40.
166. Vatmurge NS, Hazra BG, Pore VS, Shirazi F, Deshpande MV, Kadreppa S, Chattopadhyay S, Gonnade RG. Synthesis and biological evaluation of bile acid dimers linked with 1,2,3-triazole and bis- β -lactam. *Org Biomol Chem*. 2008 ; 6 (20) : 3823.
167. Sangshetti JN, Shinde DB. One pot synthesis and SAR of some novel 3-substituted 5,6-diphenyl-1,2,4-triazines as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010 ; 20 (2) : 742-5.
168. Sangshetti JN, Nagawade RR, Shinde DB. Synthesis of novel 3-(1-(1-substituted piperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009 ; 19 (13) : 3564-7.
169. Kategaonkar AH, Shinde PV, Kategaonkar AH, Pasale SK, Shingate BB, Shingare MS. Synthesis and biological evaluation of new 2-chloro-3-((4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)quinoline derivatives via click chemistry approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010 ; 45 (7) : 3142-6.
170. Ferreira SB, Costa MS, Boechat N, Bezerra RJS, Genestra MS, Canto-Cavalheiro MM, Kover WB, Ferreira VF. Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2007 ; 42 (11) : 1388-95.
171. Reck F, Zhou F, Eyermann CJ, Kern G, Carcanague D, Ioannidis G, Illingworth R, Poon G, Gravestock MB. Novel Substituted (Pyridin-3-yl)phenyloxazolidinones: Antibacterial Agents with Reduced Activity against Monoamine Oxidase A and Increased Solubility. *J Med Chem*. 2007 ; 50 (20) : 4868-81.
172. Patil PC, Tan J, Demuth DR, Luzzio FA. 1,2,3-Triazole-based inhibitors of *Porphyromonas gingivalis* adherence to oral streptococci and biofilm formation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2016 ; 24 (21) : 5410-7.
173. Linares D, Bottzeck O, Pereira O, Praud-Tabariès A, Blache Y. Designing 2-aminoimidazole alkaloids analogs with anti-biofilm activities: Structure-activities relationships of polysubstituted triazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011 ; 21 (22) : 6751-5.
174. Sall C, Dombrowsky L, Bottzeck O, Praud-Tabariès A, Blache Y. Targeting bacterial biofilms: Design of a terpenoid-like library as non-toxic anti-biofilm compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011 ; 21 (5) : 1493-7.
175. Andjouh S, Blache Y. Screening of bromotyramine analogues as antifouling compounds against marine bacteria. *Biofouling*. 2016 ; 32 (8) : 871-81.
176. Andjouh S, Blache Y. Parallel synthesis of a bis-triazoles library as psammaphin A analogues: A new wave of antibiofilm compounds? *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019 ; 29 (4) : 614-8.

177. Le Norcy T, Niemann H, Proksch P, Tait K, Linossier I, Réhel K, Hellio C, Faÿ F. Sponge-Inspired Dibromohemibastadin Prevents and Disrupts Bacterial Biofilms without Toxicity. *Mar Drugs*. 2017 ; 15 (7).
178. Le Norcy T, Faÿ F, Obando CZ, Hellio C, Réhel K, Linossier I. A new method for evaluation of antifouling activity of molecules against microalgal biofilms using confocal laser scanning microscopy-microfluidic flow-cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2019 ; 139 : 54-61.
179. Bayer M, Hellio C, Maréchal J-P, Frank W, Lin W, Weber H, Proksch P. Antifouling Bastadin Congeners Target Mussel Phenoloxidase and Complex Copper(II) Ions. *Mar Biotechnol*. 2011 ; 13 (6) : 1148-58.
180. Niemann H, Hagenow J, Chung M-Y, Hellio C, Weber H, Proksch P. SAR of Sponge-Inspired Hemibastadin Congeners Inhibiting Blue Mussel PhenolOxidase. *Marine Drugs*. 2015 ; 13 (5) : 3061-71.
181. Le Norcy T, Niemann H, Proksch P, Linossier I, Vallée-Réhel K, Hellio C, Faÿ F. Anti-Biofilm Effect of Biodegradable Coatings Based on Hemibastadin Derivative in Marine Environment. *Int J Mol Sci* 2017 ; 18 (7).
182. Kacou A, Ouvrard A, Jamet D, Jamet J-L, Blache Y. Towards eco-friendly biocides: preparation, antibiofilm activity of hemibastadin analogues. *Letters in Applied Microbiology*. 2019 ; 68 (4) : 360-8.
183. Sall C, Ayé M, Bottzeck O, Praud A, Blache Y. Towards smart biocide-free anti-biofilm strategies: Click-based synthesis of cinnamide analogues as anti-biofilm compounds against marine bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018 ; 28 (2) : 155-9.
184. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1996 ; 25 (2) : 136-44.
185. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2004 ; 12 (7) : 317-24.
186. Nittayananta W. Oral fungi in HIV: challenges in antifungal therapies. *Oral Diseases*. 2016 ; 22 : 107-13.
187. Verduyn Lunel FM, Meis JFGM, Voss A. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1999 ; 34 (3) : 213-20.
188. Djohan V, Angora KE, Vanga-Bosson AH, Konaté A, Kassi KF, Kiki-Barro PCM, Bedia-Tanoh AV, Miezán S, Menan EIH, Yavo W. Recurrent vulvo-vaginal candidiasis in Abidjan (Côte d'Ivoire): Aetiology and associated factors. *Journal de Mycologie Médicale*. 2019 ; 29 (2) : 127-31.
189. Djohan V, Angora KE, Vanga-Bosson AH, Konaté A, Kassi FK, Yavo W, Menan EIH. Sensibilité in vitro des souches de *Candida albicans* d'origine vaginale aux antifongiques à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Journal de Mycologie Médicale*. 2012 ; 22 (2) : 129-33.

190. Niangué-Beugré NN, Couitchéré L, Oulai SM, Cissé L, Enoh J. Aspects épidémiologiques, cliniques et étiologiques des diarrhées aiguës des enfants âgés de 1 mois à 5 ans reçus dans le service de pédiatrie du CHU de Treichville (Côte d'Ivoire). *Archives de Pédiatrie*. 2006 ; 13 (4) : 395-6.
191. Rapport sur le suivi mondial de la lutte contre le sida 2019 — Indicateurs de suivi de la Déclaration Politique sur la fin du sida adoptée par l'Assemblée générale des Nations Unies en 2016 : 208.
192. Kra O, Ouattara B, Aba T, Kadjané NJ, Kadjo K, Bissagnéné E, Kadio A. Morbimortalité des pathologies infectieuses à l'hôpital militaire d'Abidjan, Côte d'Ivoire. *Médecine et Santé Tropicales*. 2012 ; 22 (1) : 75-8.
193. Meless D, Ba B, Faye M, Diby J-S, N'zoré S, Datté S, Diecket L, N'Diaye C, Addi Aka E, Kouakou K, Ba A, Ekouévi DK, Dabis F, Shiboski C, Arrivé E. Oral lesions among HIV-infected children on antiretroviral treatment in West Africa. *Trop Med Int Health*. 2014 ; 19 (3) : 246-55.
194. Konaté A, Barro-Kiki PCM, Kassi KF, Angora KE, Vanga-Bosson H, Djohan V, Bédia-Tanoh AV, Miézan AJS, Yavo W, Menan EIH. Oropharyngeal candidiasis prevalence among HIV-infected patients at the teaching hospital of Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire). *Journal de Mycologie Médicale*. 2017 ; 27 (4) : 549-53.
195. Egue LAN, N'guessan FK, Aka-Gbezo S, Bouatenin J-PKM, Koussemon-Camara M. *Candida* species in tchapalo and bangui, two traditional alcoholic beverages from Côte d'Ivoire. *Fungal Biology*. 2018 ; 122 (5) : 283-92.
196. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 ; 4 (2) : 119-28.
197. Fourie R, Ells R, Swart CW, Sebolai OM, Albertyn J, Pohl CH. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* Interaction, with Focus on the Role of Eicosanoids. *Frontiers in Physiology* 2016 ; 7.
198. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection. *Eukaryotic Cell*. 2003 ; 2 (5) : 1053-60.
199. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans* : A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics*. 2002 ; 3 (12) : 918.
200. Kumamoto CA. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nature Reviews Microbiology*. 2008 ; 6 (9) : 667-73.
201. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001 ; 9 (7) : 327-35.
202. Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiol Spectr* 2015 ; 3 (4).

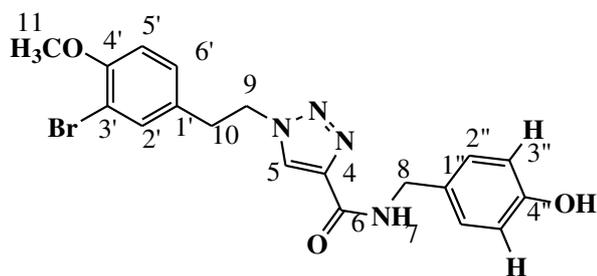
203. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm Formation by *Candida* Species on the Surface of Catheter Materials In Vitro. : 1994 ; 61 (3) : 915-21.
204. Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *J Fungi (Basel)* 2017 3 (1) : 14.
205. Gonçalves LM, Del Bel Cury AA, Vasconcellos AA, Cury JA, da Silva WJ. Confocal analysis of the exopolysaccharide matrix of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. 2014 ; 6 (3) : 179-85.
206. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015 ; 69 : 71-92.
207. Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus*–*Candida* interactions in oral health and disease. *Molecular Oral Microbiology*. 2014 ; 29 (3) : 99-116.
208. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*. 2016 ; 18 (5) : 310-21.
209. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 2016 ; 74 (4).
210. Van Dijck P, Sjollem J, Cammue BPA, Lagrou K, Berman J, d'Enfert C, Andes DR, Arendrup MC, Brakhage AA, Calderone R, Cantón E, Coenye T, Cos P, Cowen LE, Edgerton M, Espinel-Ingroff A, Filler SG, Ghannoum M, Gow NAR, Haas H, Jabra-Rizk MA, Johnson EM, Lockhart SR, Lopez-Ribot JL, Maertens J, Munro CA, Nett JE, Nobile CJ, Pfaller MA, Ramage G, Sanglard D, Sanguinetti M, Spriet I, Verweij PE, Warris A, Wauters J, Yeaman MR, Zaat SAJ, Thevissen K. Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. *Microb Cell*. 2018; 5 (7) : 300-26.
211. Gulati M., Nobile CJ *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*. 2016; 18: 310-21.
212. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology*. 2001 ; 183 (18) : 5385-94.
213. Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, López-Ribot JL. In Vitro Activity of Caspofungin against *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 ; 46 (11) : 3591-6.
214. Ramage G, VandeWalle K, Bachmann SP, Wickes BL, López-Ribot JL. In Vitro Pharmacodynamic Properties of Three Antifungal Agents against Preformed *Candida albicans* Biofilms Determined by Time-Kill Studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 ; 46 (11) : 3634-6.

215. Ramage G, Jose A, Sherry L, Lappin DF, Jones B, Williams C. Liposomal Amphotericin B Displays Rapid Dose-Dependent Activity against *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 ; 57 (5) : 2369-71.
216. DiDone L, Oga D, Krysan DJ. A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. *Yeast.* 2011 ; 28 (8) : 561-8.
217. Gropp K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Molecular Immunology.* 2009 ; 47 (2) : 465-75.
218. Ghosh S, Navarathna DHMLP, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM, Nickerson KW. Arginine-Induced Germ Tube Formation in *Candida albicans* Is Essential for Escape from Murine Macrophage Line RAW 264.7. *Infection and Immunity.* 2009 ; 77 (4) : 1596-605.
219. Granger BL. Insight into the Antiadhesive Effect of Yeast Wall Protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell.* 2012 ; 11 (6) : 795-805.
220. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 ; 45 (9) : 2475-9.
221. Tan Y, Leonhard M, Ma S, Schneider-Stickler B. Influence of culture conditions for clinically isolated non-*albicans* *Candida* biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods.* 2016 ; 130 : 123-8.
222. Soll DR, Daniels KJ. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016 ; 80 (3) : 565-95.
223. Zanni PCMD, Bonfim-Mendonça P de S, Negri M, Nakamura SS, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro ME. Virulence factors and genetic variability of vaginal *Candida albicans* isolates from HIV-infected women in the post-highly active antiretroviral era. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2017 ; 59: e44.
224. Mane A, Kulkarni A, Risbud A. Biofilm production in oral *Candida* isolates from HIV-positive individuals from Pune, India. *Mycoses.* 2013 ; 56 (2) : 182-6.
225. Mårdén P, Tunlid A, Malmcróna-Friberg K, Odham G, Kjelleberg S. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch Microbiol.* 1985 ; 142 (4) : 326-32.
226. Camps M, Briand J-F, Guentas-Dombrowsky L, Culioli G, Bazire A, Blache Y. Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Marine Pollution Bulletin.* 2011 ; 62 (5) : 1032-40.

227. Brian-Jaisson F, Ortalo-Magné A, Guentas-Dombrowsky L, Armougom F, Blache Y, Molmeret M. Identification of Bacterial Strains Isolated from the Mediterranean Sea Exhibiting Different Abilities of Biofilm Formation. *Microb Ecol.* 2014 ; 68 (1) : 94-110.
228. Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallee-Rehel K, Haras D. Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-attached Marine Bacteria. *Biofouling.* 2003 ; 19 (5) : 307-13.
229. Vorregaard M. Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms. :85.
230. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbol BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology.* 2000;(146) : 2395-407.
231. Tessier E. Diagnostic de la contamination sédimentaire par les métaux/métalloïdes dans la rade de Toulon et mécanismes controlant leur mobilité. Université de Toulon; 2012
232. Tessier E, Garnier C, Mullot J-U, Lenoble V, Arnaud M, Raynaud M, Mounier S. Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon bay (France). *Marine Pollution Bulletin.* 2011;62(10):2075-86.
233. Jean N, Dumont E, Durrieu G, Balliau T, Jamet J-L, Personnic S, Garnier C. Protein expression from zooplankton communities in a metal contaminated NW mediterranean coastal ecosystem. *Marine Environmental Research.* 2012;80:12-26.
234. Bandeira B, Jamet J-L, Jamet D, Ginoux J-M. Mathematical convergences of biodiversity indices. *Ecological Indicators.* 2013;29:522-8.
235. Rossi N. Écologie des communautés planctoniques méditerranéennes et étude des métaux lourds (Cuivre, Plomb, Cadmium) dans différents compartiments de deux écosystèmes côtiers (Toulon, France) Université du Sud Toulon Var; 2008
236. McCallum ID. A simple method of taking a subsample of zooplankton. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* 1979;13(4):559-60.
237. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols.* 2008;3(9):1494-500.
238. Pfaller MA, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.

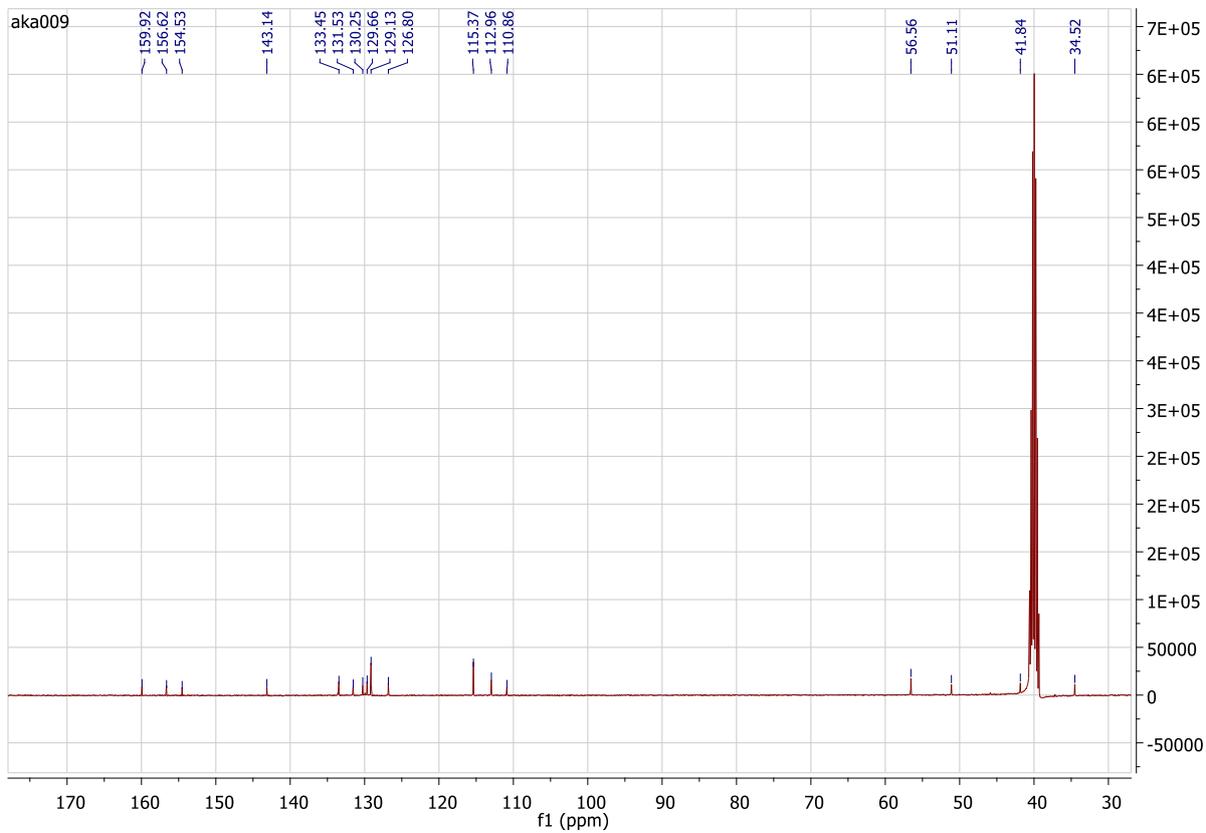
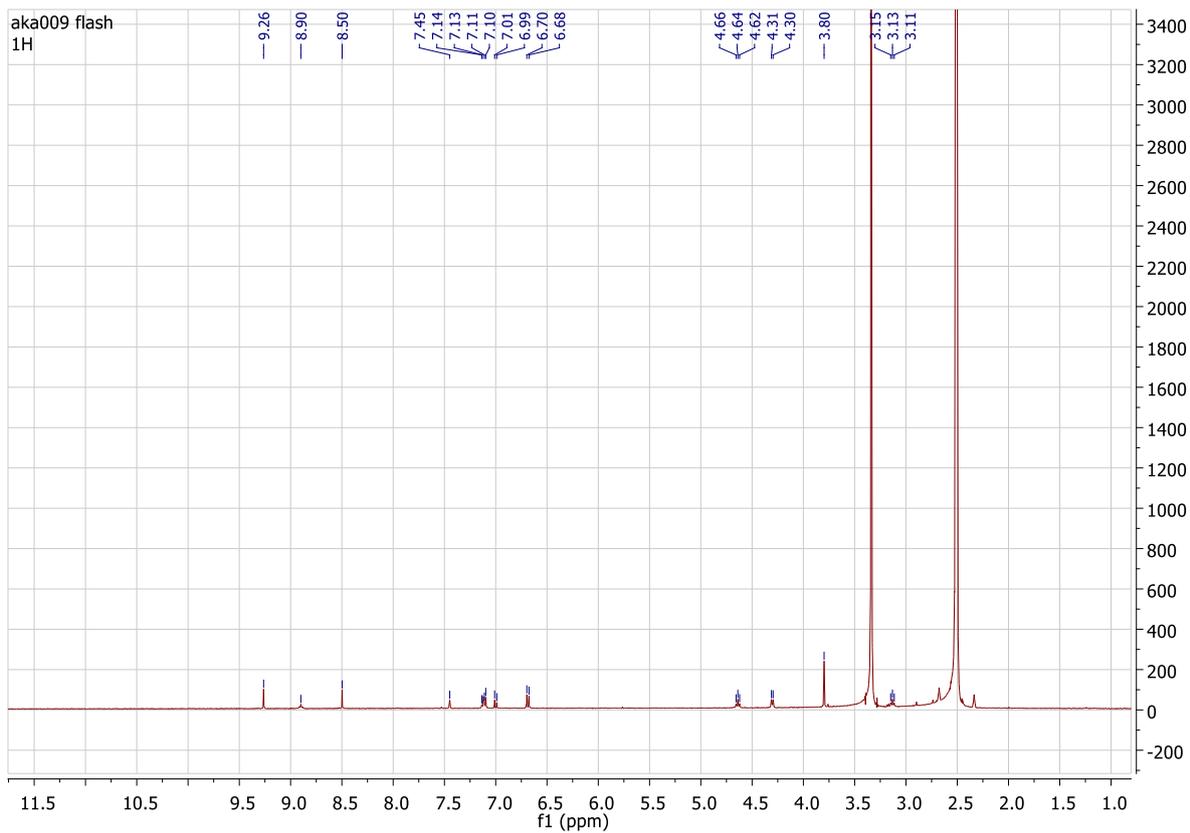
Annexe

1-(3-bromo-4-methoxyphenethyl)-N-(4-hydroxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide

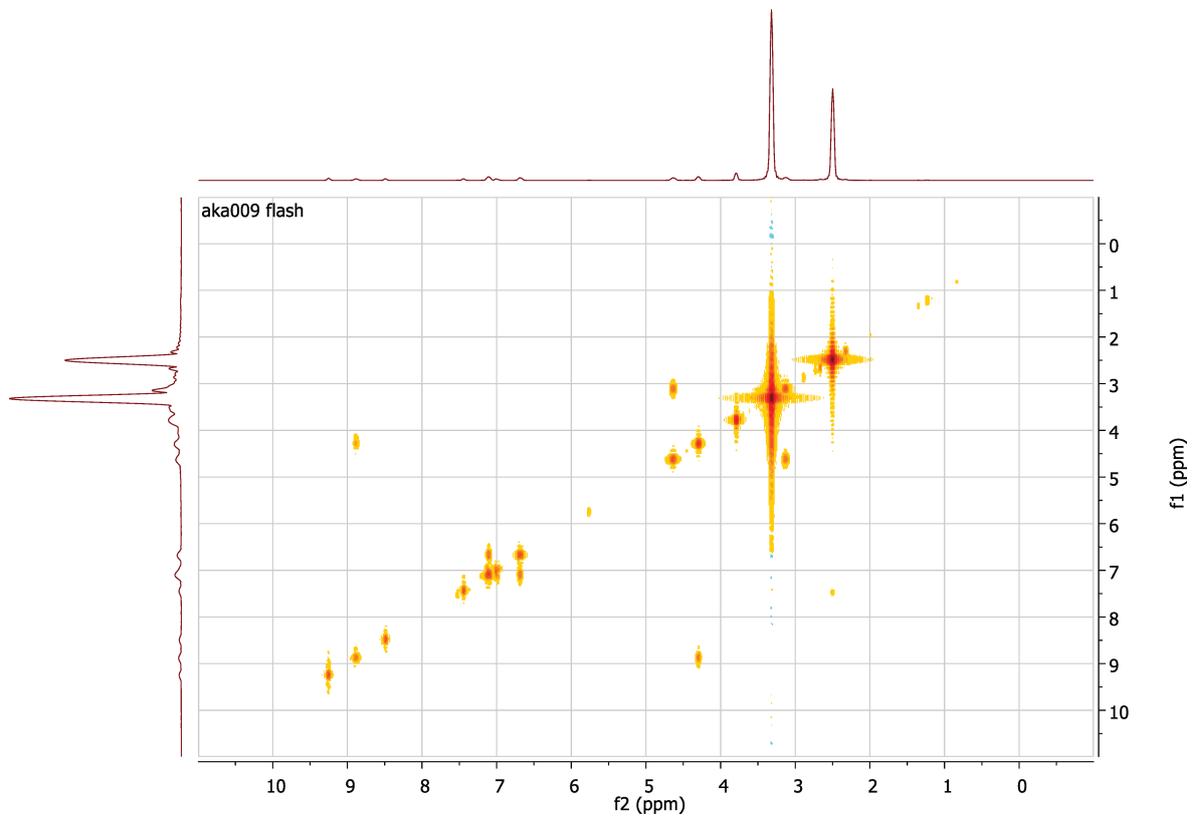
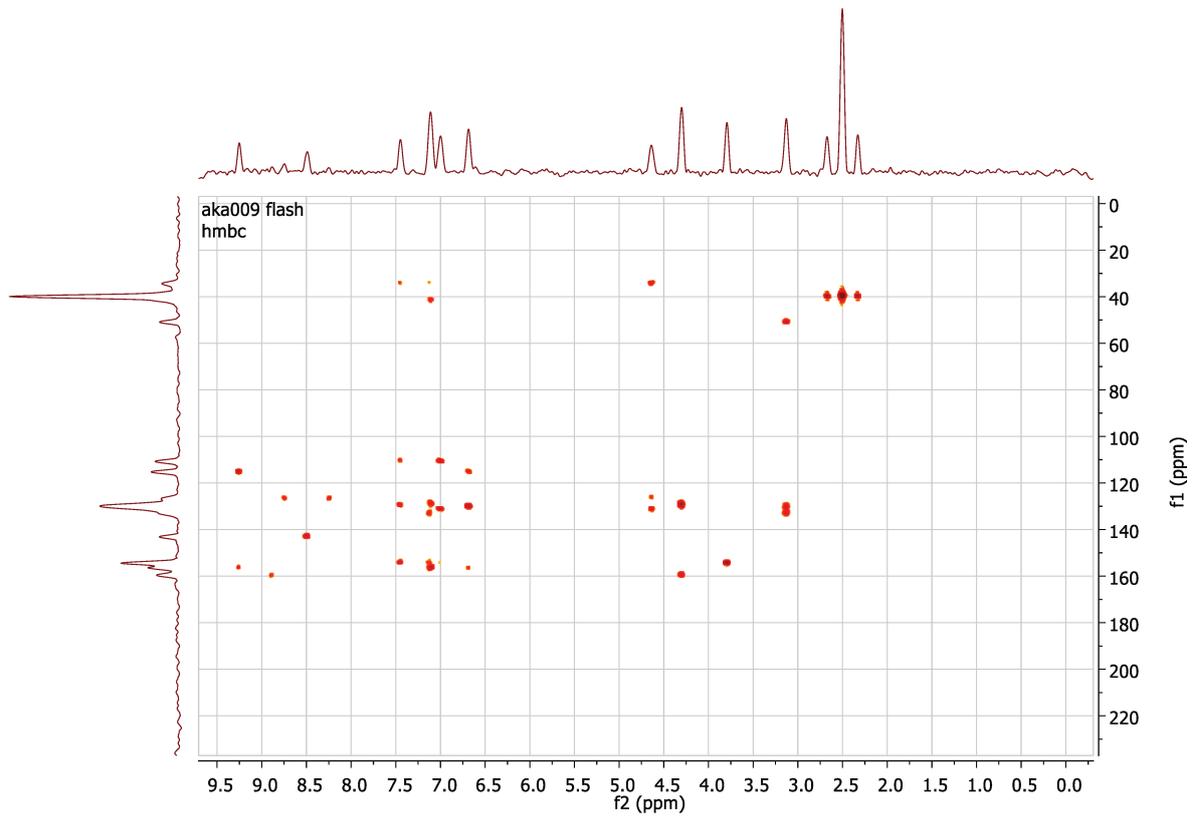


C₁₉H₁₉BrN₄O₃; M = 430,06 g.mol⁻¹

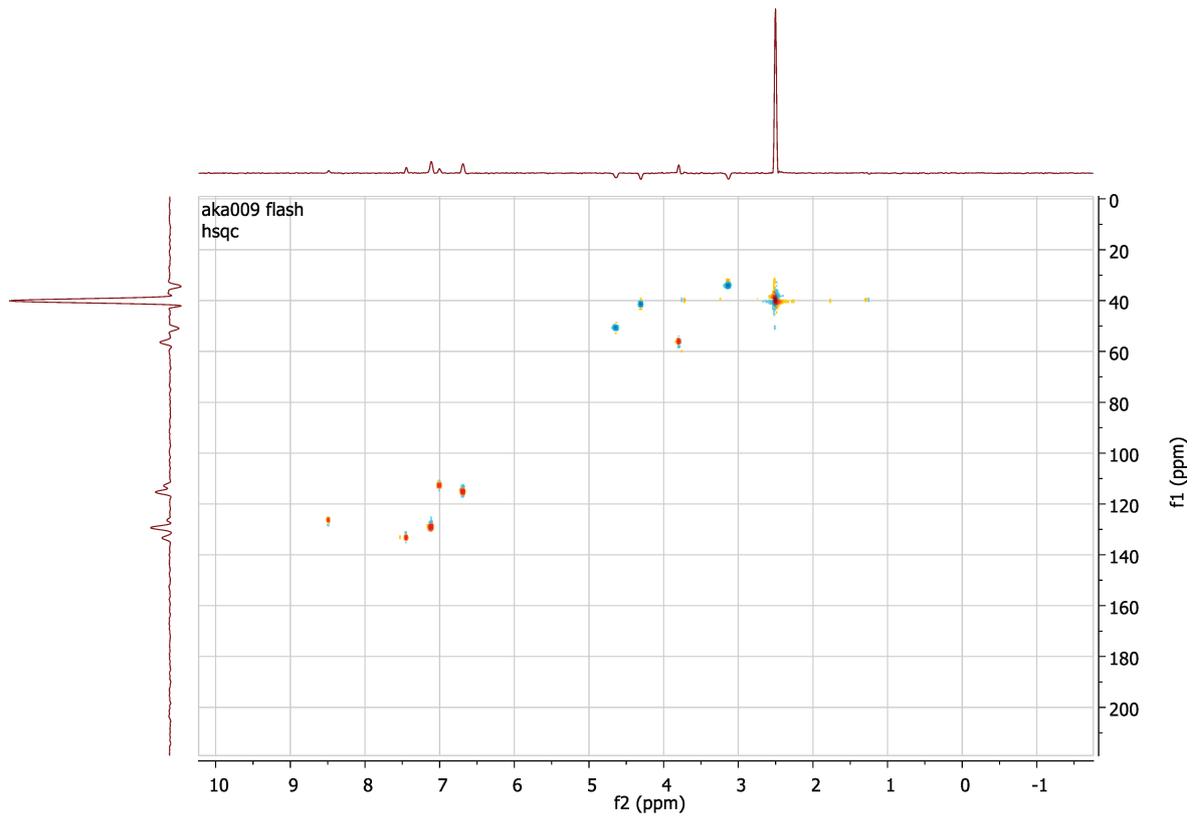
N°	¹³ C (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	Corrélations HMBC	Cosy
4	143,1		C5	
5	126,4	8,49 (s, 1H)	C9, C10	
6	159,9		C8	
7		8,90 (t, 1H)	C6	C8
8	41,7	4,30 (d, 2H)	C1'', C6	
9	50,9	4,64 (t, 2H)	C5, C10, C1'	C10
C5'10	34,3	3,13 (t2H)	C9, C1', C2'	C9
11	56,4	3,8 (s, 3H)		
1'	129,7		C10, C2', C6'	
2'	133,4	7,45 (d, 1H)	C10, C5'	
3'	154,3		C11, C4', C2'	
4'	154,5		C5', C11	
5'	129,3	7,13 (d, 1H)	C11, C6'	C6'
6'	112,9	7,00 (d, 1H)	C1', C5	C5'
1''	129,4		C8, C2''	
2''	129,1	7,10 (d, 2H)	C1'', C3'', C4''	C3''
3''	115,3	6,68 (d, 2H)	C2'', C3'', C4''	C2''
4''	156,6		C2'', C3''	



Spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé **3**



Spectres RMN 2D HMBC et COSY du composé 3



Spectres RMN 2D HSQC du composé **3**

Alain Aka KACOU

MAPIEM, université de Toulon

UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, université Félix

Houphouet-Boigny

**Synthèse et évaluation biologique des activités anti-biofilm
d'analogues d'hémibastadine à noyau 1,2,3-triazole**

Résumé : Les biofilms microbiens peuvent avoir des conséquences néfastes dans des domaines aussi divers que les activités marines ou le domaine biomédical. Ce travail a été entrepris afin d'approfondir les résultats obtenus avec des analogues d'hémibastadines à noyau 1,2,3-triazole. Il a porté sur des composés de cette famille résultant de variations de structures approfondies. Les essais menés ont permis de confirmer que ces composés sont bien actifs comme inhibiteurs de formation de biofilms sans activité antibactérienne, même lorsqu'il s'agit de biofilms multi-souches. Cependant, les tests ont montré leur toxicité vis-à-vis du phyto et du zooplancton. Les études de relation structures-activité ont permis de déterminer les éléments favorables l'activité anti-biofilm : nécessité de la présence d'au moins un hydroxyle phénolique sur l'un des noyaux aromatiques, intérêt des atomes de brome, perte d'activité lorsqu'il y a présence de chaînes alkylamines. En plus des bactéries marines, des essais ont également été menés sur des biofilms formés par une souche clinique de *Candida albicans*. Ils ont montré que ces composés sont également actifs comme inhibiteurs de formation de biofilms de cette levure, toujours sans activité antifongique.

Mot clés : Biofilm, hémibastadine, 1,2,3-triazole.

**Synthesis and biological evaluation of anti-biofilm activity of
hemibastadin analogs with 1,2,3-triazole ring**

Abstract: Microbial biofilms can produce adverse consequences in various domains, for example: marine activities and biomedical. This work has been led to deepen results obtained with previous hemibastadins with 1,2,3-triazole moiety. it was led with new compounds of this family. Biological tests showed that these compounds were really able to inhibit bacterial biofilms, even with multispecies biofilm. But these compounds were toxic for phyto and zooplankton. Structure-activity relationships studies showed important elements to have anti-biofilm activity: minimum one phenolic hydroxyle on an aromatic ring, importance of bromine, activity loss with alkylamines. Biologic tests have been also led on a *Candida albicans* clinical strains. These tests showed that these compounds are also actives on biofilm of this fungi, without antifungal activity.

Keywords : Biofilm, hemibastadin, 1,2,3-triazole.