



HAL
open science

Amphiphiles azobenzéniques : potentiel et relations structure-activité pour la lyse cellulaire

Antoine Franche

► **To cite this version:**

Antoine Franche. Amphiphiles azobenzéniques : potentiel et relations structure-activité pour la lyse cellulaire. Génie chimique. Université de Technologie de Compiègne; Université de Liège, 2019. Français. NNT : 2019COMP2523 . tel-02615459

HAL Id: tel-02615459

<https://theses.hal.science/tel-02615459>

Submitted on 22 May 2020

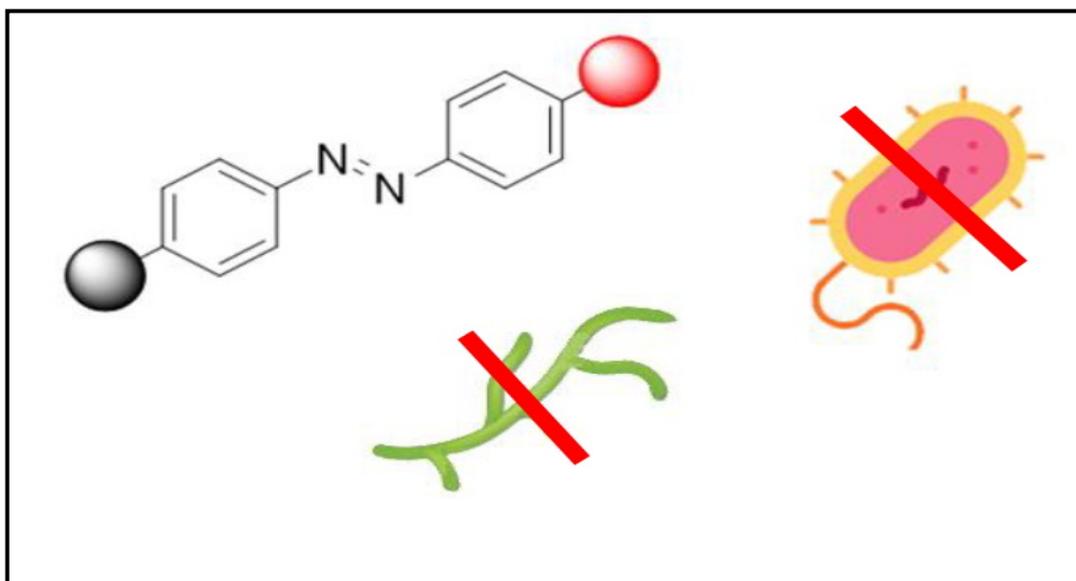
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par **Antoine FRANCHE**

Amphiphiles azobenzéniques : potentiel et relations structure-activité pour la lyse cellulaire

Thèse présentée en cotutelle
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenu le 9 décembre 2019

Spécialité : Sciences chimiques : Transformations intégrées de
la matière renouvelable (EA-4297)

D2523

UNIVERSITÉ DE TECHNOLOGIE
DE COMPIÈGNE

École doctorale des Sciences pour l'ingénieur

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TECHNOLOGIE DE
COMPIÈGNE

Discipline : Sciences chimiques

Présentée et soutenue le 9 décembre 2019 par

Antoine FRANCHE

Amphiphiles azobenzéniques : potentiel et
relations structure-activité pour la lyse cellulaire

Directrices de thèse :

Dr. Estelle LÉONARD, ESCOM

Dr. Magali DELEU, Gembloux Agro-Bio Tech

Composition du jury : Rapporteurs :

Pr. Nicolas BAYAN, Université Paris-Sud

Pr. Catherine SARAZIN, Université de Picardie Jules Verne

Examineurs :

Dr. Alina GHINET, Yncréa Hauts de France

Pr. Aurore RICHEL, Gembloux Agro-Bio Tech

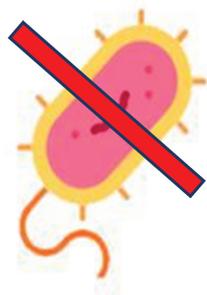
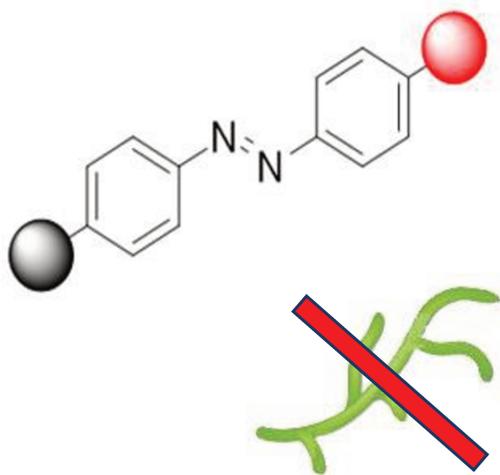
Dr. Sylvie COLLIN, Sorbonne Université

Dr. Antoine FAYEULLE, UTC

Membre invité : Dr. Laurence LINS, Gembloux Agro-Bio Tech

Amphiphiles azobenzéniques : potentiel et relations structure-activité pour la lyse cellulaire

Par Antoine FRANCHE



Thèse présentée pour l'obtention du
grade de Docteur

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE

UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

Amphiphiles azobenzéniques : potentiel et relations structure-activité pour la lyse cellulaire

Antoine FRANCHE

Directrices de thèse : Dr Estelle LEONARD & Dr Magali DELEU

9 décembre 2019

RÉSUMÉ

L'émergence de souches bactériennes et fongiques de plus en plus résistantes à la désinfection est un problème qui menace le développement et la santé humaine à travers le monde. Parmi les modes d'action possibles de ces traitements, notre intérêt va se porter sur les interactions avec la membrane plasmique dans le but de lyser le micro-organisme. Le premier objectif de cette thèse est donc de développer des molécules avec une structure amphiphile afin d'interagir avec ces membranes. Les azobenzènes sont intéressants à ce titre car leurs deux groupements phényles constituent déjà un squelette carboné apolaire. Le greffage d'une tête polaire sur ces molécules permettra donc de leur conférer des propriétés amphiphiles. Trois familles d'azobenzènes ont été synthétisées afin d'évaluer leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Un autre objectif de la thèse est de fournir les premières hypothèses sur le mode d'action des antibactériens synthétisés. Plus particulièrement, leur capacité à interagir avec des membranes plasmiques biomimétiques de bactéries a été évaluée.

La première famille (AzoOH) comportant un groupement hydroxyle comme tête polaire a montré de bonnes propriétés biologiques mais une faible capacité à interagir avec les membranes plasmiques. La seconde famille (AzoPEG), avec une tête polaire de type triéthylène glycol a montré de médiocres activités biologiques, et une capacité à interagir avec les membranes plasmiques n'ont pas été améliorées. La troisième famille (AzoTAI) avec une tête polaire de type triméthylammonium a montré d'excellentes propriétés biologiques, une capacité à s'adsorber aux interfaces hydrophiles/hydrophobes et une interaction spécifique avec les lipides membranaires bactériens. L'interaction entre les AzoTAI à plus longue chaîne (6 carbones) et la phosphatidylethanolamine est particulièrement favorable.

De manière globale, parmi les composés synthétisés, seule la famille des AzoTAI est capable d'interagir avec la membrane plasmique des bactéries et cette interaction est corrélée à l'activité antibactérienne. Néanmoins, même si ces composés constituent de bons candidats pour la lyse des micro-organismes, leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules humaines pourrait limiter leurs applications dans le domaine médical.

Mots-clés : azobenzène amphiphile, antibactérien, antifongique, lipides bactériens, membrane plasmique, synthèse organique, modélisation, relations structure-activité

ABSTRACT

The emergence of bacterial and fungal strains more and more resistant to disinfection is a threat to the development of nations and human health around the world. Amongst the mechanism of action, we will focus on the interaction between the molecule and the plasmic membrane for the lysis of the microorganism. The first goal of this work is to synthesize amphiphilic molecules to interact with bacterial membrane. Azobenzene are interesting because their two phenyl group give them an apolar moiety, the next step is a grafting of a polar head to make them become an amphiphile molecule. Three types of azobenzene were synthesized to evaluate their antibacterial properties and their antifungal properties. The second goal of this work is to understand how they interact with the plasmic membranes. To perform this, we tested the azobenzenes on biomimetic models of plasmic membranes.

The first group of compounds (AzoOH) with an alcohol group as polar head showed good biological properties but have a poor potential to interact with plasmic membrane. The second group of compounds (AzoPEG) with a triethylene-glycol type polar head have mediocre biological activities, and their ability to interact with the membrane were not enhanced. The third group of compounds (AzoTAI) with a trimethylammonium type polar head showed very good biological activities, and strong interaction with bacterial membrane lipid. These antibacterial activities are correlated to their interaction with bacterial lipids. It also has good abilities to adsorb themselves to hydrophilic/hydrophobic interfaces. However, their cytotoxic activity on human cells can be a severe drawback with their use.

Keywords : amphiphilic azobenzene, antibacterial, antifungal, bacterial lipid, plasmic membrane, organic synthesis, modeling, structure-activity relationship

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire Transformation Intégré de la Matière Renouvelable (TIMR - EA 4297) dirigé par le Pr André Paus, puis par le Pr Isabelle Pezron, que je remercie conjointement. Je remercie également l'Ecole Supérieur de Chimie Organique et Minérale (ESCOM) et le Laboratoire de Biophysique Moléculaire aux Interfaces (Gembloux AgroBioTech) pour leur accueil au sein de leurs locaux. Ce travail a été réalisé en cotutelle entre l'Université de Technologie de Compiègne en France et l'Université de Liège (Gembloux AgroBioTech) en Belgique.

Je remercie également le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ainsi que Campus France pour les financements accordés pour cette bourse de thèse.

Je remercie particulièrement les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, le professeur Catherine Sarazin de l'Université Picardie Jules Verne, le professeur Nicolas Bayan de l'Université Paris-Sud, le professeur Aurore Richel de l'Université de Liège (Gembloux AgroBioTech), le Dr Alina Ghinet d'Yncréa Hauts-de-France, le Dr Sylvie Collin de Sorbonne Université, le Dr Antoine Fayeulle de l'Université de Technologie de Compiègne et le Dr Laurence Lins de l'Université de Liège (Gembloux AgroBioTech).

Je remercie tout particulièrement mes deux directrices de thèse, le Dr Estelle Léonard ainsi que le Dr Magali Deleu pour m'avoir donné ma chance en me choisissant pour cette thèse. Ce travail a été réalisé sous leur direction et je les remercie pour leurs encadrements, leurs soutiens et pour toutes les choses que j'ai apprises durant ces trois années.

Je remercie également le Dr Antoine Fayeulle pour l'encadrement de la partie microbiologique et de la thèse de manière plus générale. Merci pour ta pédagogie et ta disponibilité. Merci également de m'avoir fait confiance pour les enseignements de BL01 et de BL22.

Je remercie également le Pr Isabelle Pezron pour l'encadrement de la partie physico-chimie et de la thèse de manière plus générale.

Je remercie également le Dr Laurence Lins pour m'avoir encadré pour les modélisations

De manière générale, je remercie toutes les très nombreuses personnes qui ont pu m'aider au travers de ma thèse ou des enseignements, que ce soit à l'UTC, à l'ESCOM ou à Gembloux.

Je remercie Akifak et Elodie pour les corrections. Je remercie également Timothé pour la mise en page. Merci Alexandre pour l'impression.

Je remercie également mes amis et ma famille pour leur soutien le long de ces trois années.

Enfin, je salue les camarades de Cinem'UTC, et je remercie tous les spectateurs occasionnels ou non de nos séances du semestre de printemps 2019. Je salue également la commission Jeux de société de Gembloux AgroBioTech

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| RÉSUMÉ & ABSTRACT..... | 8 |
| REMERCIEMENTS..... | 12 |
| TABLE DES MATIÈRES..... | 14 |
| LISTE DES FIGURES..... | 18 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 26 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | 28 |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE..... | 32 |
| CHAPITRE 1 – ÉTAT DE L’ART..... | 34 |
| I. Les infections nosocomiales..... | 36 |
| 1. Le phénomène de résistance aux antibactériens et antifongiques..... | 37 |
| 2. Les micro-organismes responsables d’infections nosocomiales..... | 37 |
| II. Les antibactériens et les antifongiques..... | 38 |
| 1. Les antibactériens..... | 38 |
| a) Les peptides..... | 39 |
| b) Les céragénines..... | 42 |
| c) Les dérivés de sucres..... | 42 |
| d) La reutericyclin..... | 43 |
| 2. Les antifongiques..... | 44 |
| a) Les antifongiques agissant sur la membrane plasmique des champignons..... | 44 |
| 3. Les tensioactifs..... | 45 |
| a) Les tensioactifs anioniques..... | 49 |
| b) Les tensioactifs cationiques..... | 49 |
| c) Les tensioactifs zwiterioniques..... | 51 |
| d) Les tensioactifs non-ioniques..... | 51 |
| III. Les cibles biologiques..... | 52 |
| 1) L’enveloppe bactérienne..... | 52 |
| 2) L’enveloppe fongique..... | 53 |
| 3) Composition des membranes plasmiques et modèles biomimétiques..... | 54 |
| 4) Les micro-organismes testés au cours de la thèse..... | 57 |
| a) Les bactéries..... | 57 |
| b) Les levures..... | 58 |
| c) Les champignons filamenteux..... | 59 |
| IV. Les azobenzènes..... | 59 |
| 1) Propriétés..... | 59 |
| 2) Synthèse..... | 62 |
| a) Création de la liaison N=N à partir de synthons..... | 62 |

| | | |
|------------|---|-----|
| b) | Modification d'une liaison N-N..... | 66 |
| c) | Réarrangements..... | 67 |
| 3) | Propriétés biologiques des azobenzènes..... | 68 |
| a) | Azobenzènes antibactériens..... | 68 |
| b) | Azobenzènes antifongiques..... | 72 |
| c) | Toxicité des azobenzènes..... | 73 |
| CHAPITRE 2 | – LA FAMILLE DES 4-ALKYL-4'-HYDROXYAZOBENZÈNE (AzoOH)..... | 76 |
| I. | Synthèse..... | 78 |
| II. | Propriétés physico-chimiques..... | 80 |
| III. | Propriétés antifongiques et antibactériennes..... | 80 |
| 1. | Propriétés antifongiques..... | 80 |
| 2. | Propriétés antibactériennes..... | 82 |
| IV. | Perméabilisation des liposomes..... | 89 |
| V. | Modélisation de l'insertion dans une bicouche lipidique..... | 92 |
| VI. | Modélisation des interactions avec les lipides membranaires..... | 93 |
| VII. | Conclusion..... | 94 |
| CHAPITRE 3 | – LA FAMILLE DES TRIÉTHYLÈNE GLYCOL MONO(4-ALKYL AZOBENZÈNE) ÉTHER (AzoPEG)..... | 96 |
| I. | Synthèse..... | 98 |
| II. | Propriétés physico-chimiques..... | 99 |
| III. | Propriétés antifongiques et antibactériennes..... | 101 |
| 1. | Propriétés antifongiques..... | 101 |
| 2. | Propriétés antibactériennes..... | 103 |
| IV. | Perméabilisation des liposomes..... | 108 |
| V. | Modélisation de l'insertion dans une bicouche lipidique..... | 111 |
| VI. | Modélisation des interactions avec les lipides membranaires..... | 113 |
| VII. | Conclusion..... | 114 |
| CHAPITRE 4 | – LA FAMILLE DES IODURE DE 4-ALKYL-4'-(2-N-N-N-TRIMÉTHYLAMINIOETHOXY)AZOBENZÈNE (AzoTAI)..... | 116 |
| I. | Synthèse..... | 118 |
| II. | Propriétés physico-chimiques..... | 121 |
| III. | Propriétés biologiques..... | 123 |
| 1. | Propriétés antifongiques..... | 123 |
| 2. | Propriétés antibactériennes..... | 131 |
| IV. | Modélisation de l'insertion dans une bicouche lipidique..... | 140 |
| V. | Perméabilisation des liposomes..... | 142 |
| VI. | Capacité d'adsorption sous une monocouche lipidique..... | 147 |
| VII. | Modélisation des interactions avec les lipides membranaires..... | 151 |
| VIII. | Evaluation de la toxicité et du pouvoir hémolytique..... | 153 |

| | | |
|--|---|-----|
| 1. | Cytotoxicité..... | 153 |
| 2. | Pouvoir hémolytique..... | 154 |
| IX. | Conclusion..... | 155 |
| CHAPITRE 5 – Relations STRUCTURE-FONCTION..... | | 158 |
| I. | Analyse des activités antibactériennes..... | 160 |
| 1. | Cas de <i>Micrococcus luteus</i> | 163 |
| 2. | Cas de <i>Bacillus subtilis</i> | 164 |
| 3. | Cas d' <i>Escherichia coli</i> | 165 |
| II. | Conclusion sur les relations structure-activité..... | 166 |
| III. | Perspectives..... | 167 |
| MATERIELS & MÉTHODES..... | | 170 |
| I. | Réactifs, solvants et matériels utilisés en synthèse organique.. | 170 |
| II. | Protocoles généraux et caractérisation par produit des composés obtenus..... | 171 |
| 1. | Famille AzoOH..... | 171 |
| a) | Procédure générale de synthèse des AzoOH..... | 171 |
| 2. | Famille AzoPEG..... | 173 |
| a) | Triéthylène glycol monotosylate..... | 174 |
| b) | Procédure générale de synthèse des AzoPEG..... | 174 |
| 3. | Famille AzoTAI..... | 177 |
| a) | Procédure générale de synthèse de 4-alkyl-4'-(2-hydroxyéthoxy)azobenzène..... | 177 |
| b) | Procédure générale de synthèse des iodure de 4-alkyl-4'-(2-N,N,N-triméthylaminioéthoxy)-azobenzène..... | 179 |
| III. | Solvants et matériels utilisés pour la physico-chimie..... | 182 |
| IV. | Matériels, milieux de culture et techniques pour les propriétés biologiques..... | 182 |
| 1. | Les bactéries..... | 182 |
| 2. | Les levures..... | 182 |
| 3. | Les champignons filamenteux..... | 183 |
| 4. | Détermination de l'inhibition..... | 183 |
| 5. | Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)..... | 184 |
| V. | Matériels et méthode pour la formation de liposomes et les mesures de perméabilisation des liposomes..... | 185 |
| VI. | Logiciels utilisés pour les ACP..... | 186 |
| VII. | Matériels et méthode pour l'évaluation de la capacité d'adsorption sous une monocouche lipidique..... | 187 |
| VIII. | Modélisation..... | 187 |
| 1. | Insertion dans la bicouche (IMPALA)..... | 187 |
| 2. | Interaction entre les lipides bactériens (HyperMatrix)..... | 188 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | | 190 |

ANNEXE.....214

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 Proportion des infections nosocomiales en fonction du type de micro-organisme..... | 36 |
| Figure 2 Graphique montrant le nombre et le type de nouveaux antibiotiques sur le marché de 1980 à 2016..... | 39 |
| Figure 3 Structure chimique de la daptomycine..... | 40 |
| Figure 4 Structure chimique de la gramicidine S et de son analogue synthétique | 41 |
| Figure 5 Structure chimique du BRBR-NH ₂ | 42 |
| Figure 6 Structure chimique de la reutericycline..... | 43 |
| Figure 7 Structure chimique de l'amphotéricine B..... | 45 |
| Figure 8 Structure globale des tensioactifs..... | 46 |
| Figure 9 Organisation en solution des tensioactifs en fonction de la concentration..... | 47 |
| Figure 10 Relation entre la structure et la nature du tensioactif et son organisation..... | 48 |
| Figure 11 Structure du dodécylsulfate de sodium..... | 49 |
| Figure 12 Structure chimique des principaux tensioactifs d'ammoniums/d'amidiniums..... | 50 |
| Figure 13 Structure du PQ-11,11..... | 50 |
| Figure 14 Structure du 12(3)2(3)12..... | 51 |
| Figure 15 Structure du P16S3..... | 51 |
| Figure 16 Structure du Triton X-100..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Figure 17 Schéma de la paroi d'une bactérie..... | 52 |
| Figure 18 Schéma de l'organisation structurale de la paroi cellulaire de champignons pathogènes..... | 54 |
| Figure 19 Schéma de la membrane plasmique d'une cellule..... | 55 |
| Figure 20 Schéma en trois dimensions de la membrane plasmique. Les différents domaines lipidiques sont visibles avec les changements de couleurs..... | 56 |
| Figure 21 Photoisomérisation de l'azobenzène..... | 60 |
| Figure 22 Représentation des distances dans le <i>trans</i> -azobenzène et le <i>cis</i> -azobenzène..... | 60 |
| Figure 23 Mécanismes proposés dans la littérature pour l'isomérisation <i>cis/trans</i> des azobenzènes..... | 62 |
| Figure 24 Exemple de dimérisation oxydante..... | 63 |
| Figure 25 Réduction de dérivés de nitrobenzènes pour l'obtention d'azobenzènes symétriques..... | 63 |
| Figure 26 Réduction de dérivés de nitrobenzènes par des nanofils de platine..... | 64 |
| Figure 27 Mécanisme du couplage diazoïque pour l'obtention d'azobenzènes dissymétriques..... | 64 |
| Figure 28 Couplage diazoïque utilisant des nanoparticules de fer magnétiques..... | 65 |
| Figure 29 Mécanisme réactionnel de l'oxydation de Mills..... | 65 |
| Figure 30 Fonctionnalisation d'un calix[4]arène par un azobenzène..... | 66 |

| | |
|--|----|
| Figure 31 Exemple de synthèse d'azobenzène par oxydation de dérivés d'hydrazobenzène en utilisant du NBS..... | 66 |
| Figure 32 Réduction d'azoxybenzène en présence de levure de boulanger... | 67 |
| Figure 33 Mécanisme du réarrangement de Wallach..... | 67 |
| Figure 34 Azobenzènes avec un groupement β -lactamine (A), azobenzène dérivés d'un flavonoïde (B), azobenzène dérivé de l'acide kojique (C) Azobenzène portant un cycle pyrazole (D)..... | 69 |
| Figure 35 Effet de la photoisomérisation sur l'activité antibactérienne de l'azobenzène couplé à un sel biliaire..... | 70 |
| Figure 36 Structure des fluorosurfactants..... | 71 |
| Figure 37 Structure de base du petit azobenzène inhibiteur de la croissance du biofilm des bactéries gram-positives..... | 71 |
| Figure 38 Structure des deux types d'azosilatranes synthétisés..... | 72 |
| Figure 39 Structure de l'azobenzène breveté le plus prometteur (A) Structure des deux composés les plus actifs (B)..... | 73 |
| Figure 40 Structure des quatre bases de Schiff portant un azobenzène..... | 73 |
| Figure 41 Structure d'un colorant portant un D-galactose en position 4'..... | 74 |
| Figure 42 Structure chimique de RAzoOH..... | 78 |
| Figure 43 Synthèse des composés de la famille AzoOH..... | 79 |
| Figure 44 Inhibition de la croissance des levures en présence des AzoOH... | 81 |
| Figure 45 Inhibition de la croissance des champignons filamenteux en présence des AzoOH..... | 81 |

| | |
|--|-----|
| Figure 46 Inhibition de la croissance d' <i>E.coli</i> en présence d'AzoOH..... | 82 |
| Figure 47 Taux de croissance (μ) et temps de latence d' <i>E.coli</i> en présence de HAzoOH..... | 83 |
| Figure 48 Inhibition de la croissance de <i>M.luteus</i> en présence d'AzoOH.... | 84 |
| Figure 49 Cinétique de la croissance de <i>M.luteus</i> en présence d'HAzoOH.. | 85 |
| Figure 50 Inhibition de la croissance de <i>B.subtilis</i> en présence d'AzoOH...86 | |
| Figure 51 Cinétique de la croissance de <i>B.subtilis</i> en présence d'HAzoOH.87 | |
| Figure 52 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne d' <i>E.coli</i> en fonction de la concentration en AzoOH. Les liposomes sont constitués d'un mélange PE/PG/CL (70/25/5)..... | 89 |
| Figure 53 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de <i>M.luteus</i> en fonction de la concentration en AzoOH. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/DMDG/CL (63/32/5)..... | 90 |
| Figure 54 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule d'AzoOH en fonction de la position de son centre de masse dans une membrane implicite selon la procédure IMPALA..... | 92 |
| Figure 55 Différences entre les énergies d'interactions des AzoOH avec les lipides bactériens par rapport aux énergies d'interactions avec eux-mêmes dans un assemblage multimoléculaire calculé par la méthode de docking Hypermatrix..... | 94 |
| Figure 56 Synthèse des AzoPEG..... | 99 |
| Figure 57 Mesure de la tension de surface en fonction de la concentration en AzoPEG..... | 100 |
| Figure 58 Inhibition de la croissance des 3 levures en fonction de la concentration en AzoPEG..... | 102 |

| | |
|--|-----|
| Figure 59 Inhibition de la croissance des 3 champignons filamenteux en fonction de la concentration en AzoPEG..... | 103 |
| Figure 60 Inhibition de la croissance de <i>E.coli</i> en fonction de la concentration en AzoPEG..... | 104 |
| Figure 61 Inhibition de la croissance de <i>M.luteus</i> en fonction de la concentration en AzoPEG..... | 104 |
| Figure 62 Evolution de la croissance de <i>M.luteus</i> en présence d'EtAzoPEG..... | 105 |
| Figure 63 Inhibition de la croissance de <i>B.subtilis</i> en fonction de la concentration en AzoPEG..... | 106 |
| Figure 64 Evolution de la croissance de <i>B.subtilis</i> en présence d'HexAzoPEG..... | 107 |
| Figure 65 Temps de latence et taux de croissance de <i>B.subtilis</i> en fonction de la concentration en HexAzoPEG..... | 107 |
| Figure 66 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne d' <i>E.coli</i> en fonction de la concentration en AzoPEG. Les liposomes sont constitués d'un mélange PE/PG/CL (70/25/5)..... | 109 |
| Figure 67 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de <i>M.luteus</i> en fonction de la concentration en AzoPEG. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/DMDG/CL (63/32/5)..... | 110 |
| Figure 68 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule d'AzoPEG en fonction de la position de son centre de masse dans une membrane implicite selon le modèle IMPALA..... | 112 |
| Figure 69 Différences entre les énergies d'interaction des AzoPEG avec les lipides bactériens par rapport aux énergies d'interactions avec eux-mêmes dans un assemblage multimoléculaire calculé par la méthode de docking Hypermatrix..... | 113 |
| Figure 70 Structure de la famille AzoTAI..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| Figure 71 Synthèse d'azobenzènes cationiques selon Salta <i>et al.</i> | 119 |
| Figure 72 Synthèse de l' HAzoTAI selon Damijonaitis <i>et al.</i> | 120 |
| Figure 73 Synthèse de la famille AzoTAI..... | 121 |
| Figure 74 Mesure de la tension de surface en fonction de la concentration en AzoTAI | 122 |
| Figure 75 Inhibition de la croissance des levures en présence des AzoTAI à 30 µg/mL..... | 123 |
| Figure 76 Inhibition de la croissance des champignons filamenteux en présence des AzoTAI à 30µg/mL..... | 124 |
| Figure 77 Inhibition de <i>C.krusei</i> par BuAzoTAI et HexAzoTAI | 125 |
| Figure 78 Inhibition de <i>C.kefyr</i> par BuAzoTAI et HexAzoTAI | 126 |
| Figure 79 Inhibition de <i>C.tropicalis</i> par BuAzoTAI et HexAzoTAI | 127 |
| Figure 80 Inhibition de <i>A.alternata</i> par BuAzoTAI et HexAzoTAI | 128 |
| Figure 81 Inhibition de <i>C.cladosporiodes</i> par BuAzoTAI et HexAzoTAI | 129 |
| Figure 82 Inhibition de <i>F.solani</i> par BuAzoTAI et HexAzoTAI | 130 |
| Figure 83 Inhibition de la croissance de <i>E.coli</i> en fonction de la concentration en AzoTAI | 132 |
| Figure 84 Temps de latence et taux de croissance en fonction de la concentration en HexAzoTAI | 133 |
| Figure 85 Nombre d'UFC après 24h en fonction de la concentration en HexAzoTAI et CMB calculée à partir de l'inoculum..... | 134 |
| Figure 86 Inhibition de la croissance de <i>M.luteus</i> en fonction de la concentration en AzoTAI | 135 |

| | |
|---|-----|
| Figure 87 Temps de latence et μ de <i>M.luteus</i> en fonction des différents AzoTAI..... | 136 |
| Figure 88 Nombre d'UFC en fonction de la concentration en HexAzoTAI et BuAzoTAI | 137 |
| Figure 89 Inhibition de la croissance de <i>B.subtilis</i> en fonction de la concentration en AzoTAI..... | 138 |
| Figure 90 Temps de latence de la croissance et taux de croissance de <i>B.subtilis</i> en fonction des différents AzoTAI | 139 |
| Figure 91 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule d'AzoTAI en fonction de la position de son centre e masse dans une membrane implicite selon le modèle IMPALA..... | 141 |
| Figure 92 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne d' <i>E.coli</i> en fonction de la concentration en AzoTAI. Les liposomes sont constitués d'un mélange PE/PG/CL (70/25/5)..... | 142 |
| Figure 93 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de <i>M.luteus</i> en fonction de la concentration en AzoTAI. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/DMDG/CL (63/32/5)..... | 143 |
| Figure 94 Perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de <i>B.subtilis</i> par les différentes molécules de la famille AzoTAI à différentes concentrations. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/PE/CL (81/14/5)..... | 144 |
| Figure 95 Perméabilisation des liposomes sans PE par les différentes molécules de la famille AzoTAI à différentes concentrations..... | 146 |
| Figure 96 Perméabilisation des liposomes sous l'action de BuAzoTAI et HexAzoTAI à un rapport d'azobenzènes/phospholipides de 0,75..... | 147 |
| Figure 97 Evolution en fonction du temps de la pression de surface de la monocouche de PE initialement comprimée à 12mN/m suite à l'injection de BuAzoTAI dans la sous-phase (t=0). | 148 |

| | |
|---|-----|
| Figure 98 Variation de la pression de surface $\Delta\Pi$ de la monocouche de PE en fonction de la pression initiale Π_i | 149 |
| Figure 99 (A) MIP de PE, PG et CL pour BuAzoTAI et HexAzoTAI (B) $d\Pi_0$ de PE, PG et CL pour BuAzoTAI et HexAzoTAI | 150 |
| Figure 100 Energie d'interaction de BuAzoTAI et HexAzoTAI dans un assemblage multimoléculaire calculé par la méthode de docking Hypermatrix..... | 151 |
| Figure 101 Interactions entre BuAzoTAI (A,B,C) et HexAzoTAI (D,E,F) et le PE (A et D), PG (B et E) et CL (C et F) obtenues en utilisant la méthode de docking HyperMatrix..... | 152 |
| Figure 102 ACP des CMI_{50} des azobenzènes en fonction de la souche bactérienne..... | 160 |
| Figure 103 ACP de toutes les données expérimentales et issues de la modélisation dans le cas de <i>M.luteus</i> | 163 |
| Figure 104 ACP de toutes les données expérimentales et issues de la modélisation dans le cas de <i>B.subtilis</i> | 164 |
| Figure 105 ACP de toutes les données expérimentales et issus de la modélisation dans le cas de <i>E.coli</i> | 165 |
| Figure 106 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule de BuAzoTAI en forme <i>cis</i> ou <i>trans</i> en fonction de la position de son centre de masse dans une membrane implicite selon le modèle IMPALA..... | 168 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 Activités biologiques de la reutericycline sur divers agents microbiologiques..... | 44 |
| Tableau 2 Variation maximale de la tension de surface de l'eau observée des différents composés de la famille AzoOH à 25°C dans l'eau..... | 80 |
| Tableau 3 Détermination des CMI ₅₀ d' <i>E.coli</i> , <i>M.luteus</i> et <i>B.subtilis</i> pour les composés de la famille AzoOH | 88 |
| Tableau 4 Perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de <i>B.subtilis</i> par les différentes molécules de la famille AzoOH à différentes concentrations..... | 91 |
| Tableau 5 CMC et γ_{CMC} mesurées à 25°C dans l'eau pour la famille AzoPEG..... | 101 |
| Tableau 6 CMI ₅₀ déterminés pour les différents dérivés d'AzoPEG..... | 108 |
| Tableau 7 Perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de <i>B.subtilis</i> par les différentes molécules de la famille AzoPEG à différentes concentrations..... | 111 |
| Tableau 8 CMC et γ_{CMC} mesurées pour AzoTAI à 25°C dans l'eau..... | 122 |
| Tableau 9 CMI ₅₀ des composés AzoTAI et de l'amphotéricine B pour les six champignons..... | 131 |
| Tableau 10 Détermination des CMI ₅₀ des trois souches pour les composés de la famille AzoTAI | 140 |
| Tableau 11 Distance N-O et N-P entre la molécule d'azobenzène et le phospholipide calculé par HyperMatrix..... | 153 |
| Tableau 12 CC ₅₀ d' EtAzoTAI , BuAzoTAI et HexAzoTAI sur les cellules HEK-293..... | 154 |
| Tableau 13 CH ₁₀ et CH ₅₀ d' EtAzoTAI , BuAzoTAI et HexAzoTAI sur les érythrocytes humains..... | 154 |

Tableau 14 CMI₅₀ des composés ayant les meilleures activités antibactériennes.....161

Tableau 15 Proportion molaire des lipides membranaires bactériens utilisés pour former les liposomes.....185

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACP = Analyse composante principale

ADN = Acide désoxyribonucléique

ARN = Acide ribonucléique

ATP = Adénosine triphosphate

BMR = Bactérie multirésistante

CC₅₀ = Concentration pour laquelle une cytotoxicité de 50% est observée

CDC = Centers of Diseases Control and Prevention

CH₁₀ = Concentration pour laquelle 10% d'hémolyse est observée

CH₅₀ = Concentration pour laquelle 50% d'hémolyse est observée

CL = Cardiolipine

CMB = Concentration minimale bactéricide

CMC = Concentration micellaire critique

CMI₅₀ = Concentration minimale inhibitrice de 50% de la croissance du micro-organisme

DCM = Dichlorométhane

DMAP = 4-Diméthylaminopyridine

DMDG = Dimannosyldiacylglycérol

DMF = Diméthylformamide

DMSO = Diméthylsulfoxyde

DGDG = Digalactosyldiacylglycérol

FTIR = Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HRMS = Spectrométrie de masse à haute résolution

LPS = Lipopolysaccharides

m-CPBA = Acide métachloroperbenzoïque

MIP = Pression d'insertion maximale

MRSA = *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

NBS = *N*-Bromosuccinimide

PDR = Résistant à tous les antibiotiques existants

PDA = Potato Dextrose Agar

PE = Phosphatidyléthanolamine

PG = Phosphatidylglycérol

SDS = Dodécylsulfate de sodium

TA = Température ambiante

TsCl = Chlorure de tosyle

THF = Tétrahydrofurane

TSA = Trypto-caséine soja

UFC = Unité formant une colonie

XDR = Extrêmement résistant aux antibiotiques

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les infections nosocomiales infectent en France 700 000 patients chaque année¹. Il y a donc un intérêt au développement de nouveaux désinfectants qui soient à la fois universels pour tous les agents pathogènes (bactéries et champignons, notamment) et non toxiques. En effet, les agents utilisés (par exemple dans les gels hydroalcooliques) comme le triclosan commencent à montrer des signes de toxicité^{2,3}.

L'objectif principal de cette thèse est de développer une petite série de trois familles de molécules avec un noyau azobenzénique afin d'évaluer les potentielles applications de ces types de composés pour la désinfection, en mesurant à la fois leurs propriétés antifongiques et antibactériennes, et en testant leur innocuité. L'application visée est ici la désinfection en milieu hospitalier. Les azobenzènes ont été privilégiés dans le cadre de cette thèse car ce sont des composés dont la structure est compatible avec la structure des tensioactifs. De plus, le laboratoire TIMR possède une expertise sur ce sujet^{4,5}.

Les molécules antibactériennes peuvent cibler de nombreux organites ou récepteurs, aussi bien à la surface qu'à l'intérieur de la bactérie. Notre objectif est de cibler la membrane plasmique des micro-organismes.

Dans le cadre de la thèse, nous nous attacherons principalement à développer des molécules capables d'interagir avec la partie lipidique de la membrane plasmique afin de perturber et/ou de lyser celle-ci et provoquer ainsi la mort cellulaire.

Un autre objectif de la thèse est de fournir les premières hypothèses sur le mode d'action des antibactériens mis au point.

Les molécules développées dans le cadre de cette thèse seront obtenues par voie de synthèse chimique. La stratégie adoptée est de rendre amphiphile l'azobenzène par le greffage de groupements polaires afin d'interagir avec la membrane plasmique des micro-organismes.

L'étude plus approfondie sur le mode d'action est réalisée via une approche à la fois *in silico* et à la fois biophysique expérimentale via l'utilisation de liposomes biomimétiques pour voir l'effet des composés sur l'intégrité membranaire et une monocouche lipidique afin de déterminer la spécificité lipidique de l'interaction. Une approche *in-silico* a également été utilisée pour obtenir une description moléculaire/atomique de l'interaction^{6,7}.

La transdisciplinarité de l'approche utilisée dans cette thèse permettra de dégager les premiers éléments des relations structure-activité pour la synthèse de nouveaux antibactériens azobenzéniques.

Le but final de ce projet sera de pouvoir mettre à jour des agents antibactériens qui seraient capables de désinfecter des matériels hospitaliers, de type sondes, instruments de chirurgie etc.

1

État de l'art

I. Les infections nosocomiales

Une infection nosocomiale est une infection contractée dans un établissement de santé. En France, on estime chaque année le nombre d'infections nosocomiales à 700 000 par an (**Figure 1**). Ces dernières engendrent par la suite 4000 décès par an¹. Un rapport de 2008 montre que la prévalence des infections nosocomiales en Belgique est comparable à celles observées en France et aux Pays-Bas⁸. Les personnes les plus touchées par les infections nosocomiales sont les personnes immunodéprimées, les enfants en très bas âge, les personnes âgées ainsi que les personnes déjà atteintes d'une maladie sévère.

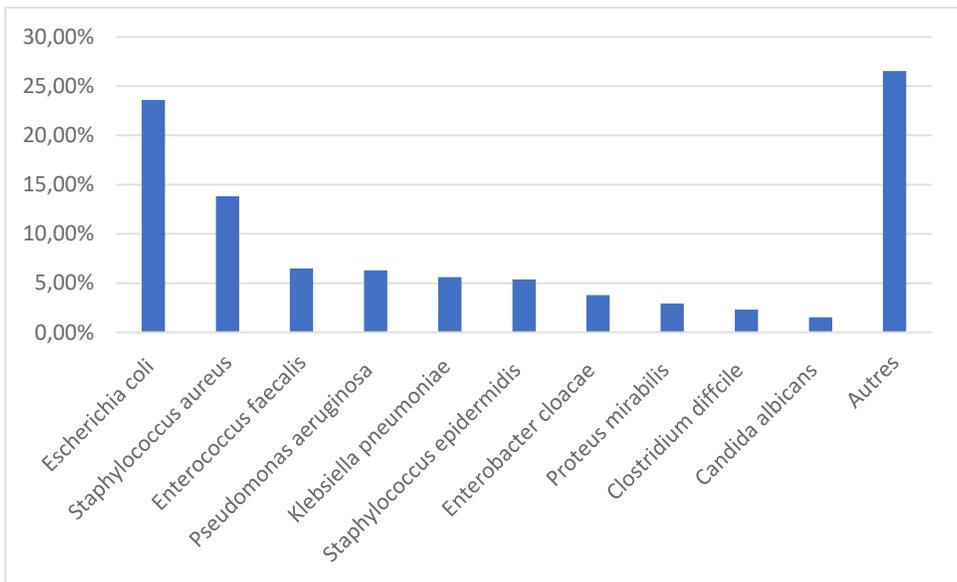


Figure 1 Proportion des infections nosocomiales en fonction du type de micro-organisme. Etude réalisée sur 4232 patients dans 403 établissements de santé. Extrait de Daniau et al⁸.

Les milieux hospitaliers représentent un environnement où de nombreux micro-organismes de diverses origines se rencontrent, mais qui est également régulièrement nettoyé et désinfecté avec différents biocides. De ce fait, il y a un contexte de possibilité de transferts génétiques horizontaux ainsi qu'une forte pression de sélection qui favorise l'apparition de germes résistants⁹.

1. Le phénomène de résistance aux antifongiques et antibactériens

La plupart des antibiotiques et antifongiques sont d'origine naturelle et produits par les micro-organismes eux-mêmes dans une optique de compétition pour s'attribuer un substrat. Ces derniers ont donc, avec l'évolution, adopté des gènes leur conférant une résistance aux antibiotiques¹⁰. Chez les bactéries ayant une reproduction asexuée, le brassage génétique se fait essentiellement par transferts horizontaux d'acide désoxyribonucléique (ADN). Ces transferts horizontaux correspondent pour une bactérie à intégrer du matériel génétique d'une autre bactérie sans en être le descendant. Ce mécanisme permet de voir une propagation des résistances et l'émergence de nouvelles souches résistantes aux antibiotiques, notamment par transfert plasmidique (80% des résistances aux antibiotiques seraient d'origine plasmidique⁹). La forte pression de sélection induite par les activités humaines amplifie encore ce phénomène. Lors d'une étude menée dans la clinique Helios en Allemagne, il a été montré qu'en 10 ans, des souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont développé 12 résistances à des antibiotiques différents avec comme résultat que seule la colistine avait encore autant d'effet sur ces souches résistantes que sur des souches non-résistantes¹¹. La sur-utilisation de ces composés à des fins non-thérapeutiques augmente encore la pression de sélection. Par exemple, aux Etats-Unis, 80% des antibiotiques vendus sont utilisés pour l'élevage comme accélérateur de croissance¹². Concernant les champignons, l'émergence des souches résistantes serait également due aux transferts horizontaux d'ADN, comme avec l'exemple de *Candida auris*¹³. La reproduction sexuée des champignons pourrait également jouer un rôle dans l'émergence de ces résistances, comme avec le cas de la résistance aux antifongiques azolés par *Aspergillus fumigatus*¹⁴.

2. Les micro-organismes responsables d'infections nosocomiales

Les bactéries multi-résistantes (BMR) sont le résultat de la multiplication d'une bactérie ayant acquis un ou plusieurs gènes de résistance à un antibiotique. A l'intérieur même des BMR, on peut distinguer des bactéries extrêmement résistantes aux antibiotiques (Extensively drug-resistant, XDR), qui résistent à tous ou presque tous les agents antibactériens approuvés. De manière encore plus restrictive, certaines souches sont décrites comme résistantes à tous les antibiotiques existants (Pandrug-resistant bacteria, PDR)¹⁵. Ce dernier cas, le plus extrême, laisse le patient infecté dans une impasse thérapeutique. Il y a 3 types de BMR qui se révèlent très menaçants ces dernières années. Le premier est le cas de *Staphylococcus aureus* résistant

à la méticilline (MRSA). L'infection par ce pathogène est même devenu plus courant dans les hôpitaux aux Etats-Unis que l'infection par des souches de *S.aureus* non résistantes¹⁶. Pour traiter ces infections, on a dû alors recourir aux glycopeptides, mais cette souche commence à développer des résistances à la vancomycine¹⁷ et à la daptomycine¹⁸. Le second est le cas des tuberculoses multirésistantes ou XDR dues à *Mycobacterium tuberculosis*. Celle-ci est responsable de l'épidémie de tuberculose qui a fait 558 000 nouveaux cas en 2017¹⁹. Cette épidémie a été classée en XDR dû à sa résistance à l'isoniazide, à la rifampicine, aux fluoroquinolones ainsi qu'à l'amikacine, la kanamycine, ou la capreomycine²⁰. Le dernier cas est celui des pathogènes dits « *Extended-Spectrum β -Lactamase* ». Ce sont des entérobactéries capables de produire des β -lactamases, des enzymes capables d'hydrolyser la liaison lactame de l'antibiotique et de le rendre ainsi inefficace²¹. Ces dernières ont même développé des carbapénémases²², des hydrolases capables de leur conférer une résistance aux carbapénèmes qui sont pourtant les β -lactamines utilisées en dernier recours dans les cas des infections les plus sévères. Plus récemment, le Centers of Diseases Control and Prevention (CDC) aux Etats-Unis a voulu mettre l'emphase sur 6 bactéries « ESKAPE » sur lesquels il est très urgent de concentrer les efforts de recherche car elles font preuve d'une très rapide adaptation aux antibiotiques. Il s'agit d'*Enterobacter faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* et *Enterobacter spp*²³.

II. Les agents antibactériens et antifongiques

1. Les antibactériens

Depuis la découverte en 1929 par Alexander Fleming de la pénicilline produite par *Penicillium*, les chimistes et les biologistes n'ont cessé de travailler à la découverte de nouvelles molécules pour traiter les infections bactériennes. Il faut distinguer l'antibiotique, qui est une substance que l'on administre par la voie générale pour vaincre une infection, et les antiseptiques, qui sont des substances que l'on applique sur la surface du corps ou de matériaux pour détruire les micro-organismes. C'est une véritable course dans la mesure où on estime qu'il faut deux à trois ans en moyenne pour qu'on identifie le premier cas de résistance à un traitement antibiotique²⁴. Néanmoins, la recherche de nouveaux antibiotiques ralentit de plus en plus ces dernières années. En effet, nous observons depuis 2005 une nette baisse du nombre de nouveaux antibiotiques sur le marché (**Figure 2**).

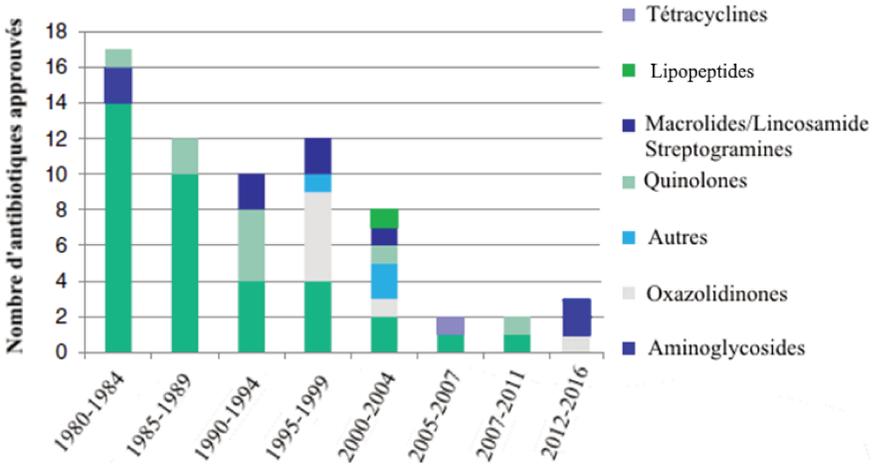


Figure 2 Graphique montrant le nombre et le type de nouveaux antibiotiques sur le marché de 1980 à 2016. Extrait de Bassetti et al²⁵.

Il existe cinq principaux modes d'action pour les molécules antibiotiques : l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, l'inhibition de la synthèse protéique, l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'inhibition du métabolisme des folates et l'interaction avec la membrane plasmique. Nous allons plus particulièrement nous intéresser à ce dernier mode d'action.

a) Les peptides

Les peptides sont des polymères d'acides aminés. Ceux ayant des propriétés antibactériennes sont composés de 12 à 50 acides aminés²⁶. Ils présentent une structure amphiphile avec un côté de la molécule renfermant une forte proportion d'acides aminés cationiques polaires (lysine, histidine etc...), et l'autre côté une forte proportion d'acides aminés plus apolaires (valine, leucine etc...), couplés à un groupement fortement apolaire comme des cycles aromatiques ou des chaînes alkyles (**Figure 3**)

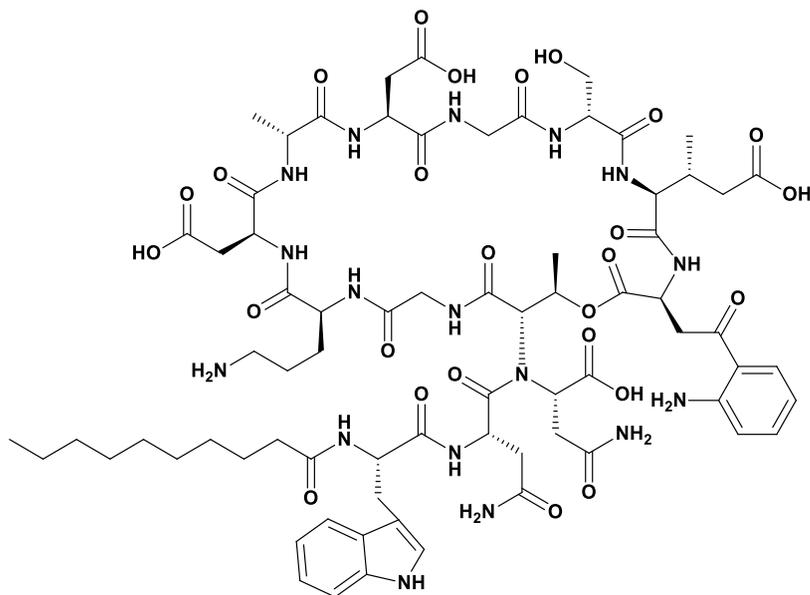


Figure 3 Structure chimique de la daptomycine

La plupart de ces peptides antibactériens sont naturels car il est encore assez difficile de concevoir de nouveaux peptides en tenant compte des propriétés physicochimiques des différents d'acides aminés composant ce peptide²⁷. Il est néanmoins possible d'obtenir de ces nouveaux peptides en utilisant des techniques de fermentation²⁸. Il faut trouver un équilibre entre des paramètres multiples et très divers comme la charge globale, la structure secondaire ou encore la taille, car chacun de ces paramètres influera sur l'activité antibactérienne de la molécule. Un changement de nature d'un seul acide aminé peut conférer au peptide des propriétés antibactériennes²⁹. La partie polaire de ces peptides est souvent cationique et ils sont en général plus actifs sur les bactéries gram-positives que gram-négatives, sans que l'on ait encore clairement établi la raison³⁰. En revanche, les peptides antibactériens présentent en général une cytotoxicité et une activité hémolytique²⁶. Ces activités sont dues au désassemblage de la membrane plasmique des érythrocytes car ces peptides ont une grande affinité avec cette dernière³¹. Un autre problème majeur est leur grande sensibilité à la dégradation par les peptidases et on cherche de ce fait de nouveaux peptides résistants à ces enzymes³². Il est communément admis que le mécanisme d'action de ce type de molécules repose sur l'interaction avec les lipopolysaccharides des bactéries gram-négatives, ou avec les acides lipotéichoïques des bactéries gram-positives. Ils interagissent ensuite avec la membrane interne phospholipidique, en s'insérant dans de manière parallèle à l'orientation de la

bicouche. Ils peuvent ainsi modifier la forme de la structure, en l'amincissant, en modifiant son potentiel électrostatique, ou en causant des perturbations très locales. Ils peuvent également traverser complètement cette membrane pour atteindre des cibles internes^{27,33}. Par exemple, elles peuvent également former un adduit avec l'ADN de la cellule pour empêcher celle-ci de se répliquer³⁴. Plus récemment, les chimistes tentent de légèrement modifier la structure des peptides pour réduire leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes tout en tentant de garder les propriétés antibactériennes. Il faut également que ces peptides aient une activité spécifique aux bactéries, si ce n'est pas le cas, ces derniers peuvent former des pores dans les cellules sanguines et ainsi avoir une activité hémolytique qui va rendre le composé toxique³⁵. On peut citer l'exemple d'un analogue de la gramicidine S³⁶, dont les propriétés hémolytiques ont été baissées de 80 à 14% en introduisant une modification d'angle sur le peptide sur une distance de 9 carbones. (**Figure 4**)

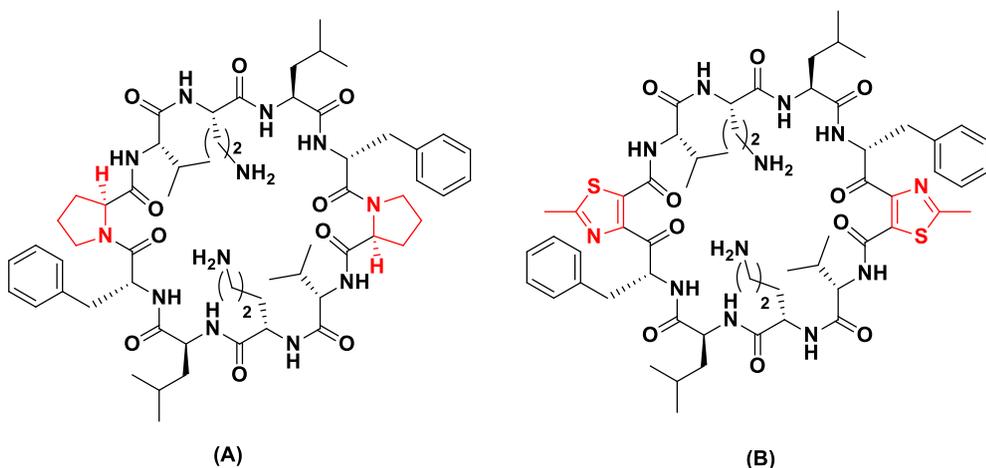


Figure 4 Structure chimique de la gramicidine S (A) et de son analogue synthétique (B), où la D-phénylalanine-proline a été remplacé par un acide γ -aminé avec un cycle thiazole.

D'autres peptides, totalement synthétiques, comme le BRBR-NH₂ (**Figure 5**), ont montré une concentration minimale inhibitrice de 50% de la croissance du micro-organisme (CMI₅₀) de 6,25 μ M pour les souches multi-résistantes de *S.aureus*, tout en montrant un très faible pouvoir d'hémolyse (<1% pour 100 μ M)³⁷.

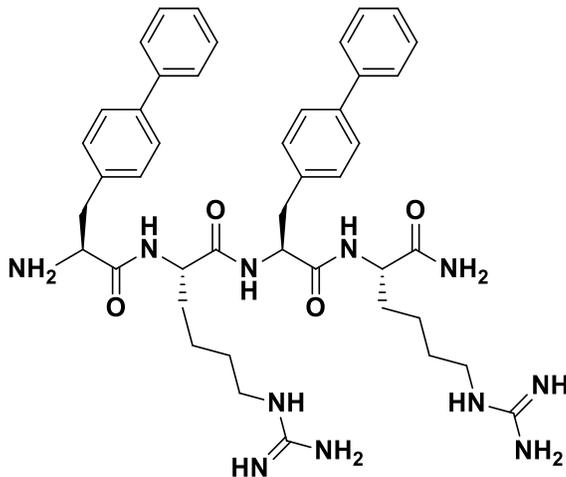


Figure 5 Structure chimique du BRBR-NH₂

b) Les céragénines

Les céragénines sont des dérivés d'acides biliaires dont la partie apolaire est constituée d'un noyau stérol et dont les têtes polaires sont polycationiques. Comme les peptides antibactériens, ces composés ont le plus souvent des activités sur les bactéries gram-positives, mais certains composés ont également une très forte affinité avec les membranes contenant une forte proportion de PE ou de lipides neutres et peuvent donc lyser les membranes de bactéries gram-négatives³⁸. Les problèmes liés à leurs activité hémolytique peuvent être résolus de plusieurs façons : en les couplant à des nanoparticules avec pour lien une fonction imine qui se rompt en milieu acide³⁹, ou en les formulant avec des copolymères pour améliorer leur sélectivité⁴⁰. Leur interaction avec la membrane interne provoque une dépolarisation de celle-ci et peut entraîner la mort de la cellule pour les composés les plus efficaces⁴¹. Les avantages de ces composés comparativement aux peptides sont qu'ils sont plus faciles à synthétiser à grande échelle et qu'ils sont résistants aux peptidases dans la mesure où ce ne sont pas des peptides.

c) Les dérivés de sucre

Dans la littérature, les aminoglycosides sont connus comme antibactériens depuis longtemps, pour leur capacité à se lier à l'acide ribonucléique (ARN) ribosomique 16S et ainsi empêcher la synthèse protéique des bactéries⁴². Récemment, la structure de ces composés, fortement polaires grâce à la présence de sucres, a été modifiée en y incorporant des chaînes alkyles ou

aromatiques apolaires. En jouant sur la nature et le nombre des unités de sucres ainsi que sur leurs groupements amino ou hydroxy, on pourrait synthétiser une très grande variété d'aminoglycosides amphiphiles.

Des études ont été menées pour tenter de synthétiser des dérivés à cytotoxicité réduite tout en conservant leurs propriétés antibactériennes^{43,44}. Ces composés sont actifs majoritairement sur les membranes des bactéries gram-positives²⁶. Néanmoins, il a été démontré *in vitro* que ces composés pouvaient avoir une affinité aussi pour le LPS aussi proche que la polymyxine B⁴⁴. Au niveau du mécanisme d'action précis sur la membrane, il semblerait que ces dérivés s'attachent aux acides lipotéichoïques de la membrane plasmique des bactéries, ce qui causerait une dépoliarisation, puis une perméabilisation de la membrane^{45,46}.

d) La reutericycline

La reutericycline est produite par *Lactobacillus reuteri*. Sa structure chimique a été totalement élucidée en 2000.⁴⁷ (**Figure 6**).

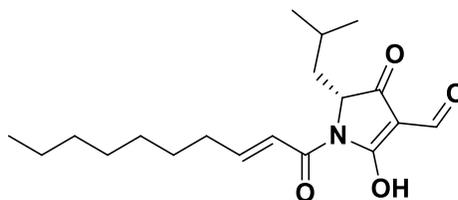


Figure 6 Structure chimique de la reutericycline

Le composé agit à la manière des acides organiques comme l'acide acétique ou l'acide sorbique : c'est un ionophore des protons H^+ et dissipe le potentiel membranaire de la bactérie. Sa grande hydrophobie lui procurant une valeur de CMI_{50} bien inférieure à celle des acides organiques qui sont très polaires et donc qui sont peu d'affin pour la membrane⁴⁸. L'activité biologique de ce composé est donnée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 Activités biologiques de la reutericycline sur divers agents microbiologiques. Extrait de Gänzle⁴⁸.

| | Organismes | MIC (µg.mL ⁻¹) |
|-----------------------------------|---|----------------------------|
| Lactobacille | 30 souches (17 espèces) | 0,09-0,14 |
| Enterococci | 4 souches d' <i>E.faecium</i> et <i>Enterobacter faecalis</i> | 0,9-2,5 |
| Staphylocoque | 7 souches de <i>S.aureus</i> | 0,06-0,16 |
| Bacille | 9 souches | 0,13-0,26 |
| Entérobactéries gram-négatives | 6 souches d' <i>E.coli</i> et de <i>Salmonella enterica</i> | >100 |
| Entérobactéries mutantes sans LPS | <i>E.coli</i> et <i>S.enterica</i> | 10-20 |
| Levure et fungi | 3 champignons filamenteux et 1 levure | >100 |

La reutéricycline présente d'excellentes activités sur les bactéries gram-positives, mais pas sur les gram-négatives. Le LPS empêche visiblement la molécule de passer et de pénétrer dans la membrane car la molécule est beaucoup plus active sur les souches ne présentant pas de LPS. Elle n'a pas d'activité significative sur les champignons filamenteux et les levures⁴⁸.

2. Les antifongiques

Ces dernières années, les progrès des protocoles médicaux ont permis d'augmenter significativement la durée de vie des patients immunodéprimés, comme les malades du cancer, les personnes atteintes du SIDA ou les personnes ayant reçu une transplantation d'organe. Concernant ces patients, les cas de mycoses ont grimpé en quelques dizaines d'années. Ainsi, il est nécessaire de développer de nouveaux traitements antifongiques⁴⁹. Les antifongiques peuvent agir de différentes manières sur le champignon. Ils peuvent être un inhibiteur de la succinate déshydrogénase, inhiber la biosynthèse des ergostérols ou agir directement sur la membrane plasmique. C'est ce dernier mode d'action que nous allons plus particulièrement étudier par la suite.

a) Les antifongiques agissant sur la membrane plasmique des champignons

Les antifongiques qui agissent sur la membrane des champignons sont tous des polyènes. Le plus représentatif d'entre eux est l'amphotéricine B (**Figure 7**). Ce dernier figure sur la liste des médicaments essentiels selon l'OMS⁵⁰.

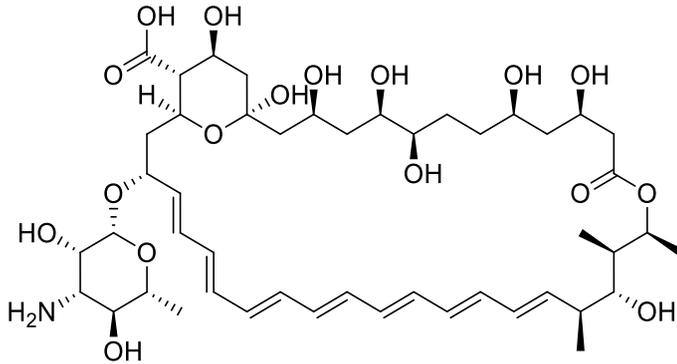


Figure 7 Structure chimique de l'amphotéricine B

Il a été isolé de *Streptomyces nodosus*. Son mécanisme d'action est que cette molécule peut se fixer aux ergostérols de la membrane plasmique des fungus, grâce aux nombreuses doubles liaisons⁵¹ présentes sur la molécule ainsi que grâce au résidu mycosamine⁵². Il forme ainsi des canaux au travers de la membrane et ainsi la perméabilise de manière que les ions puissent traverser cette membrane plasmique⁵³. Il est utilisé depuis les années 60 en tant que thérapeutique mais il souffre néanmoins de nombreux effets secondaires, notamment à cause de sa très bonne affinité avec les autres stérols, qui constituent une grande proportion des lipides des cellules eucaryotes y compris humaines. Il entraîne donc des dommages aux cellules rénales et cause des dysfonctionnements du rein à 30% des patients⁵⁴. Il est intéressant de noter que chez d'autres macrolides, comme la nystatine, la toxicité affecte les cellules en fonction des propriétés biophysiques de leurs membranes plutôt que de leurs compositions chimiques. En effet, il a été montré que la nystatine pouvait former des pores dans des membranes phospholipidiques dépourvues de stérols⁵⁵. De la même manière que toutes ces différentes structures, il est nécessaire que les molécules soient à la fois apolaires afin de pénétrer les membranes plasmiques lipidiques des micro-organismes. Elles doivent cependant être aussi solubles dans l'eau afin de pouvoir être utilisés pour des applications de désinfections. Ainsi ces molécules devront comporter une structure amphiphile comme c'est le cas des molécules tensioactives.

3. Les tensioactifs

On appelle communément un tensioactif une molécule amphiphile (ou amphipolaire) composée d'au moins deux groupements ayant des affinités opposées pour un solvant donné (ici l'eau) : un groupement hydrophile (partie polaire) et un groupement hydrophobe (partie apolaire). La partie polaire peut être cationique, anionique, ou simplement constituée d'un enchainement de plusieurs hétéroatomes. Dans la suite de la thèse, on parlera de « tête

polaire ». La partie apolaire est constituée d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, linéaires ou ramifiées, aliphatiques ou aromatiques (**Figure 8**).

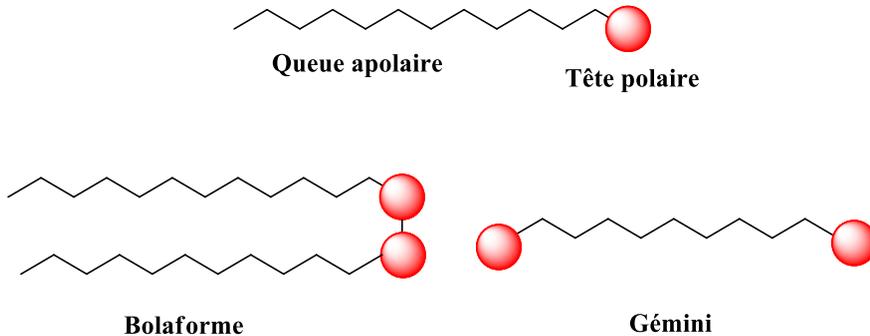


Figure 8 Structure générale des tensioactifs

Ces molécules ont la capacité de s'adsorber aux surfaces et aux interfaces entre deux phases non miscibles afin de diminuer l'énergie libre globale du système. Un tensioactif va s'adsorber à l'interface eau/air ou eau/huile, avec la tête polaire orientée vers la phase aqueuse, et la queue apolaire orientée vers l'air ou l'huile, afin de réduire le contact entre la chaîne hydrophobe et l'eau. Cela a pour effet de diminuer la tension superficielle (eau/air) ou interfaciale (eau/huile), qui représente le travail nécessaire pour augmenter l'unité de surface de l'aire interfaciale entre les deux phases. La tension de surface eau-air égale à 72,8 mN/m (à 20°C), peut alors diminuer jusqu'à des valeurs de l'ordre de 20-30 mN/m en présence de tensioactif. La diminution de tension superficielle est reliée à la concentration en tensioactif^{56,57}. A faible concentration, la tension de surface diminue au fur et à mesure de l'adsorption des tensioactifs à la l'interface, jusqu'à atteindre la saturation. À partir d'une concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), les molécules tensioactives vont s'auto-associer en micelles (de taille de l'ordre de 10 à 100 Å) ou agrégats^{58,59}, qui permettront de protéger les chaînes hydrophobes du contact de l'eau.

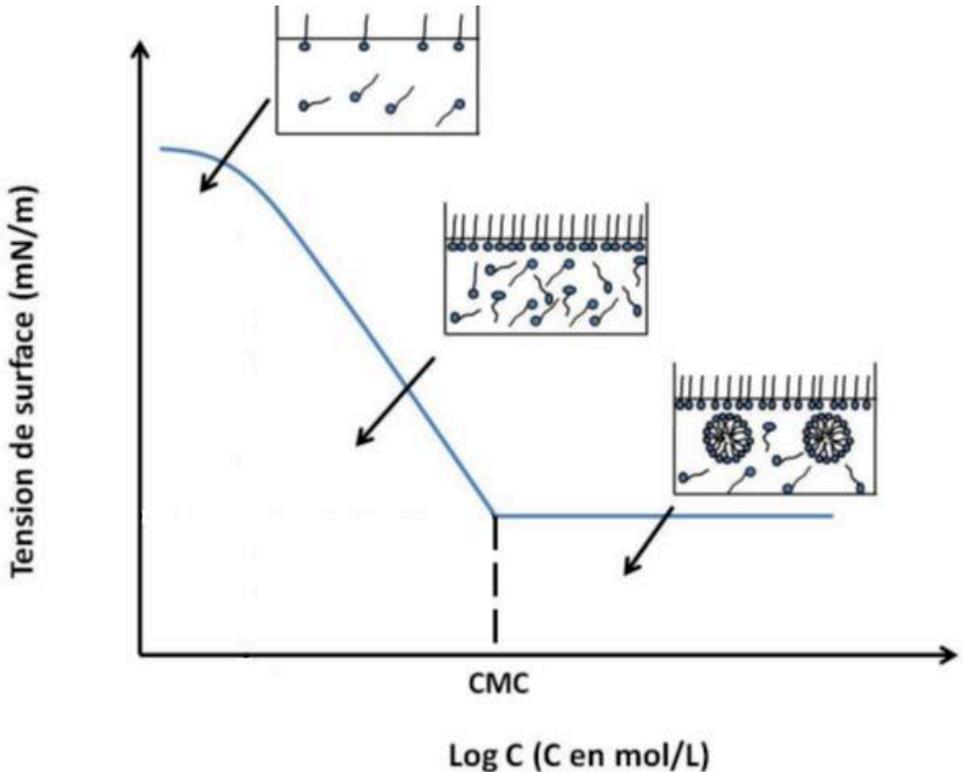


Figure 9 Organisation en solution des tensioactifs en fonction de la concentration

La CMC est étroitement liée à la nature chimique et structurale du tensioactif (**Figure 9**). En effet, sa solubilisation dans l'eau étant principalement due à la polarité de sa tête, une modification, même minime, de sa queue peut entraîner une diminution drastique de sa CMC, ainsi que de la forme de la micelle ou de l'agrégat obtenu⁵⁶. La formation des micelles (à des concentrations supérieures à la CMC) est gouvernée par l'équilibre entre les forces attractives entre chaînes hydrocarbonées, qui cherchent à minimiser le contact avec les molécules d'eau, et les forces de répulsion entre chaînes polaires (d'autant plus si elles sont chargées), qui sont en contact avec l'eau. De manière à diminuer l'énergie globale du système, les molécules de tensioactifs vont s'organiser de manière à respecter toutes ces contraintes. Les agrégats formés auront tendance à posséder une phase organique interne protégée par les têtes polaires, dans laquelle il n'y aura pas d'eau⁶⁰. La forme en 3 dimensions que prennent ces objets dépend de la structure de la molécule tensioactive. Israelachvili a développé un modèle utilisant le paramètre d'empilement p pour déterminer le type de structure supramoléculaire que vont adopter les tensioactifs selon la formule⁶¹ :

$$p = \frac{v}{a_0 l_c}$$

Où v est le volume occupé par la queue hydrophobe, l_c sa longueur maximale et a_0 la surface maximale occupée par la partie hydrophile (**Figure 10**).

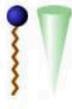
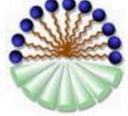
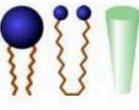
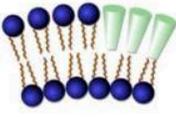
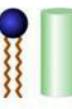
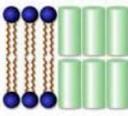
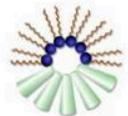
| Amphiphile | Paramètre $p = \frac{v}{a_0 l_c}$ | Forme géométrique | Organisation | Phase |
|--|--------------------------------------|---|---|---|
| Tensioactif monocaténaire à large tête polaire | $p < 1/2$ |  |  | Micelles directes |
| Tensioactif monocaténaire type non ionique | $p \approx 1/2$ |  |  | Micelles globulaires Phase hexagonale I |
| Tensioactif bolaforme, ou bicaténaire à large tête polaire | $1/2 < p < 1$ |  |  | Phase lamellaire flexible = vésicules |
| Tensioactif bicaténaire | $p \approx 1$ |  |  | Phase cubique Q _{II} Phase lamellaire |
| Tensioactif bicaténaire à tête polaire petite | $p > 1$ |  |  | Micelles inverses Phase hexagonale II |

Figure 10 Relation entre la structure et la nature du tensioactif et son organisation dans le milieu aqueux. Extrait de Rico-Lattes⁶².

Les tensioactifs peuvent être classés en fonction de :^{57,63,64}

- Leur solubilité
- Leur type de tête polaire (non-ionique, anionique, cationique ou zwitterionique, voir paragraphe ci-après)
- Leurs origines (synthétiques ou issues d'agroressources)

Le principal attrait de ces molécules est leur affinité avec les interfaces de type huile/eau ou air/eau. Elles ont des propriétés intéressantes en tant que mouillant⁶⁵, dispersant⁶⁶, anti-moussant⁶⁷, solubilisant⁶⁸, émulsifiant⁶⁹, détergent⁷⁰ et antiseptique⁷¹. C'est particulièrement sur ces deux dernières propriétés que notre étude va porter.

a) *Les tensioactifs anioniques*

Les tensioactifs anioniques sont chargés négativement après dissociation dans l'eau. Ces composés sont parmi les plus usuels car ils sont faciles à produire et sont donc relativement peu coûteux. La tête polaire anionique peut être un carboxylate, un sulfate ou un sulfonate. Les plus anciens connus sont les carboxylates. Ils sont obtenus par hydrolyse d'ester gras et sont historiquement connus pour leurs propriétés de détergence car ils entrent en grande partie dans la composition du savon. Ce sont des acides faibles, sensibles au pH de l'eau. Le tensioactif anionique le plus utilisé actuellement reste le laurylsulfate de sodium (dodécylsulfate de sodium, ou SDS, **Figure 11**) :

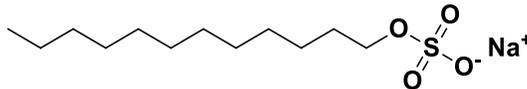


Figure 11 Structure du dodécylsulfate de sodium

Il est utilisé en pharmacie ou dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés moussantes et détergentes. Ces tensioactifs anioniques ne sont pas conçus pour être antiseptiques, ils ont même la capacité d'interagir avec les charges positives d'un composé antibactérien afin de l'inactiver, comme avec la chlorhexidine⁷². Néanmoins, il a déjà été observé que le SDS diminue fortement le nombre de cellules viables de *Listeria monocytogenes* (Gram-positif) en solution mais n'affecte pas le nombre de cellules viables d'*E.coli* (Gram-négatif)⁷³. Il semblerait que l'effet biocide serait uniquement lié à la nature du micro-organisme⁷⁴. Ce n'est donc pas ce type de tête polaire que nous allons choisir pour synthétiser nos molécules.

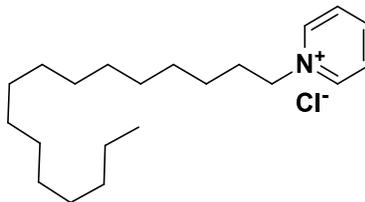
b) *Les tensioactifs cationiques*

Les tensioactifs cationiques présentent une charge positive et sont soit des sels d'amine primaire, secondaire ou tertiaire, soit des sels d'ammoniums quaternaires, ionisés après solubilisation dans l'eau, soit des amidiniums (**Figure 12**). Les dérivés d'amine primaire, secondaire et tertiaire sont stables dans l'eau uniquement à des pH acides, et sont insolubles dans des

pH supérieurs à 7. Les composés quaternaires ne sont pas affectés par ces changements de pH. Ils sont très étudiés pour leur pouvoir antiseptique⁷⁵.



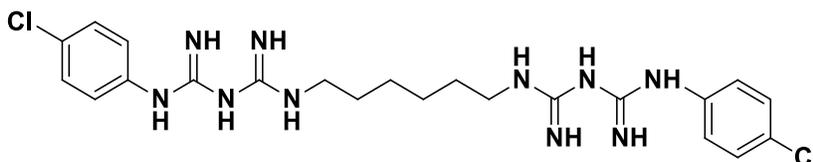
Chlorure de benzalkonium



Chlorure de cétylpyridinium



Chlorure de didécyldiméthylammonium



Chlorhexidine

Figure 12 Structure chimique des principaux tensioactifs d'ammoniums/d'amidiniums

De plus en plus, les chimistes se tournent vers des structures polycationiques avec plusieurs fonctions ammonium pour lutter contre les bactéries multi-résistantes. Par exemple, le composé PQ-11,11 (**Figure 13**), dérivé de l'herbicide paraquat, permet d'atteindre une CMI₅₀ de 2 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ pour *E.coli*, *S.aureus* et *E.faecalis*⁷⁶.

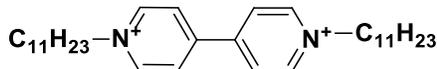


Figure 13 Structure du PQ-11,11

En augmentant encore le nombre de fonctions ammoniums quaternaires, la molécule 12(3)2(3)12 (**Figure 14**) avec une charge nette de +3 a été obtenue.

Elle possède une CMI_{50} de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ contre une souche de *S.aureus* obtenue dans un hôpital et déjà résistante aux ammoniums quaternaires⁷⁷.

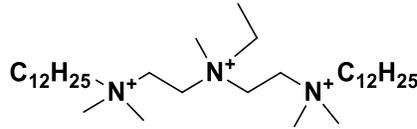


Figure 14 Structure du 12(3)2(3)12

Il semblerait que le mécanisme par lesquels ils détruisent les bactéries soit le même que celui des peptides antibactériens : la perméabilisation de la membrane interne phospholipidique⁷⁸. Ainsi, nous avons jugé que cette tête polaire était très intéressante pour la lyse cellulaire.

c) *Les tensioactifs zwitterioniques*

Les composés zwitterioniques (**Figure 15**) comportent à la fois une charge positive et une charge négative en solution, et sont stables à la fois en pH acide et alcalin. Ils possèdent des capacités antibactériennes à faible concentration^{79,80}. Par exemple la sulfobétaïne P16S3 a une CMI_{50} entre 10 et 50 $\mu\text{g/mL}$ sur 5 souches différentes de bactéries et une levure⁸¹. Ce type de tensioactif a été envisagé car ces composés possèdent des activités intéressantes. Néanmoins cela ne semble pas être la tête polaire la plus intéressante comparativement aux tensioactifs cationiques dans le cadre de la lyse cellulaire. En effet, la littérature est peu abondante sur les propriétés biocides et détergentes de ces composés.

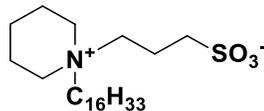


Figure 15 Structure du P16S3

d) *Les tensioactifs non-ioniques*

Ces molécules n'ont pas de charge nette mais sont fortement polaires grâce à une succession de groupements constitués d'hétéroatomes (ester, éther, alcool, amide etc..). Ils sont particulièrement connus pour leurs propriétés détergentes, notamment le Triton X-100. Ce dernier entre dans la formulation de nombreux produits de nettoyage⁸² et il a la capacité de perméabiliser les membranes des cellules eucaryotes, ce qui lui donne de nombreuses applications en biologie⁸³ (**Figure 16**). Cette tête polaire est donc intéressante car les propriétés détergentes de ce type de molécules peuvent être utiles pour la lyse des micro-organismes.

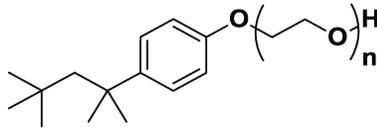


Figure 16 Structure du Triton X-100

III. Les cibles biologiques

1. L'enveloppe bactérienne.

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires ubiquitaires procaryotes. Elles représentent la forme de vie la plus ancienne sur Terre et seraient apparues il y a 3,2 milliards d'années⁸⁴. Parmi toutes les espèces connues, deux types de morphologies prédominent. Les bactéries de forme ronde sont appelées des coques, et les bactéries en forme de bâtonnets sont appelées les bacilles. Une autre manière de classer les bactéries consiste à les distinguer en fonction de la composition de leur paroi par la coloration de Gram. Ainsi on désigne les bactéries comme gram-négatives ou gram-positives.

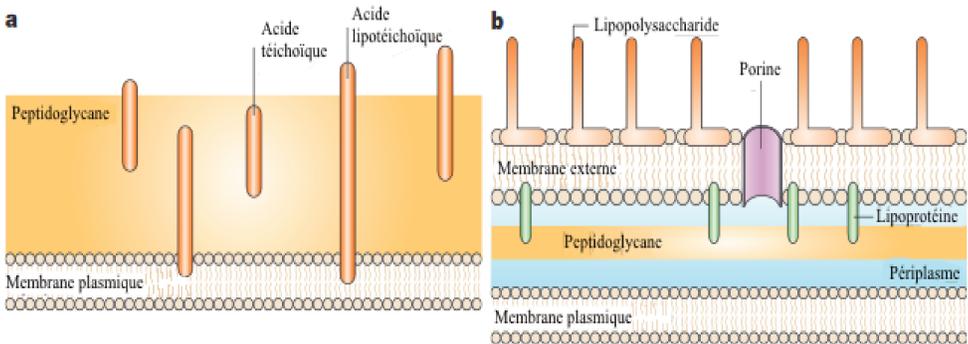


Figure 17 Schéma de la paroi d'une bactérie. **a** correspond aux bactéries gram-positives. **b** correspond aux bactéries gram-négatives. Extrait de Cabeen et al⁸⁵.

Les bactéries gram-positives possèdent une paroi composée d'une épaisse couche de peptidoglycane (20-80 nm, **Figure 17**) dans laquelle sont inclus des fragments d'acides téichoïques et d'acides lipotéichoïques. Le peptidoglycane est un polymère d'acides aminés et de sucres plutôt hydrophile, qui forme une macrostructure qui dessine la paroi de la bactérie. Cette paroi permet donc à la bactérie de résister aux tensions mécaniques (notamment la pression osmotique), mais elle est cependant poreuse et donc perméable aux différentes molécules que peut comporter le milieu. Les

acides téichoïques et lipotéichoïques enchâssent la structure de la paroi jusqu'à la membrane plasmique, ces derniers permettent l'adhésion de la bactérie aux surfaces et la formation du biofilm⁸⁶⁻⁸⁸ et sont immunogènes⁸⁹. Les bactéries gram-négatives possèdent, quant à elles, une couche de peptidoglycane beaucoup plus mince (de l'ordre de 5 nm, **Figure 17**), une membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS) et des lipoprotéines incluses dans cette couche externe permettent de maintenir la structure de la bactérie⁹⁰. La couche lipopolysaccharidique est composée d'un antigène O, hydrophile, d'un domaine core oligosaccharidique et d'un lipide A, hydrophobe, directement exposé au milieu externe. Il permet ainsi à la bactérie de se prémunir contre les agressions chimiques, notamment liées aux interactions entre le lipide A et les molécules antibiotiques⁹¹. La membrane externe de ces bactéries est traversée par des porines qui permettent la diffusion passive de petites molécules hydrophiles⁹². Les deux types de bactéries possèdent un espace périplasmique (extrêmement fin chez les bactéries gram-positives, non représenté sur le schéma, **Figure 17**) dans lequel de nombreux phénomènes biochimiques peuvent avoir lieu, comme la détoxification par la bactérie des antibactériens comme décrit chez *Escherichia coli*⁹³. Les bactéries, bien qu'ayant été utilisées par l'Homme pour de nombreuses applications telles que les processus de fermentation, peuvent causer des maladies. Certaines souches de bactéries sont dites pathogènes car elles peuvent pénétrer l'intérieur des cellules des espèces animales et provoquer des infections. Par divers mécanismes, elles peuvent même infecter les tissus internes les plus éloignés du milieu extérieur, réputés stériles⁹⁴. La membrane plasmique de ces bactéries est composée de phospholipides, dans des proportions et des natures très variées selon le genre et l'espèce^{95,96}.

2. L'enveloppe fongique

Les champignons (ou fungi) sont des eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires à mi-chemin entre les végétaux et les animaux. Ils sont apparus sur Terre entre -900 et -1000 millions d'années avant notre ère⁹⁷. Ils ne possèdent pas de chlorophylle, ils sont donc hétérotrophes. Les champignons filamenteux sont pluricellulaires et peuvent synthétiser des métabolites secondaires complexes qui peuvent être des mycotoxines⁹⁸. Les levures en revanche sont unicellulaires et ne produisent pas d'hyphes à leur état morphologique standard. La paroi des champignons est constituée de β (1-3) glucane et de chitine formant une structure en forme de panier et lui permet de résister à la pression hydrostatique interne (**Figure 18**)⁹⁹.

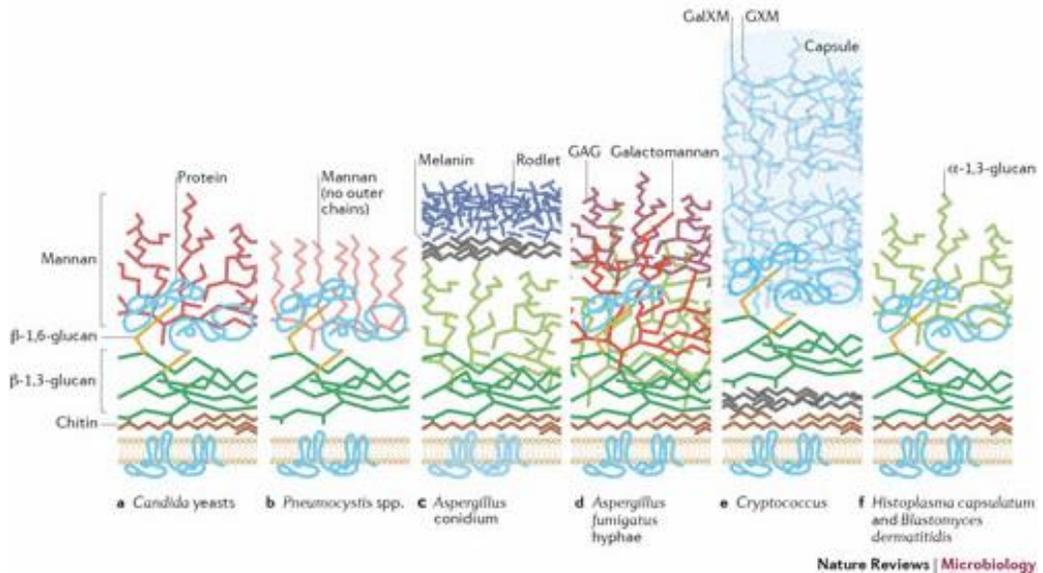


Figure 18 Schéma de l'organisation structurale de la paroi cellulaire de champignons pathogènes.²²

Ce polysaccharide est lui-même lié à d'autres polysaccharides ou protéines en fonction de l'espèce étudiée. La paroi est quant à elle extrêmement variable en fonction de l'espèce étudiée. Par exemple, pour la levure pathogène *Candida albicans*, la paroi est composée de $\beta(1-3)$ glucane et de $\beta(1-6)$ glucane liés à de la chitine et à des mannoprotéines¹⁰⁰. La membrane plasmique de ces champignons est composée majoritairement d'ergostérols, de sphingolipides ainsi que de glycérophospholipides. Les proportions de ces différents types de lipides changent aussi en fonction de l'espèce, mais c'est l'ergostérol qui permet aux champignons de conserver une fluidité membranaire¹⁰¹. De même que les bactéries, les champignons peuvent être cultivés par l'Homme pour de nombreuses applications, comme la production de biomolécules, mais ils peuvent aussi engendrer des pathologies. Les champignons peuvent poser des problèmes respiratoires ainsi que des infections, notamment chez les personnes immunodéprimées¹⁰². Nous allons ensuite voir de manière plus précise comment est organisée les membranes plasmiques des micro-organismes.

3. Composition des membranes plasmiques et modèles biomimétiques

Les membranes plasmiques constituent une barrière séparant l'intérieur des cellules de leur environnement. Elles sont sélectives aux ions et protéines et sont le siège de nombreuses réactions enzymatiques et participe aux cascades de signalisation cellulaire¹⁰³. Les membranes plasmiques sont des entités très

complexes composées d'une centaine de molécules de lipides dans lesquels sont enchassées des protéines transmembranaires comme des canaux ioniques^{104,105}, des récepteurs transmembranaires^{106,107} ou encore des antigènes^{108,109}. La partie lipidique des membranes plasmiques a longtemps été considérée comme jouant uniquement un rôle structurel. Depuis plusieurs années, il existe de plus en plus d'évidences que ces lipides jouent également un rôle fonctionnel en adoptant une organisation particulière et dynamique autour des protéines. Il existe trois grandes classes de lipides dans les membranes plasmiques : les phospholipides, les stérols et les sphingolipides. Les deux dernières classes peuvent former des nano ou microdomaines de structure plus rigide jouant un rôle de plateforme clef dans les processus de signalisation cellulaire¹¹⁰ (**Figure 19**). Dans le cas des bactéries, les lipides majoritaires sont des phospholipides : le phosphatidyléthanolamine ainsi que le phosphatidylglycerol¹¹¹. Dans le cas des champignons, les lipides majoritaires sont des stérols comme l'ergostérol⁹⁶ :

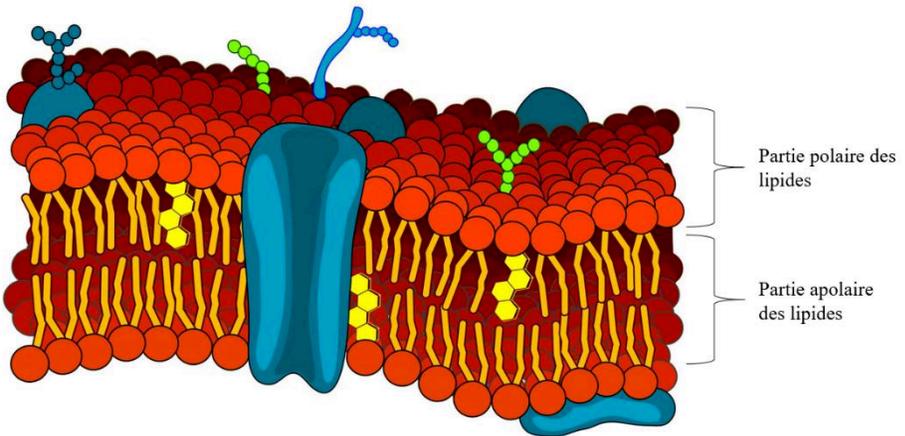


Figure 19 Schéma de la membrane plasmique d'une cellule

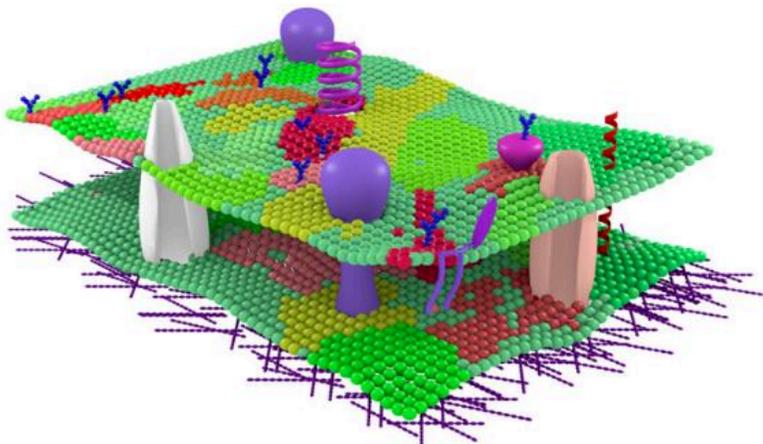


Figure 20 Schéma en trois dimensions de la membrane plasmique. Les différents domaines lipidiques sont visibles avec les changements de couleurs. Extrait de Segin *et al*¹¹².

Vu la complexité des membranes plasmiques, il est nécessaire de simplifier le système si on veut étudier les aspects moléculaires de leur interaction avec une molécule bioactive (**Figure 20**).

Les liposomes sont les modèles les plus représentatifs des membranes cellulaires. Néanmoins, ils présentent des limitations. Jusqu'à présent ce sont principalement des modèles symétriques c'est à dire avec les feuillet externe et interne de composition similaire alors que les cellules vivantes possèdent quant à elles des membranes plasmiques de composition asymétriques entre les feuillet interne et externe. Cette asymétrie joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires, comme par exemple le phénomène de résistance aux antibiotiques des bactéries gram-négatives où des transports actifs de molécules antibactériennes à l'extérieur de la membrane ne peut se faire qu'en présence d'une membrane asymétrique¹¹³.

Dans le cadre de cette thèse nous allons nous intéresser plus particulièrement à la perméabilisation de modèles biomimétiques et à la spécificité des interactions entre les molécules testées et les lipides membranaires bactériens.

4. Micro-organismes testés dans le cadre de la thèse

a) Les bactéries

En s'appuyant sur les données de la **Figure 1**, on peut voir qu'en s'intéressant à 3 bactéries (*E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*), nous totalisons déjà 43% des cas d'infections nosocomiales. L'équipement pour manipuler les micro-organismes au sein du laboratoire étant classé L1, nous avons choisi des souches de classe 1. Nous avons donc sélectionné pour cette thèse une souche non-pathogène d'*E.coli* ainsi que *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*. Le choix s'est porté sur ces trois bactéries comme modèles car elles représentent une grande variabilité en termes de morphologie.

Escherichia coli est un bacille de type gram-négatif. Elle est anaérobie facultative, catalase-positif et oxydase-négative¹¹⁴. C'est la bactérie la plus étudiée par les microbiologistes. Elle compose environ 80% de la flore intestinale des êtres humains et est la plupart du temps non pathogène. Les souches pathogènes entraînent des gastro-entérites, méningites, septicémies et infections urinaires. Il y a ces dernières années une recrudescence de cas de diarrhées dans les pays en développement causé par des souches pathogènes d'*E.coli*¹¹⁵. Chez l'humain, les infections par *E.coli* se font le plus généralement par la voie gastro-intestinale. Les cas d'infections du tractus urinaires sont dus à *E.coli* dans 90% des cas¹¹⁶. *E.coli* n'est par ailleurs pas épargnée par le phénomène de la résistance aux antibiotiques. La souche ST131, résistante aux β -lactamines et aux carbapénèmes, inquiète la communauté des chercheurs car elle possède des propriétés hyperendémiques¹¹⁷. Elle est également comparable à *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière est la 4^{ème} bactérie la plus fréquemment rencontrée lors des infections nosocomiales (**Figure 1**). *P.aeruginosa* est déjà une bactérie assez résistante par sa physiologie grâce à la relative imperméabilité donnée par sa membrane externe¹¹⁸ ainsi que son système de pompes à efflux très efficace¹¹⁹. Elle continue néanmoins de développer de nouvelles résistances aux antibiotiques : il a été montré qu'en présence d'une pression de sélection causée par les antibiotiques, on voyait l'apparition assez rapide d'une résistance à la tétracycline¹²⁰. Des cas d'infection urinaires par des *P.aeruginosa* résistant aux carbapénèmes ont également été rapportés¹²¹. Sa membrane plasmique est majoritairement composée de phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG) et de cardiolipine (CL)¹²².

Micrococcus luteus est une bactérie saprotrophe de morphologie coque de type gram-positif. Les cellules sont généralement disposées sous formes de grappes irrégulières. *M. luteus* est oxydase positif et aérobie stricte¹²³. *Micrococcus* est un genre de bactérie présent dans les poussières, le sol, l'eau et l'air. Ces bactéries font partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. Elles colonisent les muqueuses, la bouche et les voies

respiratoires humaines. *M.luteus* est considéré comme un pathogène opportuniste. Nous nous sommes intéressés à cette bactérie en particulier car *M.luteus* se révèle proche de *Staphylococcus aureus* en termes de morphologie et du point de vue phylogénétique. Comme indiqué dans la **Figure 1**, *S.aureus* est responsable à lui-seul de 13,83% des infections nosocomiales. De plus, on commence à voir l'émergence de souches multi-résistantes, par exemple à la méticilline¹²⁴. Ces dernières développent également une résistance supplémentaire à la vancomycine¹²⁵. Sa membrane plasmique est majoritairement composée de dimannosyldiacylglycérol (DMDG), PG et CL¹²².

Bacillus subtilis est une bactérie de la famille des Bacillaceae de morphologie bacille et de type gram-positif. Elle est catalase-positif et assure sa mobilité avec un flagelle. Elle est non pathogène mais est néanmoins un bon modèle pour mimer *Bacillus anthracis*, bactérie responsable de la maladie du charbon, *Bacillus cereus*, responsable d'intoxications alimentaires. Cette bactérie est intéressante également car le genre *Bacillus* possède un moyen de résister aux antibiotiques via l'utilisation de protéines ribosomales de protection qui peuvent les rendre résistant à la streptogramine A ou à la lincomycine¹²⁶. Sa membrane plasmique est majoritairement composée de PG, PE et CL³⁸.

b) Les levures

Une grande proportion des infections nosocomiales par les champignons est due à *Candida albicans*, notamment par les voies urinaires¹²⁷. Cette espèce connaît également le phénomène de résistance aux antifongiques. Le cas de la résistance à la 5-fluorocystéine a été décrit¹²⁸. Ainsi, nous nous sommes intéressés à trois levures du genre *Candida*.

Candida kefyr est une levure isolée de produits laitiers et se reproduit par bourgeonnement multilatéral. Elle se révèle être un pathogène opportuniste et peut provoquer des infections pulmonaires, des lésions superficielles de la peau et des septicémies. Cette levure peut infecter des patients atteints de pathologies sanguines¹²⁹ ou de leucémie¹³⁰.

Candida krusei est une levure retrouvée dans des aliments comme la viande, les fruits, les produits laitiers, le vin, la bière. C'est un agent pathogène opportuniste des infections cutanéomuqueuses et unguéales, et entraîne des diarrhées, ainsi que des septicémies chez les patients immunodéprimés. Elle peut également causer l'arthrite fongique¹³¹, mais cause plus fréquemment des endocardites ou des candidoses rénales¹³².

Candida tropicalis est une levure qui peut être trouvée dans le sol, dans l'eau ou dans les végétaux. C'est également un pathogène opportuniste qui provoque chez l'homme des onychies, des infections superficielles cutané-

muqueuses mais peut aller jusqu'à des infections profondes : pulmonaires, urinaires et des septicémies. *C. tropicalis* a tendance à infecter les patients atteints de cancer ou qui ont des traitements avec des antibiotiques à large spectre¹³³.

c) Les champignons filamenteux

Les infections par les champignons filamenteux ne sont pas fréquentes dans les infections nosocomiales car ce sont des pathogènes opportunistes qui n'affectent que les patients atteints de pathologie graves, qui, avant même l'infection, ont la plus faible immunité ainsi que le plus haut taux de mortalité¹³⁴. Ainsi, nous nous sommes intéressés à trois champignons filamenteux différents.

Alternaria alternata est un champignon filamenteux isolé le plus souvent d'échantillons de plantes, de terre ou de nourriture. C'est également un phytopathogène et un allergène. Il affecte le plus souvent l'appareil respiratoire¹³⁵. On recense des cas d'infections après une transplantation^{136,137}.

Cladosporium cladosporioides est un champignon pigmenté filamenteux extrêmement commun. C'est également un phytopathogène et un allergène. Il est connu pour infecter les poumons¹³⁸ et la peau¹³⁹.

Fusarium solani est un champignon filamenteux ubiquitaire que l'on retrouve habituellement dans le sol. C'est un phytopathogène pouvant causer plusieurs maladies sur le blé¹⁴⁰. Il peut causer des pneumonies, des sinusites et des endophtalmies¹⁴¹.

IV. Les azobenzènes

Ces dernières années, plusieurs groupes ont synthétisé des tensioactifs en choisissant des azobenzènes comme groupement apolaire^{4,5}. Nous allons voir par la suite quel peut être l'intérêt de choisir cette fonction chimique particulière et comment la synthétiser.

1. Propriétés

Un azobenzène a été pour la première fois synthétisé en 1856¹⁴². Ce groupement correspond à deux groupements phényles liés par une double liaison N=N. Cette double liaison entre les deux atomes d'azote est nativement sous forme *trans* mais elle peut néanmoins être isomérisée sous forme *cis* avec une irradiation lumineuse comprise entre 300 et 380 nm, en quelques picosecondes. L'isomérisation de *cis* vers *trans* peut, elle, se faire avec une irradiation entre 400 et 450 nm, ou 254 nm (**Figure 21**). C'est le phénomène de photoisomérisation. Celui-ci peut aussi être effectué via un chauffage thermique mais sera beaucoup plus long, de quelques millisecondes à plusieurs jours¹⁴³.

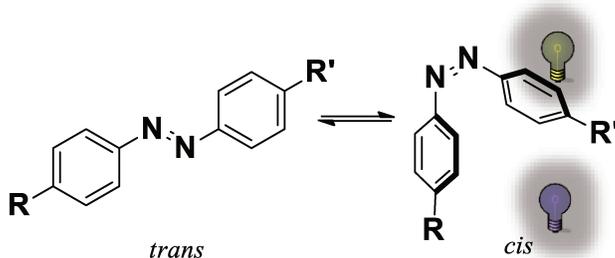


Figure 21 Photoisomérisation de l'azobenzène

Cette isomérisation implique un véritable changement structurel dans la molécule. Le *trans*-azobenzène présente des cycles aromatiques légèrement inclinés de $17,5^\circ$ par rapport au plan C-N=N¹⁴⁴, et un moment dipolaire de $0,5\text{ D}^{145}$. En revanche, pour l'isomère *cis*, la distance entre les deux carbones les plus éloignés n'est plus que de $5,5\text{ \AA}$, les deux groupements phényles forment alors un angle de 56° avec le plan C-N=N et la molécule présente un moment dipolaire de $3,1\text{ D}$. (**Figure 22**). Le comportement en solution aqueuse de ces 2 composés sera très différent. Ainsi, un composé *trans* aura plus de facilité à former des structures comme des agrégats ou des micelles dans l'eau (en raison de son caractère plan), mais il sera moins soluble que le même composé sous forme *cis* (grâce au moment dipolaire différent plus important de ce dernier).

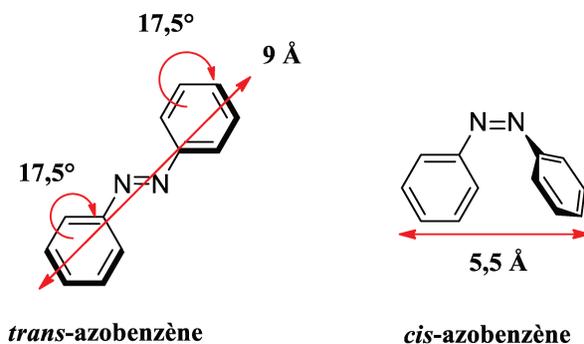


Figure 22 Représentation des distances dans le *trans*-azobenzène et le *cis*-azobenzène

Ce mécanisme d'isomérisation des azobenzènes reste encore controversé de nos jours. Il y a quatre mécanismes différents qui ont été proposés en fonction des différentes substitutions sur les groupements aromatiques :

rotation, inversion, inversion concertée et rotation assistée par une inversion¹⁴⁶⁻¹⁵⁰. Lors d'une rotation, la rupture de la liaison π de la double liaison N=N va entraîner la libre rotation d'un cycle aromatique autour de la liaison N-N, provoquant la modification de l'angle dièdre C-N-N-C (l'angle N-N-C reste aux alentours de 120°). Pour le mécanisme d'inversion, un seul groupement phényle se déplace jusqu'à un angle N=N-C de 180° , un atome d'azote adopte donc une liaison sp linéaire tandis que la liaison π reste inchangée, comme l'angle dièdre C-N=N-C. Il résulte de cela une inversion dans le plan de la molécule d'un des phényles en passant par un état de transition semi-linéaire. Le mécanisme d'inversion concertée implique un état de transition linéaire, ceci est dû au fait que l'angle N=N-C doit rester de 180° durant le déplacement des deux groupements phényles. Enfin, le mécanisme de rotation assistée par une inversion va impliquer simultanément la rupture de la liaison π de la liaison N=N, une faible modification des angles N=N-C mais une forte modification de l'angle dièdre C-N=N-C. Cet état de transition particulier ne présente aucun moment dipolaire. (**Figure 23**).

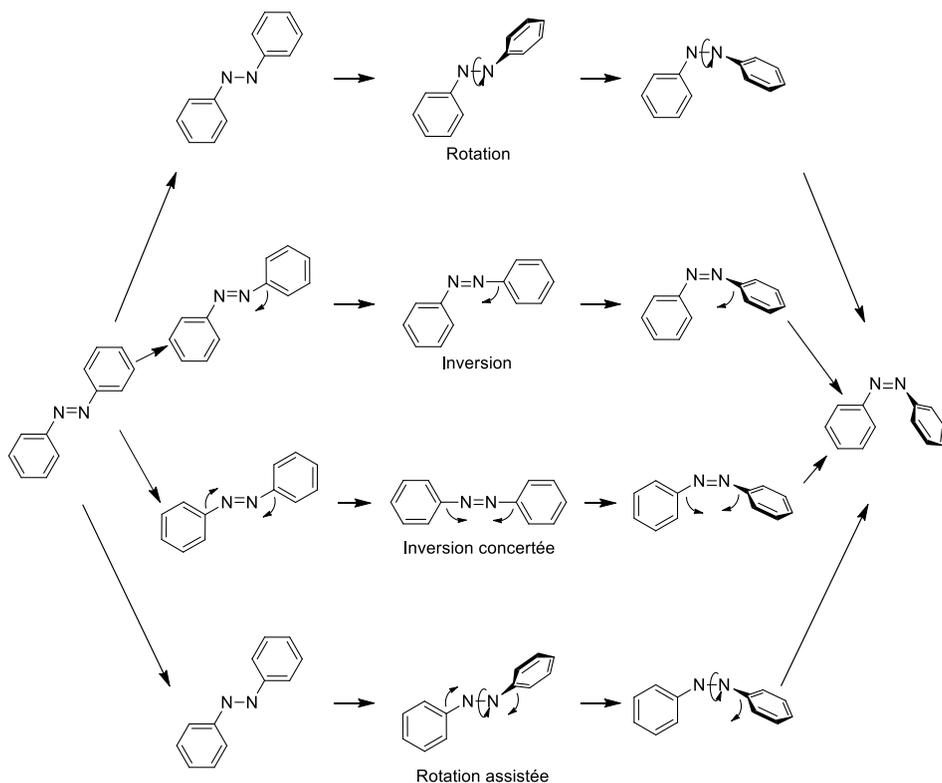


Figure 23 Mécanismes proposés dans la littérature pour l'isomérisation cis/trans des azobenzènes.

2. Synthèse

Malgré le fait que les azobenzènes soient étudiés depuis près de 150 ans¹⁴², il n'existe en réalité que trois stratégies de synthèse pour les obtenir : la création d'une double liaison N=N à partir de synthons indépendants, la modification d'une liaison N-N préexistante, ou un réarrangement^{143,145,151}.

a) Création de la liaison N=N à partir de synthons

L'oxydation des amines aromatiques primaires est l'une des nombreuses routes possibles afin d'obtenir une grande variété d'azobenzènes symétriques. De nombreux agents oxydants sont possibles, les plus communs restent les agents à base de manganèse KMnO_4 ^{152,153} (**Figure 24**, en présence de sulfate de fer ou de cuivre) et MnO_2 ^{154,155}. Il est également possible d'utiliser l'acide métachloroperbenzoïque (*m*-CPBA)¹⁵⁶.

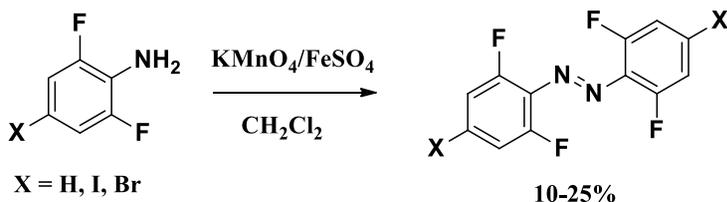


Figure 24 Exemple de dimérisation oxydante¹⁵³

D'autres oxydes métalliques peuvent aussi être utilisés pour faire cette transformation. Les métaux possibles sont l'argent^{143,157-159}, le plomb^{160,161}, le mercure^{162,163} ou le cérium¹⁶⁴. Néanmoins, ces réactions reposant toutes sur un mécanisme radicalaire, les rendements sont très dépendants du nombre et de la nature des substituants. Ainsi, on observe un nombre conséquent de produits secondaires ; ces réactions ne sont donc presque plus utilisées de nos jours. A l'inverse, il est possible de procéder à la réduction de nitrobenzène pour obtenir des azobenzènes symétriques. De nombreuses méthodes ont été mises au point en utilisant des hydrures métalliques tels LiAlH_4 ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ et NaBH_4 ^{168,169}. Ces exemples utilisent des quantités conséquentes de réducteurs (en excès ou en quantité stoechiométriques). Il est néanmoins possible d'utiliser des réducteurs plus doux comme le glucose^{170,171}, un mélange magnésium/acide formique¹⁷² ou encore simplement de la soude¹⁷³ (**Figure 25**).

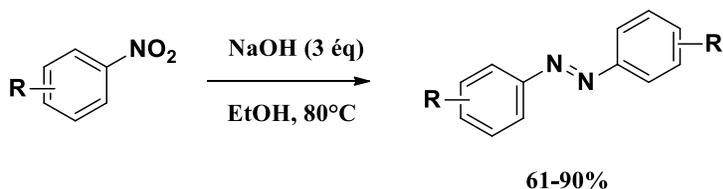


Figure 25 Réduction de dérivés de nitrobenzènes pour l'obtention d'azobenzènes symétriques¹⁷³

Il est aussi possible de passer par de la catalyse métallique afin d'effectuer ce type de réaction. Il existe divers exemples utilisant le palladium¹⁷⁴, l'or¹⁷⁵, le ruthénium¹⁷⁶ ou le platine¹⁷⁷. Dans ce dernier exemple, avec la présence de seulement de 5 μmol de nanofils de platine, les auteurs observent une conversion de plus de 90% de l'aniline sans observer de produits secondaires en fin de réaction. Selon leur mécanisme réactionnel, l'azoxybenzène formé *in-situ* peut toujours être encore réduit en azobenzène via ce même procédé (**Figure 26**).

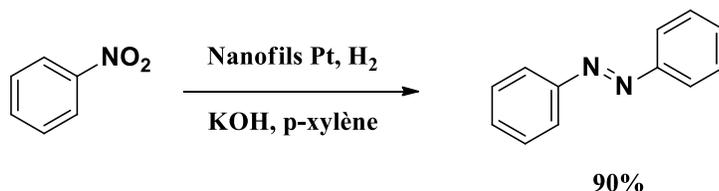


Figure 26 Réduction de dérivés de nitrobenzènes par des nanofils de platine¹⁷⁷

Si l'on cherche à obtenir des azobenzènes dissymétriques, il est beaucoup plus aisé de passer par un intermédiaire sel de diazonium. Pour cela il faut former ce sel de diazonium *in situ* en utilisant une amine aromatique ainsi que de l'acide nitreux, formé lui aussi *in situ* en utilisant du nitrite de sodium et un acide fort. On fait ensuite réagir ce sel avec un dérivé phénolique ou aminé. Il faut faire très attention au pH lors de la seconde étape de cette réaction : afin de maximiser le contact entre le sel de diazonium et le dérivé phénolique, il faut impérativement que le pH soit légèrement alcalin. Dans le cadre d'un dérivé aminé, il faudra au contraire que le pH soit légèrement acide¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ (**Figure 27**).

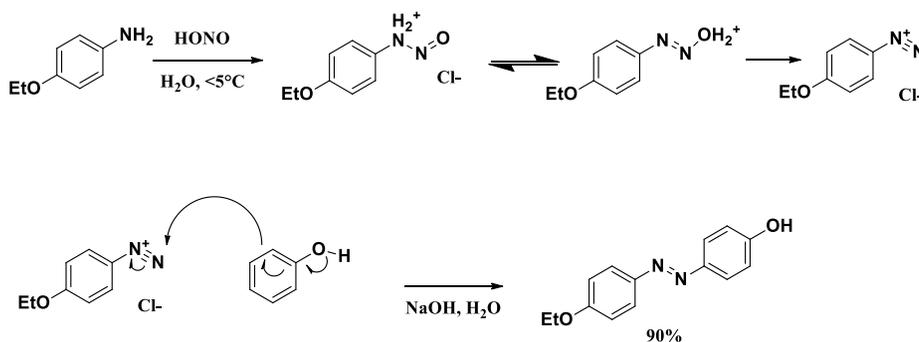


Figure 27 Mécanisme du couplage diazoïque pour l'obtention d'azobenzènes dissymétriques¹⁸¹

Un autre exemple intéressant dans la littérature est la synthèse d'acide nitreux en présence d'acide ou de bases supportées, par exemple, la Montmorillonite K-10 (argile acide) contenant des ions métalliques Cu^{2+} , Fe^{3+} et Zn^{2+} . L'intérêt ici est que le nitrite de sodium associé à ces ions va permettre la synthèse du sel de diazonium¹⁸². Autre exemple avec l'utilisation de l'Amberlyst (polystyrène fonctionnalisé par des acides sulfoniques) contenant des macropores, cet Amberlyst pourra même supporter le sel de diazonium plutôt que de le former en solution¹⁸³. Plus récemment, une grande innovation a été apportée sur la stabilité des sels de diazonium, très réactifs, en formant des catalyseurs acides magnétiques. Ces

sels de diazonium sont stables 12-24 mois selon le type de catalyseur. De plus, ces synthèses se font sans solvants, en revanche, elles sont jusqu'ici limitées aux couplages avec le naphтол (**Figure 28**)^{184,185}.

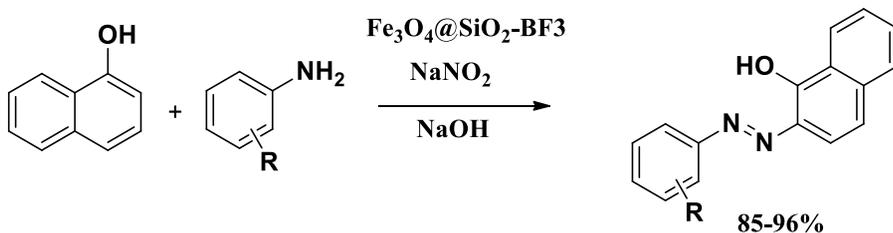


Figure 28 Couplage diazoïque utilisant des nanoparticules de fer magnétiques¹⁸⁵

Pour réaliser un couplage entre deux amines aromatiques afin d'obtenir un azobenzène dissymétrique, un autre choix possible est d'utiliser la réaction de Mills. La réaction consiste en l'oxydation d'une amine aromatique en dérivé de type nitroso. Le groupement azoté de la seconde amine aromatique pourra attaquer l'atome d'azote du dérivé nitroso, pauvre en électrons. Ainsi la liaison N-N sera formée. Une simple déshydratation mènera au dérivé azobenzénique. Cette réaction se fait en général en présence d'acide acétique (**Figure 29**)^{181,186}.

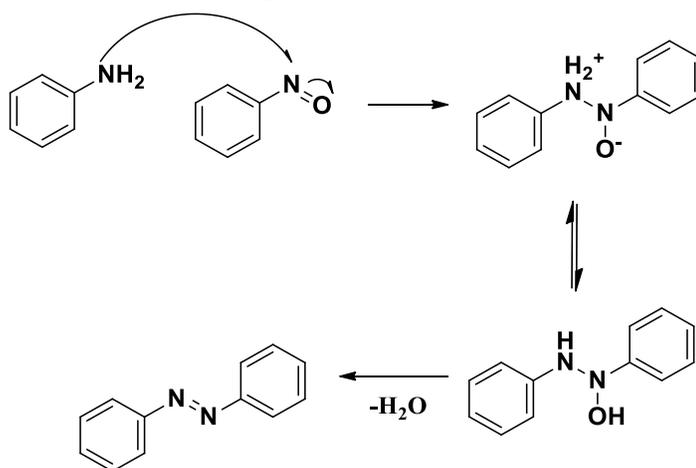


Figure 29 Mécanisme réactionnel de l'oxydation de Mills¹⁸¹

De manière classique, l'oxydant utilisé pour le passage d'une amine aromatique à un dérivé nitroso est l'Oxone®¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ (composé de sels stables $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$). Il existe assez peu d'autres exemples utilisant un oxydant différent. Il y a quelques exemples avec acide peracétique¹⁹¹ ou le *m*-CPBA^{192,193}. Néanmoins, les composés nitroso peuvent aussi être obtenus par réductions de composés nitroaromatiques. Cette synthèse est *one-pot*, en

utilisant du Zn(0) pour effectuer la réduction du groupement nitro, puis une oxydation soit par FeCl_2 ¹⁹⁴ soit par t-BuOCl ¹⁹⁵. D'une tout autre manière, il est possible de faire réagir une hydrazine avec une quinone de manière à créer la fonction azobenzène. Il est ainsi possible de fonctionnaliser des calix[4]arènes en utilisant du 2,4-dinitrophénylazo en milieu acide¹⁹⁶ (Figure 30).

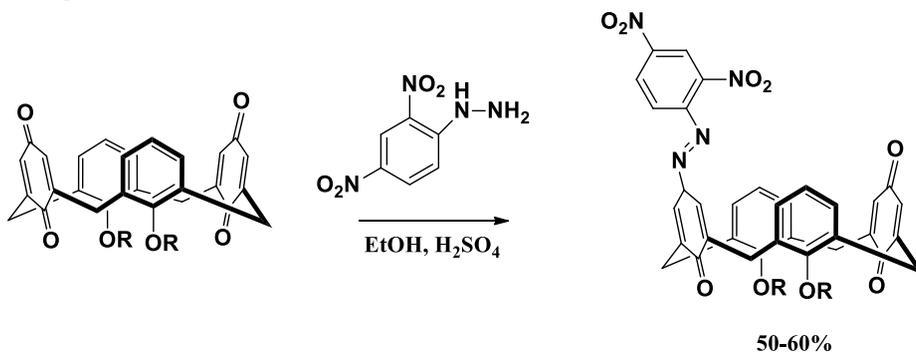


Figure 30 Fonctionnalisation d'un calix[4]arène par un azobenzène¹⁹⁶

b) Modification d'une liaison N-N

Pour l'obtention d'azobenzène symétrique, une méthode de choix est de travailler à partir de dérivés de l'hydrazobenzène, puis d'oxyder le substrat. Il est possible d'utiliser du MnO_2 ^{197,198}, TiCl_3/HBr ¹⁹⁹, voir même du $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ²⁰⁰, le tout en présence de dioxygène ou de peroxyde d'hydrogène. Pour l'obtention d'azobenzènes dissymétriques, il est possible de travailler avec du *N*-bromosuccinimide (NBS), associé à des liquides ioniques²⁰¹ ou à de la pyridine^{202,203} (Figure 31).

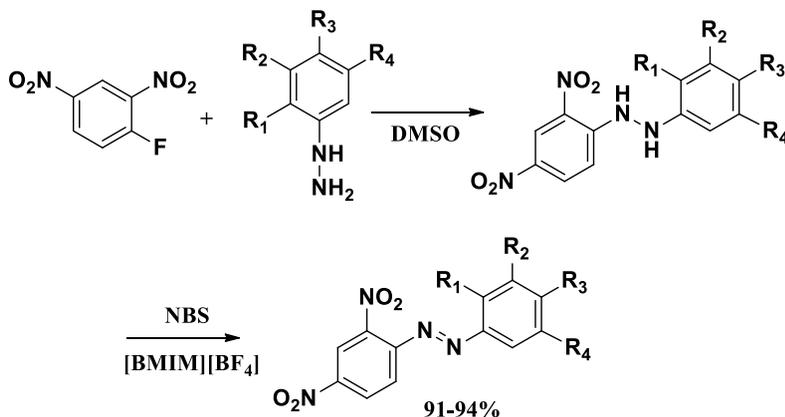


Figure 31 Exemple de synthèse d'azobenzène par oxydation de dérivés d'hydrazobenzène en utilisant du NBS²⁰¹

3. Propriétés biologiques des azobenzènes

Ces dernières années un intérêt croissant s'est développé pour les azobenzènes par rapport à leurs propriétés biologiques, plus particulièrement dans le domaine de la photopharmacologie²¹², où elle est l'une des fonctions chimiques les plus utilisées. En effet, la photoisomérisation *cis/trans* permet par exemple de moduler la neurotransmission²¹³ ou les propriétés anticancéreuses des molécules²¹⁴. Néanmoins, dans la suite de cette partie bibliographique, seules les propriétés antibactériennes et antifongiques des molécules aux motifs diazo seront abordées.

a) Azobenzènes antibactériens

Dans un premier temps, l'incorporation de la fonction azobenzène à des structures chimiques déjà bien connues en tant qu'antibactérien a été réalisée. C'est par exemple le cas d'une β -lactamine qui a montré des CMI₅₀ de 0,1 à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour des bactéries gram-positives et des activités antibactériennes semblables contre les bactéries gram-négatives. L'azobenzène ne semble jouer aucun rôle dans la mesure où des analogues de cette molécule avec un groupement ont montré elles aussi une bonne activité²¹⁵. Toujours dans le registre des molécules naturelles antibactériennes, le couplage d'une unité d'azobenzène à un groupement flavonoïde²¹⁶ ou à un acide kojique²¹⁷ a été tenté. Néanmoins, dans ces deux exemples, nous pouvons nous questionner sur le rôle de l'azobenzène dans l'activité antibactérienne de la molécule car ces molécules sont liées à chaque fois à un groupement déjà connu pour avoir des activités antibactériennes. Un autre exemple original, avec un azobenzène portant un cycle pyrazole, qui est une structure assez classique dans le design de molécules antibactériennes, a montré des CMI₅₀ entre 2 et 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour des souches de bactéries assez différentes. Un travail important de relation structure-activité a été effectué mais les auteurs n'ont pas déterminé le rôle de la fonction azobenzène²¹⁸. (**Figure 34**).

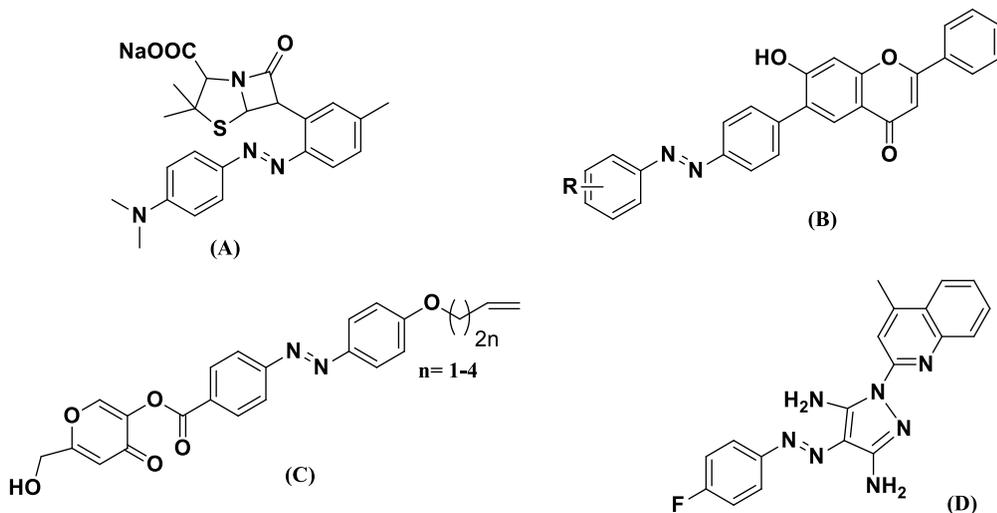


Figure 34 Azobenzènes avec un groupement β -lactamine (A), azobenzène dérivés d'un flavonoïde (B), azobenzène dérivé de l'acide kojique (C) Azobenzène portant un cycle pyrazole (D)²¹⁵⁻²¹⁸

Il y a en revanche un exemple de dérivés de biomolécules dont on a étudié l'influence de la photoisomérisation. Les sels biliaries sont des molécules amphiphiles naturelles qui, bien que ne présentant pas d'activités antibactériennes mais antifongiques et antiparasitaires²¹⁹, acquièrent des propriétés antibactériennes lorsqu'ils sont couplés à un azobenzène. De plus, il est possible de jouer sur l'activité antibactérienne de cette molécule avec l'isomérisation du *trans* vers le *cis*²²⁰ (**Figure 35**). Le rôle de la photoisomérisation a été aussi étudié sur des dérivés de quinolones²²¹ ou de triméthoprim²²².

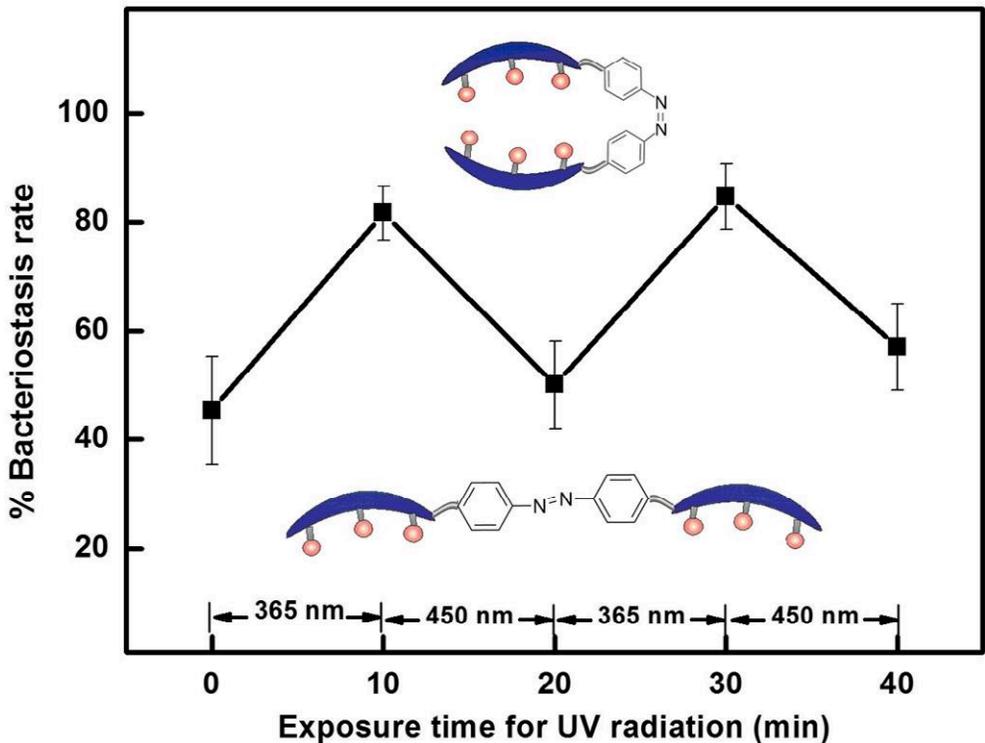


Figure 35 Effet de la photoisomérisation sur l'activité antibactérienne de l'azobenzène couplé à un sel biliaire²²⁰

Dans le domaine des azobenzènes amphiphiles, dont la cible des auteurs est la membrane, un sel d'isothiuronium en solution avec un complexe de cuivre a démontré ses propriétés antibactériennes sur *P.aeruginosa* ainsi que *S.aureus*²²³. Néanmoins, aucune étude n'a été faite sur la photoisomérisation ou sur le rôle de l'azobenzène. En effet, la photoisomérisation, entraînant la modification de la structure peut augmenter de manière très importante les activités biologiques d'un azobenzène²²⁴ qui n'aurait pas d'effet sous sa forme *trans*. De même un autre travail sur des fluorosurfactants avec des sucres comme tête polaires a montré que la position du CF_3 avait un rôle dans la modulation de l'activité antibactérienne²²⁵. Lorsque des azobenzènes cationiques et non-ioniques possèdent des sucres comme tête polaire, l'isomère *trans* inhibe la croissance des bactéries tandis que le composé *cis* détruit la membrane des bactéries. Ces composés sont actifs sur les bactéries gram-positives, mais seuls les composés avec les sucres composant la tobramycine comme tête polaire ont une activité sur *P.aeruginosa*²²⁶ (**Figure 36**).

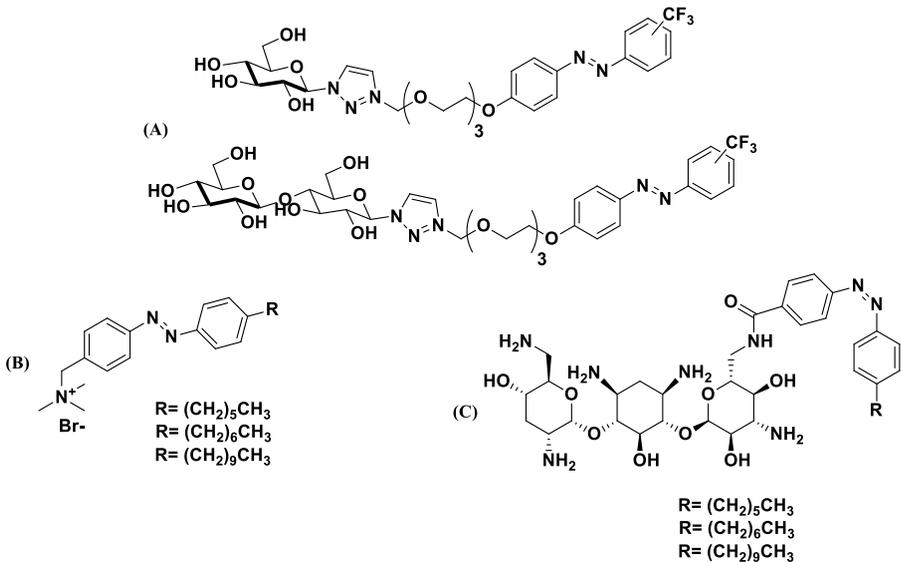


Figure 36 Structure des fluorosurfactants (A), des azobenzenes cationiques (B) et des azobenzenes avec une tête polaire composée des sucres de la tobramycine (C)^{225,226}

Toujours dans le domaine des tensioactifs, il a été montré que les tensioactifs non-ioniques à base d'azobenzène avec des sucres comme tête polaire pouvaient inhiber la croissance du biofilm de *P.aeruginosa*²²⁷. La croissance du biofilm des bactéries gram-positives peut quant à elle être simplement inhibée par de petits azobenzenes assez pauvrement fonctionnalisés^{228,229} (**Figure 37**). La cible métabolique est ici l'inhibition de l'adénosine triphosphate (ATP) synthase et de la protéine kinase. Il conserve son activité antibactérienne lorsqu'il est intégré dans une matrice polymère²³⁰.

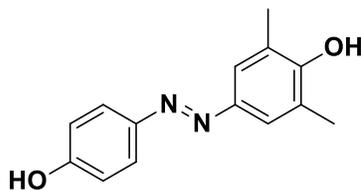


Figure 37 Structure de base du petit azobenzène inhibiteur de la croissance du biofilm des bactéries gram-positives²²⁸

De manière un peu plus exotique, une équipe de chercheurs a synthétisé des azobenzenes contenant un groupe azosilatrane. Ils annoncent des valeurs de CMI₅₀ de 200 µg/mL sur *S.aureus* ou *E.coli* pour les composés ne portant pas de groupement méthyle sur l'azosilatrane. Il n'y a en revanche aucune information sur le mode d'action²³¹ (**Figure 38**).

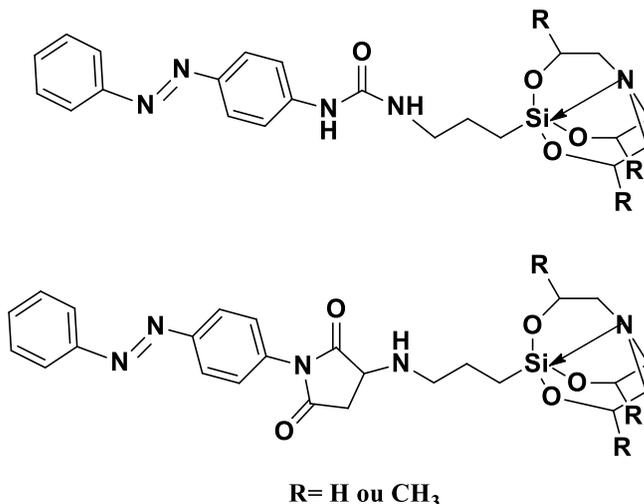


Figure 38 Structure des deux types d'azosilatrane synthétisés²³¹

b) Azobenzènes antifongiques

La littérature est bien moins abondante en ce qui concerne les azobenzènes antifongiques. Certains des composés cités précédemment ont été testés sur des champignons dans le cadre d'un screening mais n'ont pas été conçus pour être spécifiquement antifongiques. C'est par exemple le cas des sels d'isothiuronium²²³, de l'azobenzène portant un pyrazole²¹⁸ ou d'azobenzène incorporé dans une matrice polymère²³⁰. Néanmoins, un brevet a été déposé en 1998 pour l'utilisation d'azobenzènes en tant qu'antifongique²³². Le composé le plus efficace comprend un groupement trifluorométhyle en position 3. La cible biologique de ce composé est l'inhibition de l'ARN polymérase II des champignons, avec une CMI₅₀ *in vitro* de 5-15 μ M pour celle de *C. albicans*. Une dose de 20 mg/kg/jour est aussi efficace qu'une dose de 40/mg/kg/jour de fluconazole²³³. Un autre travail sur des structures assez similaires a été effectué, mais cette fois-ci, le but était de tuer des champignons phytopathogènes comme *Alternaria brassicae*. Au final, les deux structures les moins encombrées au niveau des cycles aromatiques ont été retenues par les auteurs²³⁴. (**Figure 39**).

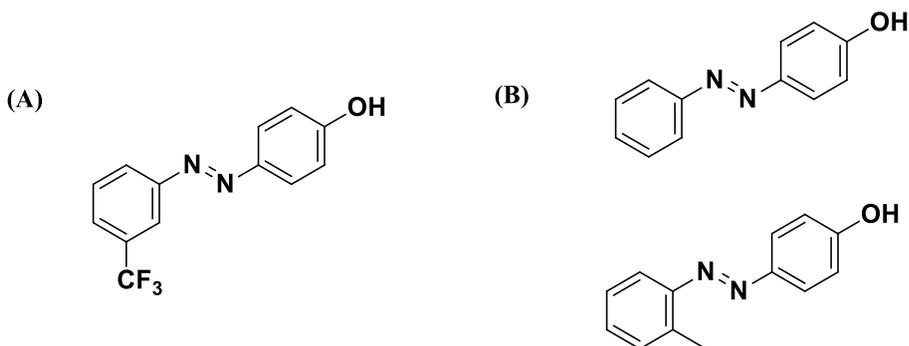


Figure 39 Structure de l'azobenzène breveté le plus prometteur (A) Structure des deux composés les plus actifs (B)^{232,234}

Une étude de 2018 sur des azobenzènes portant une base de Schiff a montré de fortes propriétés antifongiques contre *C.albicans*, *Scedosporium apiospermum* et *A.fumigatus* ainsi qu'un pouvoir antioxydant. La présence de l'imidazole est visiblement importante pour l'activité antifongique mais pas absolument nécessaire, puisque le composé sans imidazole présente la même CMI₅₀ contre *S.apiospermum*. Aucune étude n'a porté sur l'isomérisation *cis/trans* de ces composés²³⁵ (**Figure 40**).

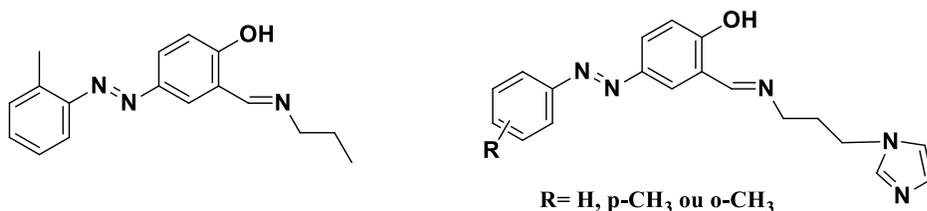


Figure 40 Structure des quatre bases de Schiff portant un azobenzène²³⁵

Maintenant que nous avons exposé les têtes polaires qui présentent un intérêt pour notre application et le potentiel des azobenzènes pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, nous allons pouvoir aborder les familles de molécules que nous avons synthétisées ainsi que leurs propriétés.

c) Toxicité des azobenzènes

Les azobenzènes pouvant présenter des propriétés biologiques intéressantes, il est important de s'assurer au préalable qu'ils ne sont pas nocifs pour la santé humaine. Les azobenzènes sont utilisés depuis la fin du XIX^e siècle en tant que colorant, et tous ne sont pas nocifs^{181,236}. Néanmoins, on rapporte que les

azobenzènes peuvent générer des métabolites toxiques²³⁷, comme des nitrosamines ou des naphthols substitués²³⁸ pouvant amener, entre autres, à des tumeurs de la rate²³⁹. La toxicité de ces composés est très liée aux substituants portés par les cycles azobenzéniques, il n'est néanmoins pas encore possible de dégager une relation entre la structure du composé et sa toxicité²³⁸. Lis Arias *et al.* ont réussi par exemple à diminuer la toxicité d'un colorant azobenzénique en greffant une tête sucre au colorant²⁴⁰ (**Figure 41**).

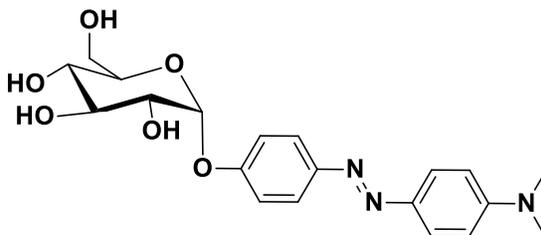


Figure 41 Structure d'un colorant portant un D-galactose en position 4'. Extrait de Lis Arias²⁴⁰.

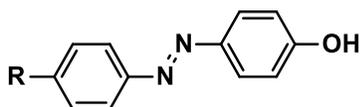
Un autre risque de toxicité est la capacité hémolytique des azobenzènes. Cette activité est connue depuis les années 1940²⁴¹. La conception d'azobenzène amphiphiles augmente encore les risques de créer des molécules avec un fort pouvoir hémolytique car le pouvoir antibactérien jouant sur les interactions avec la membrane, l'amphiphilie et les activités hémolytiques sont étroitement liées. Ce phénomène est bien connu dans la conception de peptides antibactériens, comme le cas du résidu peptidique GS14 de la gramicidine S, qui, modifié, permet d'augmenter fortement l'amphiphilie ainsi que l'activité hémolytique²⁴², ou au contraire de diminuer l'activité hémolytique et augmenter encore l'activité antibactérienne²⁴³.

LA FAMILLE DES 4-ALKYL-4'- HYDROXYAZOBÈNZÈNE (AzoOH)

La première famille de molécules étudiée par rapport à ses activités antimicrobiennes est celle des **AzoOH** (**Figure 42**). Ces composés sont utilisés en tant que colorants²⁴⁴. Ils sont également étudiés pour leurs propriétés en tant que cristaux liquides²⁴⁵. Ce chapitre présentera dans un premier temps la synthèse de ces composés et leurs propriétés physico-chimiques en solution. Ensuite, leurs propriétés antifongiques et antibactériennes seront présentées. Enfin, des expériences de biophysique et de modélisation seront discutées afin d'évaluer leur capacité à interagir avec la membrane plasmique bactérienne. De plus, ce chapitre tentera de dégager les premiers éléments de relations entre la structure chimique et l'activité biologique en faisant varier la taille de la queue apolaire.

I. Synthèse

Ces molécules représentent une famille de molécules plateformes qui sera utilisée pour les synthèses des autres familles de composés tels que les **AzoPEG** et les **AzoTAI** (voir Chapitres 3 et 4). En effet, il suffira simplement de greffer une tête polaire sur la molécule pour la rendre amphiphile. Il est déjà montré dans la littérature que des composés proches cette famille de molécule avaient des activités biologiques sur les champignons phytopathogènes *Alternaria brassicae* ou *Pyricularia oryzae* (CMI₅₀ comprises entre 12 et 30 µg.mL⁻¹) et sur *C.albicans* qui peut causer des infections chez l'homme (CMI₅₀ comprise entre 5 et 15 µM)^{230,232-234}. De même cette famille est active sur la formation de biofilms de bactéries comme *S.aureus*^{228,230}. Par ailleurs, elle servira de point de comparaison aux deux autres familles en termes de propriétés détergentes ou antiseptiques afin d'évaluer l'intérêt des têtes polaires greffées pour une propriété donnée (**Figure 41**).



R = H : **HAzoOH**
 R = Et : **EtAzoOH**
 R = Bu : **BuAzoOH**
 R = Hex : **HexAzoOH**

Figure 42 Structure chimique de RAzoOH

La présence du groupement hydroxy sur le cycle aromatique en position 4 est importante pour l'activité biologique, bien que les différents auteurs n'ont

pas précisé son rôle exact^{228,232-234}. Cette fonction chimique a été gardée dans la conception des molécules antibactériennes et antifongiques^{228,232-234}. Pour la queue apolaire, il a été choisi de greffer un groupement hexyle ($R = (CH_2)_5CH_3$), un groupement butyle ($R = (CH_2)_3CH_3$), un groupement éthyle ($R = CH_2CH_3$) et enfin une absence de queue apolaire ($R = H$). Cette diminution progressive de la longueur de la chaîne apolaire permettra d'apprécier l'influence de celle-ci sur l'activité biologique. En effet, il est visiblement conseillé de garder la position en *para* du cycle la moins substituée possible afin de maintenir l'activité, comme le suggèrent les précédents travaux^{232,234}. Les chercheurs ayant synthétisé des azobenzènes avec un groupement hydroxy en *para* ont tous utilisé la réaction de couplage diazoïque en utilisant de l'acide nitreux formé *in situ* par l'action d'un acide sur le nitrite de sodium. Ce réactif permet d'obtenir de bons rendements tout en tolérant une grande variété de substituants sur l'azobenzène^{227-229,234}. La synthèse de ces azobenzènes avec un groupement hydroxy en *para* aurait pu être faite à partir d'un réarrangement de Wallach à partir d'hydroxyazobenzène. Néanmoins il aurait été nécessaire de synthétiser préalablement l'hydroxyazobenzène, ce qui aurait rajouté une étape supplémentaire dans la synthèse²⁰⁸. Il n'est pas non plus possible de passer par un réarrangement de benzotriazoles car cette réaction ne donne que l'hydroxyazobenzène substitué en *ortho*¹⁵¹. Ainsi, c'est pour ces raisons que la synthèse des **AzoOH** dans ce travail a été calquée sur les travaux de F.Mangin²⁴⁶ qui utilise un couplage diazoïque. Ce dernier permet d'obtenir en une étape l'azobenzène désiré, en partant de phénol et des différents 4-alkylanilines^{178,179,246,247} (**Figure 43**).

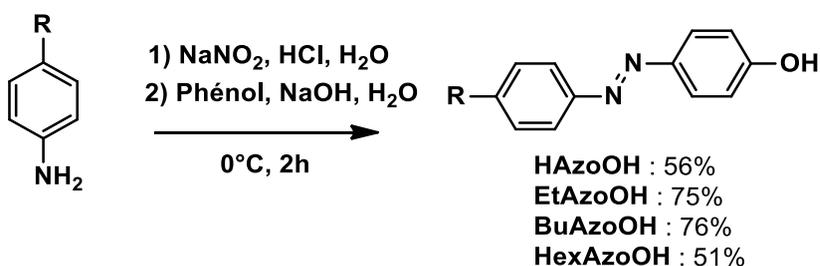


Figure 43 Synthèse des composés de la famille AzoOH

La réaction étant à la base adaptée pour la synthèse de **BuAzoOH**, la baisse de rendement pour **HexAzoOH** peut être expliquée par la mauvaise solubilité de l'hexylaniline dans l'eau (même sous sa forme protonée) et donc la mauvaise mise en contact des réactifs. De plus, la présence de produits secondaires, comme de l'aniline oxydée, réduit encore le rendement en rendant la séparation difficile.

II. Propriétés physico-chimiques

Pour évaluer les propriétés tensioactives de cette famille de molécules, leur capacité à s'adsorber à une interface air-eau a été déterminée en mesurant la diminution de la tension de surface d'une solution aqueuse contenant la molécule à différentes concentrations. Les résultats pour la variation de cette tension de surface sont indiqués dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 Variation maximale de la tension de surface de l'eau observée des différents composés de la famille AzoOH à 25°C dans l'eau

| | HAzoOH | EtAzoOH | BuAzoOH | HexAzoOH |
|---|---------------|----------------|----------------|-----------------|
| ΔCMC ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) | 0 | 0 | 0 | 5,1 |

Même avec le composé **HexAzoOH** qui est le seul capable de baisser la tension de surface de la solution, on n'observe aucun phénomène de rupture de pente (Données non-montrées). En effet, Les composés étudiés ne se comportent pas comme les tensioactifs classiques qui présentent, dans le graphique de la tension de surface en fonction de la leur concentration dans la phase aqueuse, une rupture de pente à la concentration correspondant à la concentration micellaire critique. Il est donc impossible de déterminer une CMC. Leur insolubilité partielle en milieu aqueux et leur faible amphiphilicité est en effet défavorable à leur adsorption à une interface. Cette famille de molécules est donc peu susceptible d'interagir avec une membrane biologique, correspondant à une interface hydrophobe/hydrophile plus complexe.

III. Propriétés antifongiques et antibactériennes

1. Propriétés antifongiques

Un screening à la concentration de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur 3 levures (*Candida krusei*, *Candida kefyr* et *Candida tropicalis*) et 3 champignons filamenteux (*Alternaria alternata*, *Fusarium solani* et *Cladosporium cladosporioides*) a été réalisé afin de voir si ces composés présentaient un intérêt sur ce type de microorganismes. Chaque expérience est réalisée en triplicata. Un antifongique agissant sur la membrane des champignons, l'amphotéricine B⁵⁰⁻⁵³, a été aussi testé en tant que témoin positif. Les résultats du screening des levures sont présentés dans la **Figure 44**.

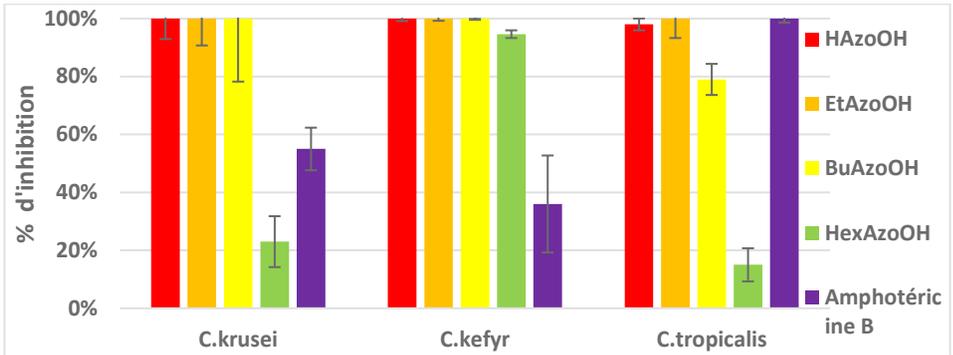


Figure 44 Inhibition de la croissance des levures en présence des AzoOH

HAzoOH et **EtAzoOH** inhibent complètement la croissance des 3 levures à 30 μ g/mL. **BuAzoOH** en revanche n'inhibe la croissance de *C.tropicalis* qu'à 80%. **HexAzoOH** a une mauvaise activité, à part sur *C.kefyr* où il inhibe sa croissance à plus de 90%. Dans le cas des 3 levures, les **AzoOH** arrivent à avoir une activité comparable ou meilleure au témoin positif. Les résultats du screening pour les champignons filamenteux sont présentés dans la **Figure 45**.

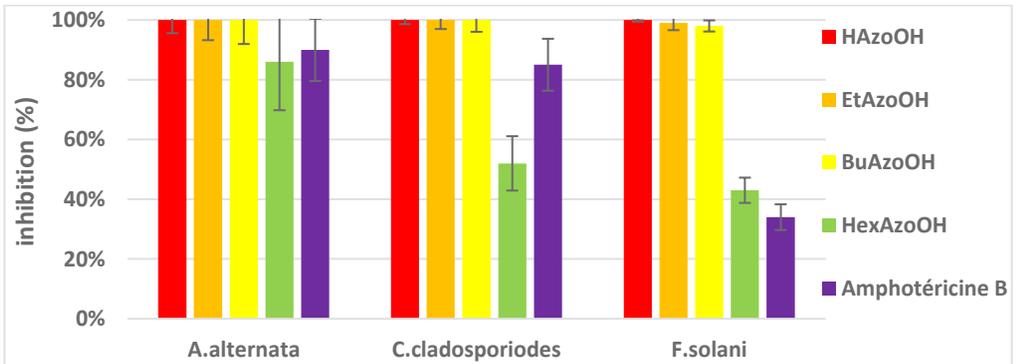


Figure 45 Inhibition de la croissance des champignons filamenteux en présence des AzoOH

HAzoOH, **EtAzoOH** et **BuAzoOH** inhibent 100% de la croissance des 3 champignons filamenteux à 30 μ g/mL. **HexAzoOH** a une activité plus faible puisque l'inhibition de la croissance atteint seulement 50% pour *C.cladosporiodes*, 40% pour *F.solani* et 90% pour *A.alternata*. Cela semble cohérent avec des travaux précédents qui fixaient la CMI₅₀ d'**HAzoOH** à

12,51 $\mu\text{g/mL}$ pour *A.alternata*²³⁴. Pour les 3 champignons filamenteux, on arrive également à avoir des résultats comparables ou meilleurs par rapport au témoin positif.

Il est intéressant de noter que les activités sur l'inhibition de la croissance des champignons sont inversement proportionnelles à la taille de la queue apolaire.

2. Propriétés antibactériennes

La croissance des 3 souches *E.coli*, *M.luteus* et *B.subtilis* a été testée via un screening pour mesurer les pourcentages d'inhibition sur 24 heures des composés **AzoOH**. Ces expériences ont été réalisées en triplicata. Les résultats pour l'inhibition de la croissance d'*E.coli* sont dans la **Figure 46**. Les valeurs sont comparées avec une molécule antibactérienne, la polymyxine B, agissant sur les membranes des bactéries gram-négatives en tant que témoin positif. Il s'agit d'un peptide tensioactif qui se lie au LPS des bactéries gram-négatives et qui perméabilise la membrane externe²⁴⁸. Il est notamment utilisé dans le cas d'infections par des souches de *P.aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes²⁴⁹.

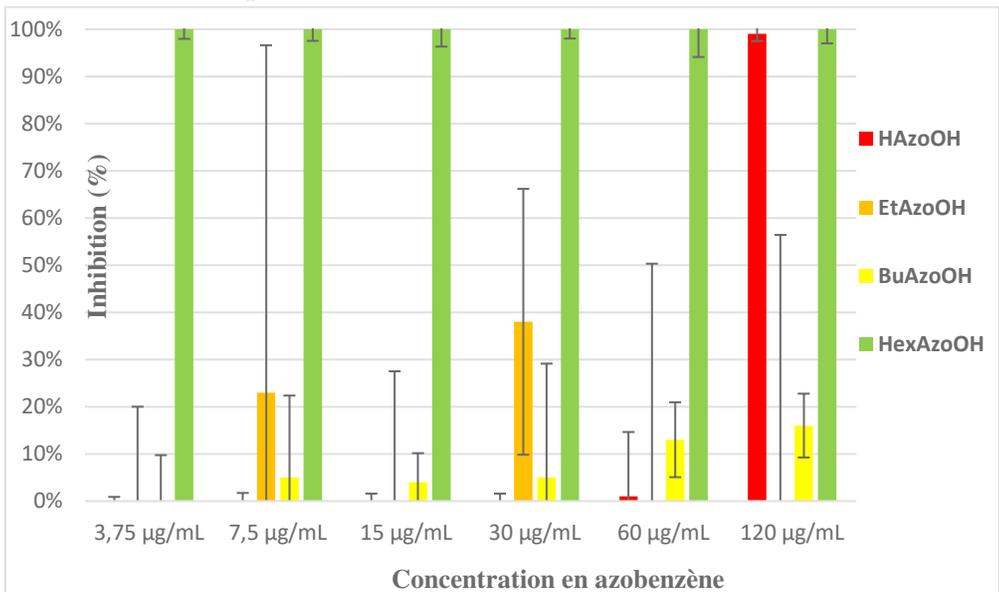


Figure 46 Inhibition de la croissance d'*E.coli* en présence d'AzoOH

HexAzoOH arrive à inhiber 100% de la croissance du micro-organisme, et ce, même à la concentration la plus faible testée. **BuAzoOH** a une faible activité sur la croissance d'*E.coli* quant à **EtAzoOH** il n'en a quasiment aucune. À l'inverse, **HAzoOH** n'a aucune activité sur la croissance maximale

en 24h (avec une exception à la concentration la plus forte testée, 120 $\mu\text{g/ml}$) mais présente une influence sur d'autres paramètres des cinétiques de croissance. En effet, les temps de latence et le taux de croissance μ peuvent aussi être modifiés par l'action de la molécule. Le temps de latence correspond à l'intervalle de temps entre le début de la mise en culture et le début de la phase de croissance exponentielle de la bactérie. Le taux de croissance μ correspond à la vitesse relative de croissance durant la phase exponentielle (c'est la vitesse absolue rapportée à la biomasse totale). Ainsi, les temps de latence et les taux de croissance sont indiqués dans la **Figure 47** pour cette molécule. Nous n'avons pas pu déterminer le taux de croissance et le temps de latence à 120 $\mu\text{g/mL}$ car la bactérie ne s'est absolument pas développée à cette concentration.

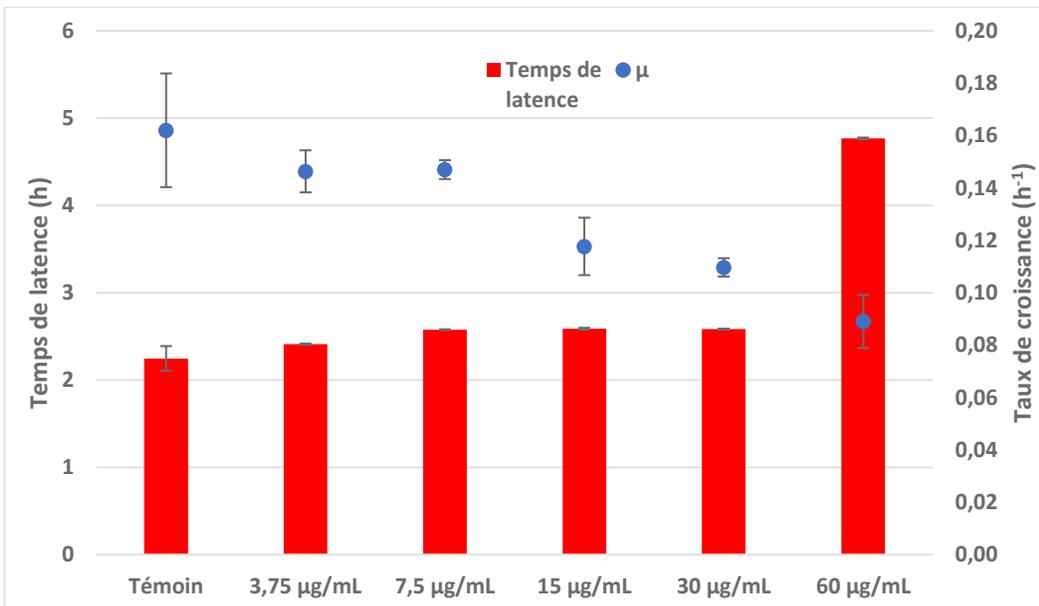


Figure 47 Taux de croissance (μ) et temps de latence d'*E.coli* en présence de **HAzoOH**

À la concentration de 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, la bactérie a un temps de latence qui est double par rapport au témoin, indiquant que la molécule entraîne déjà un retard de la phase de croissance à cette concentration qui ne montre pas de pourcentage d'inhibition significatif sur 24h, ce temps permettant encore à la DO maximale d'être atteinte. En deçà de cette concentration, le temps de latence est inchangé. Pour le taux de croissance, il est possible de constater qu'il est deux fois inférieur au témoin à 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, et qu'il remonte de manière dose dépendante à une valeur non significativement différente du témoin à partir de 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainsi, **HAzoOH** agit sur la vitesse de la phase

exponentielle à partir de $15\mu\text{g.mL}^{-1}$ puis également sur la durée de la phase de latence à partir de $60\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour aboutir à une inhibition totale sur 24h à $120\mu\text{g.mL}^{-1}$.

La **Figure 48** porte sur l'inhibition de la croissance de *M.luteus* par les **AzoOH**. Un antibactérien capable d'interagir avec les membranes plasmiques des bactéries gram-positives, la daptomycine, a été utilisé en tant que témoin-positif. Ce lipopeptide est capable de dépolariser la membrane plasmique²⁵⁰.

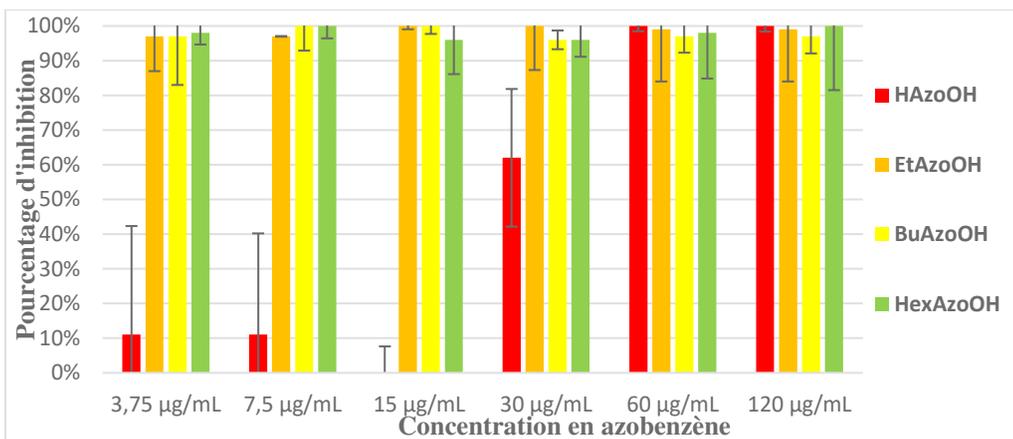


Figure 48 Inhibition de la croissance de *M.luteus* en présence d'AzoOH

Les composés **HexAzoOH**, **BuAzoOH** et **EtAzoOH** sont actifs à 100% peu importe les concentrations. Ils restent au-dessus de la CMI₅₀ de la daptomycine mais uniquement parce qu'ils n'ont pas été testés à une concentration aussi basse (**Tableau 1**). **HAzoOH** perd toute activité en deçà de $15\mu\text{g/mL}$. Il apparaît ainsi que les composés de la famille **AzoOH** perdent assez rapidement leurs activités antibactériennes lorsqu'ils n'ont plus de queue apolaire. En regardant de plus près les cinétiques de croissance de *M.luteus* en présence de **HAzoOH** (**Figure 49**, les concentrations $120\mu\text{g.mL}^{-1}$ et $60\mu\text{g.mL}^{-1}$ n'ont pas été représentées car la bactérie ne s'est pas développée), il apparaît que quand il n'y a pas inhibition de la croissance, le composé n'a ni effet sur le temps de latence, ni sur la phase exponentielle.

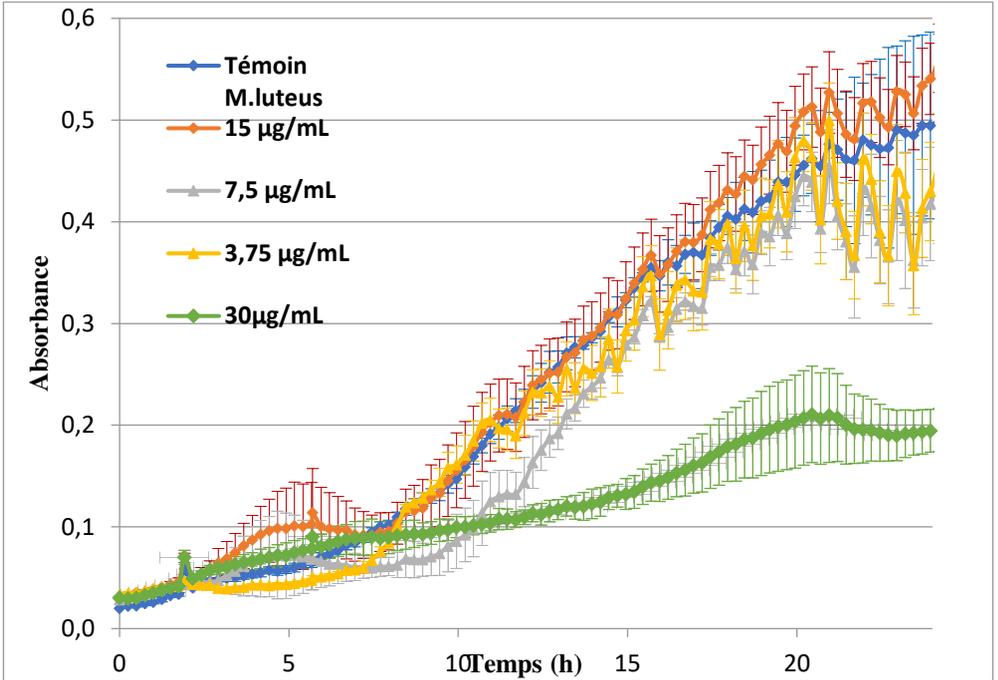


Figure 49 Cinétique de la croissance de *M.luteus* en présence d'**HAzoOH**

À la concentration de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, la phase exponentielle est extrêmement ralentie. Le taux de croissance moyen du témoin est de $0,026 \text{ h}^{-1}$, le taux de croissance moyen à cette concentration est de $0,017 \text{ h}^{-1}$, cela fait 66% de moins. Ainsi, comme observé sur *E.coli*, **HAzoOH** semble avoir une action à la fois sur le temps de latence, en empêchant de faire entrer la bactérie en phase exponentielle, mais également sur le taux de croissance μ en le diminuant significativement. La **Figure 50** concerne l'inhibition de la croissance de *B.subtilis* par les **AzoOH**.

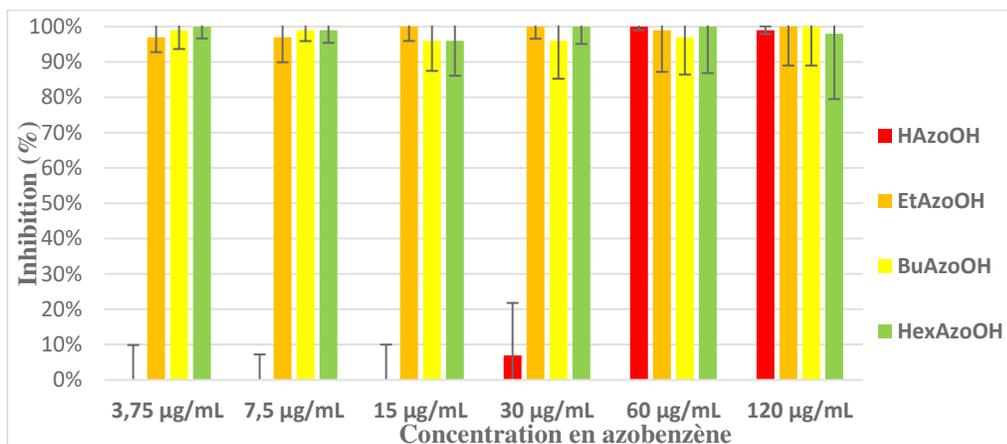


Figure 50 Inhibition de la croissance de *B.subtilis* en présence d'AzoOH

Cette seconde bactérie gram-positif semble être beaucoup plus sensible aux azobenzènes de cette famille. En effet **HexAzoOH**, **BuAzoOH** et **EtAzoOH** inhibent totalement la croissance de la bactérie. Même à la concentration la plus faible, ils sont bien plus efficaces que la daptomycine dans ces conditions (**Tableau 3**). En regardant les cinétiques de la croissance de *B.subtilis* (**Figure 51**, les concentrations 120 et 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ n'ont pas été représentées car la bactérie ne s'est pas développée à ces concentrations), on observe que **HAzoOH** n'a aucun effet sur la phase exponentielle ou sur taux de croissance en deçà de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

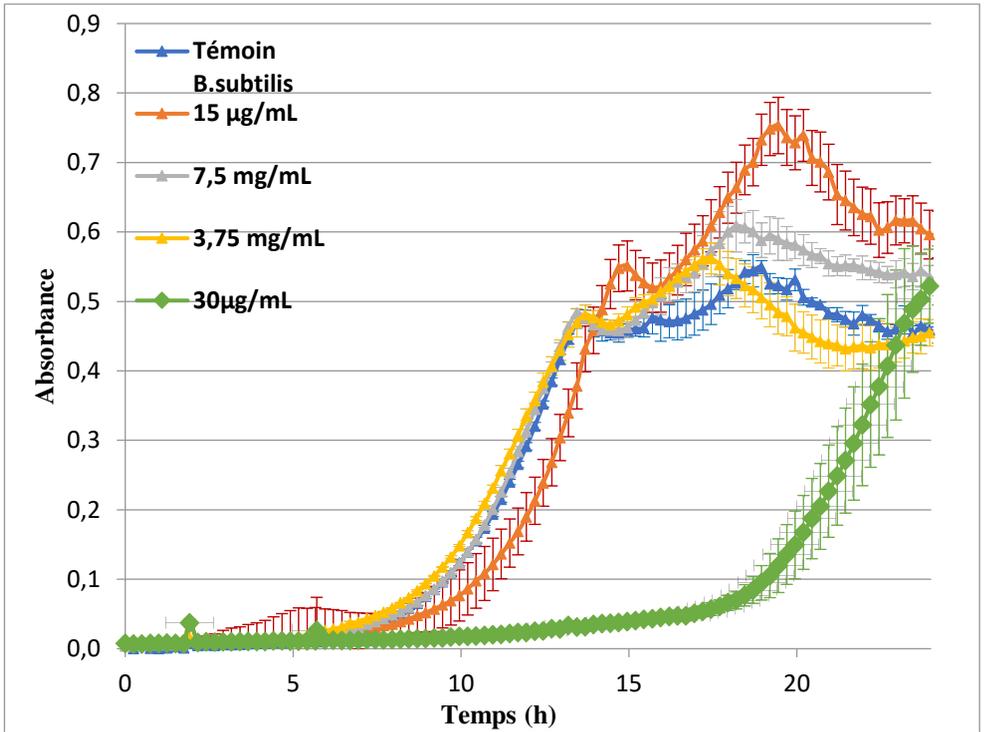


Figure 51 Cinétique de la croissance de *B. subtilis* en présence d'**HAzoOH**

En revanche, à la concentration de $30\mu\text{g.mL}^{-1}$, le temps de latence passe en moyenne à 18,4 h alors que pour le témoin, il est de 4,1h, soit plus de 4 fois moins. A cette concentration, on observe en revanche une augmentation du taux de croissance de la phase exponentielle puisqu'au bout de 24h, la bactérie est au même niveau que le témoin (on passe d'un taux de croissance de 0,06 pour le témoin à 0,12 pour la concentration de $30\mu\text{g.mL}^{-1}$). Ainsi **HAzoOH** inhibe à 100% la croissance de la bactérie aux 2 concentrations les plus fortes testées, mais aux concentrations testées inférieures à $60\mu\text{g/mL}$, l'activité sur l'intensité de cette croissance est perdue. Ces résultats vont dans le même sens qu'une autre étude sur des azobenzènes possédant un hydroxy en position *para* et des groupements alkyls sur le cycle aromatique. Les auteurs, après une étude de docking, visaient l'inhibition de l'ATP synthase des bactéries et obtenaient des CMI_{50} de l'ordre de quelques dizaines de $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour des hydroxyazobenzène substitués²²⁸⁻²³⁰.

En regardant les CMI_{50} (**Tableau 3**), on voit que **HAzoOH** est à part dans la famille des **AzoOH** car c'est la seule qui a vraiment des CMI_{50} très élevées. Ainsi, on peut suspecter un mécanisme d'action différent de l'inhibition de l'ATP synthase par cette molécule. Il est également intéressant

de noter que **HAzoOH** diminue le taux de croissance et le temps de latence d'*E.coli* et *M.luteus*, mais ne diminue que le temps de latence pour *B.subtilis*. **EtAzoOH** et **BuAzoOH** ont des CMI₅₀ faibles uniquement pour les bactéries gram-positives, indiquant possiblement une influence de la composition de l'enveloppe bactérienne dans l'accès à la cible cellulaire. **HexAzoOH** se distingue aussi par sa capacité à empêcher la croissance des 3 types de souches à la concentration la plus faible en faisant la molécule la plus efficace de la famille contre les bactéries. La présence d'une queue apolaire ainsi que sa taille semblent ainsi être des facteurs conditionnant l'activité antibactérienne de cette famille de molécules.

Tableau 3 Détermination des CMI₅₀ d'*E.coli*, *M.luteus* et *B.subtilis* pour les composés de la famille **AzoOH**

| CMI ₅₀ (µg/mL) | <i>E.coli</i> | <i>M.luteus</i> | <i>B.subtilis</i> |
|---------------------------|----------------|-----------------|-------------------|
| HAzoOH | 120 | 30 | 60 |
| EtAzoOH | >120 | 3,75 | 3,75 |
| BuAzoOH | >120 | 3,75 | 3,75 |
| HexAzoOH | 3,75 | 3,75 | 3,75 |
| Polymyxine | 3,75 | - | - |
| Daptomycine | - | 2 | 30 |

En conclusion de cette partie, nous pouvons dire que les résultats obtenus sur les levures et les champignons filamenteux sont assez semblables au niveau de l'ordre d'efficacité des membres de la famille **AzoOH** ainsi que pour l'intensité de l'inhibition de la croissance. Il semble ainsi que si des composés avec une bonne activité antibactérienne sont recherchés, il faut une longue queue hydrophobe sur le cycle azobenzénique alors que pour une bonne activité sur l'inhibition de la croissance des champignons, il faut une molécule comportant une courte queue apolaire voir pas de queue apolaire du tout. Alors que le but recherché ici est d'interagir avec la membrane plasmique, ces premiers résultats indiqueraient un mode d'action différent de la famille des molécules sur les cellules bactériennes et fongiques. En effet, selon la littérature, ces azobenzènes sans queue apolaire inhiberaient l'ARN polymérase II des champignons²³² tandis que le mode d'action de ces azobenzènes sans queue apolaire sur les bactéries serait l'inhibition de l'ATP synthase et de la protéine kinase, selon une expérience de docking²²⁸. Si l'hypothèse d'une action au niveau des membranes cellulaires est envisagée,

une interaction des cycles aromatiques des molécules dépourvues de queues apolaire avec les molécules d'ergostérol fongique pourrait être la source de ces différences de comportement. En effet, en l'absence de ce type de molécule dans les membranes bactériennes, la présence d'une queue apolaire pourrait devenir nécessaire à l'insertion dans la membrane. Ainsi, l'interaction des composés **AzoOH** avec des modèles de membranes bactériennes va être étudiée pour voir s'il est possible que le mécanisme d'action soit une lyse de la membrane plasmique.

IV. Perméabilisation des liposomes

Le pouvoir perméabilisant des **AzoOH** synthétisés est évalué en formant des liposomes dont les proportions en lipides membranaires bactériens (PE, PG, CL et DGDG) sont les plus proches des compositions que l'on peut trouver dans la littérature^{38,122}. Les résultats de la perméabilisation des liposomes mimant la composition de la membrane plasmique d'*E.coli* sont présentés dans la **Figure 52**.

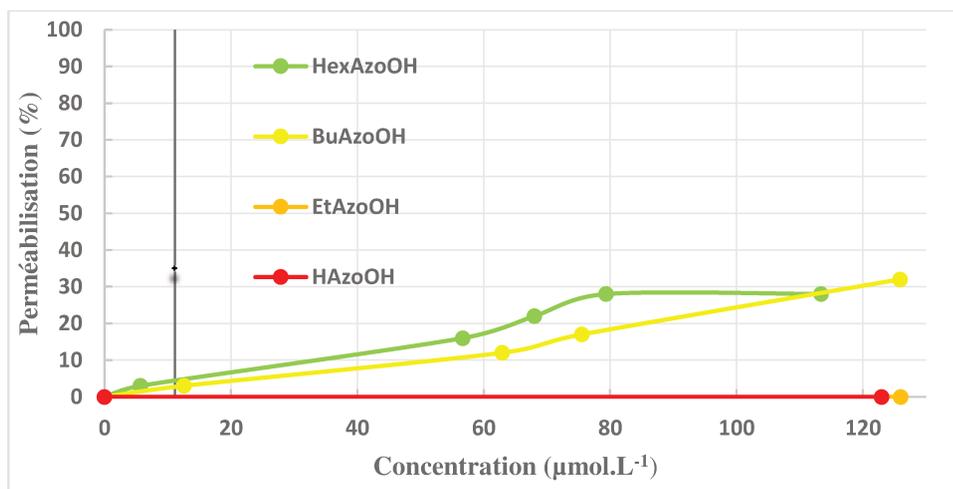


Figure 52 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne d'*E.coli* en fonction de la concentration en AzoOH. Les liposomes sont constitués d'un mélange PE/PG/CL (70/25/5). La concentration en phospholipides est de 11,1 µmol.L⁻¹. La barre verticale noire correspond à la concentration à laquelle on atteint un rapport azobenzène/phospholipides de 1.

HAzoOH et **EtAzoOH** n'ont aucun effet perméabilisant, quelle que soit leur concentration. **HexAzoOH** et **BuAzoOH**, quant à eux, perméabilisent

les liposomes de manière négligeable à des rapports molécules/lipides inférieurs à 1, plus proches de la réalité pharmacologique. On voit malgré tout qu'à des concentrations supérieures de l'ordre de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ces derniers peuvent perméabiliser les liposomes à hauteur de 30%. Cela nous indique que l'activité antibactérienne de ces composés n'est pas liée à une perméabilisation totale de la membrane interne d'*E.coli*.

La perméabilisation de liposomes mimant la composition de la membrane plasmique de *M.luteus* est exposée dans la **Figure 53**.

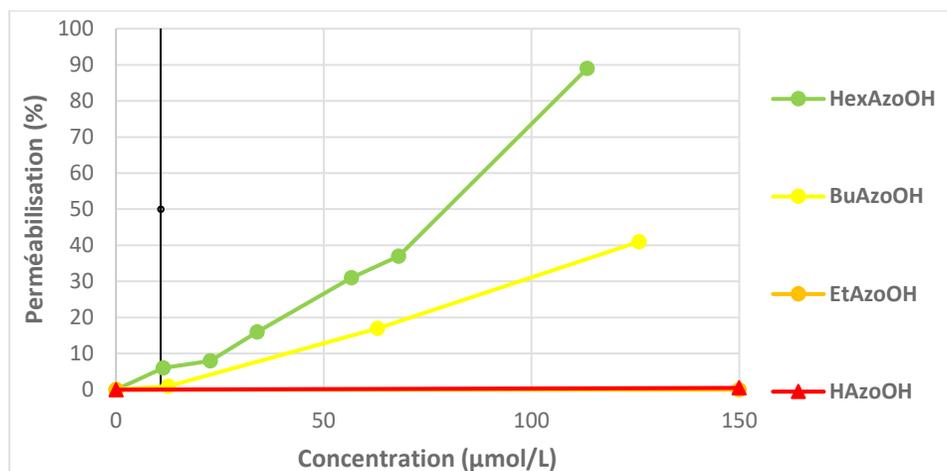


Figure 53 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de *M.luteus* en fonction de la concentration en AzoOH. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/DMDG/CL (63/32/5). La concentration en phospholipides est de $10,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La barre verticale noire correspond à la concentration à laquelle on atteint un rapport azobenzène/phospholipides de 1.

Comme dans le cas précédent, **EtAzoOH** et **HAzoOH** n'ont aucun pouvoir de perméabilisation de ces liposomes. **BuAzoOH** perméabilise les liposomes à hauteur de 40% pour des concentrations élevées de l'ordre de $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. **HexAzoOH** provoque entre 3 et 8 % de perméabilisation pour des rapports molécules/lipides de 0,2 à 1. Par contre, pour des rapports supérieurs, la perméabilisation atteint des valeurs de 90% pour une concentration de $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Il existe donc bien un effet de la longueur de la chaîne sur l'activité perméabilisante de ces composés vis-à-vis de la membrane plasmique de *M.luteus*. Cela nous indique qu'au vu de l'activité antimicrobienne de ces composés sur *M.luteus*, celle-ci n'est pas liée à une perméabilisation totale de la membrane interne de *M.luteus*.

La même expérience a été menée avec des liposomes mimant la composition de la membrane de *B.subtilis* (**Tableau 4**).

Tableau 4 Perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de *B.subtilis* par les différentes molécules de la famille AzoOH à différentes concentrations. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/PE/CL (81/14/5). La concentration en phospholipides est de 30,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

| | HAzoOH | EtAzoOH | BuAzoOH | HexAzoOH |
|--|--------|---------|---------|----------|
| Perméabilisation à un rapport azobenzène/phospholipide de 0,75 | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Perméabilisation à un rapport azobenzène/phospholipide de 12 | 0% | 0% | 0% | 0% |

Tous les composés, même pour des concentrations élevées correspondant à des rapports molécules/lipides supérieurs à 1, présentent une activité perméabilisante nulle vis-à-vis d'une membrane biomimétique de *B. subtilis*. Sachant que cette bactérie est a priori la plus sensible au pouvoir antibactérien des **AzoOH**, cela indique clairement que le mécanisme de ces propriétés antibactériennes n'est pas lié à une perméabilisation de la membrane interne de *B.subtilis*.

Il semblerait que les **AzoOH** synthétisés dans ce travail aient des affinités pour PE et DMDG. En effet, c'est sur les liposomes modèles d'*E.coli* et de *M.luteus* qu'on a observé les plus fortes activités de perméabilisation. Inversement, les liposomes modèles de *B.subtilis*, constitués de plus de 74% de PG ne sont jamais perméabilisés par les **AzoOH**. Il semblerait donc que les interactions entre PG et la famille **AzoOH** soient inexistantes ou très faibles.

En conclusion de ces expériences, ces résultats indiquent que pour l'ensemble des **AzoOH** et des 3 bactéries, le mécanisme d'action de ces molécules ne semble pas passer par une perméabilisation totale de la membrane interne. Néanmoins, certains composés semblent interagir avec la membrane lipidique. L'analyse plus détaillée de cette interaction est investiguée au moyen de la modélisation moléculaire.

V. Modélisation de l'insertion dans une bicouche lipidique

La procédure IMPALA a été appliquée afin d'évaluer les capacités d'insertion de la molécule au sein d'une bicouche phospholipidique⁶. La contrainte énergétique totale de la molécule en fonction de la position de son centre de masse dans la bicouche est représentée dans la **Figure 54**. Une contrainte énergétique négative témoigne d'une interaction favorable avec le composé favorisant sa traversée de cette bicouche implicite.

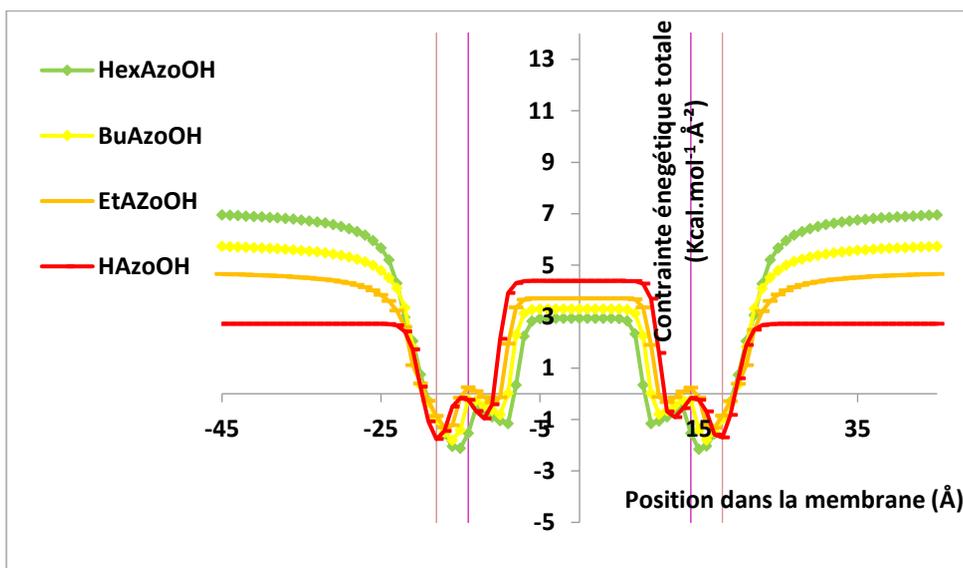


Figure 54 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule d'AzoOH en fonction de la position de son centre de masse dans une membrane implicite selon la procédure IMPALA. La ligne marron verticale à -18\AA et $+18\text{\AA}$ correspond à la limite entre le milieu aqueux et la partie polaire de la bicouche. La ligne violette verticale à $-13,5\text{\AA}$ et $+13,5\text{\AA}$ correspond à la limite entre les têtes polaires et cœur hydrophobe de la bicouche implicite. La ligne verticale noire correspond au centre de la bicouche.

Cette figure montre que tous les membres de la famille des AzoOH ont globalement le même profil énergétique lors de leur traversée de la bicouche. Une chute de la contrainte énergétique totale est observée lorsque la molécule atteint l'interface entre la phase aqueuse externe et la partie polaire de la bicouche avec un premier minimum énergétique situé au niveau de la partie polaire de la bicouche. Ensuite, un second minimum en énergie existe au niveau de la partie hydrophobe de la bicouche. Une remontée de la contrainte énergétique est présente à l'approche du centre de la bicouche. Cela indique

que les molécules peuvent pénétrer dans une bicouche lipidique mais vont plus vraisemblablement rester à l'interface de celle-ci plutôt que pénétrer en profondeur dans la membrane. La traversée de la bicouche par cette famille de molécule est plutôt défavorable d'un point de vue énergétique. Enfin, en comparant les molécules entre elles, on peut voir que la pénétration de l'**HexAzoOH** est la plus favorable car c'est la molécule dont la contrainte énergétique diminue le plus à l'approche de la bicouche (la contrainte énergétique passe de $6,9 \text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ dans l'eau à $-2,1 \text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ à l'interface eau/tête polaire des lipides). Par contre, **HAzoOH** présente le profil énergétique le moins favorable à une pénétration dans une bicouche lipidique puisque la variation d'énergie est bien moindre ($2,7 \text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ à $-1,7 \text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$). Ainsi, il semblerait que la longueur de la queue apolaire est importante pour pouvoir interagir avec la bicouche phospholipidique. Ces conclusions vont dans le même sens que les résultats d'activités antibactériennes présentés plus haut.

VI. Modélisation des interactions avec les lipides membranaires

La méthode de docking Hypermatrix a été utilisée pour étudier la spécificité d'interaction avec les lipides membranaires bactériens ainsi que pour avoir une description atomique de l'interaction entre les molécules **AzoOH** et les lipides. Les différences entre les énergies d'interactions des **AzoOH** avec les lipides bactériens par rapport aux énergies d'interactions que les **AzoOH** peuvent avoir avec eux-mêmes sont affichées dans la **Figure 55**⁷.

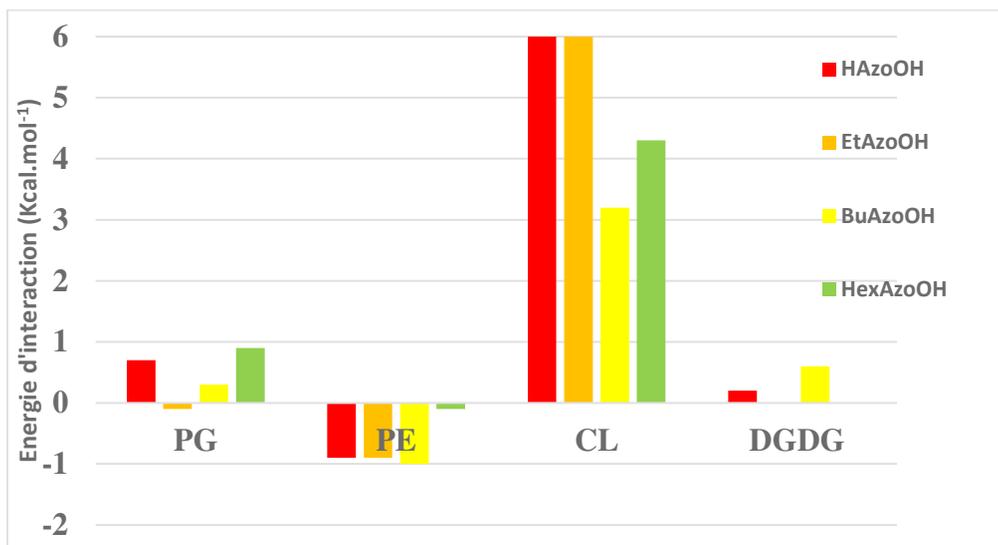


Figure 55 Différences entre les énergies d'interactions des AzoOH avec les lipides bactériens par rapport aux énergies d'interactions avec eux-mêmes dans un assemblage multimoléculaire calculé par la méthode de docking Hypermatrix. PG correspond au phosphatidylglycérol, PE correspond au phosphatidyléthanolamine, CL correspond à la cardiolipine, DGDG correspond au digalactosyldiacylglycérol.

Les énergies d'interactions pour PG, CL et DGDG sont toutes positives ou nulles, ce qui indique qu'il est peu probable qu'ils interagissent avec ces lipides au niveau de la membrane. Une énergie d'interaction négative entre **HAzoOH**, **EtAzoOH**, **BuAzoOH** et PE apparaît également mais est toutefois très faible. Si PE était favorable à l'interaction des **AzoOH** dans les membranes bactériennes, les compositions membranaires renfermant plus de PE devraient être plus sensibles, ce qui n'est pas constaté dans nos résultats. Les activités antibactériennes des **AzoOH** ne semblent donc pas corrélées à une interaction avec les lipides de la membrane plasmique.

VII. Conclusion

Une famille de quatre dérivés d'azobenzène sans tête polaire a été synthétisée. Comme attendu, ces molécules n'ont pas un effet important sur la tension de surface dû à leur faible amphiphilicité. Aucune valeur de concentration micellaire critique n'a été déterminée, indiquant que les azobenzènes de cette famille s'adsorbent difficilement à une interface hydrophile/hydrophobe. D'une part, le screening contre les champignons s'est révélé positif pour les molécules avec la plus petite queue apolaire. D'autre part, deux de ces composés (**EtAzoOH** et **BuAzoOH**) ont une faible

CMI₅₀ face aux bactéries gram-positives, **HexAzoOH** a une faible CMI₅₀ à la fois contre les bactéries gram-positives et négatives, et enfin la molécule ne possédant pas de queue apolaire présente des CMI₅₀ très élevées. Il apparaît déjà au niveau de l'activité antifongique et antibactérienne une divergence vis-à-vis de la cible des azobenzènes sans tête polaire dans le mécanisme d'action, comme suggéré par des travaux précédents où la cible des composés antibactériens était l'ATP synthase et la cible des composés antifongiques était l'ARN polymérase II pour des hydroxyazobenzènes très proches structurellement^{228,232}. Pour tenter d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme antibactérien de la famille **AzoOH**, des expériences de perméabilisation sur des liposomes modèles mimant la membrane plasmique des bactéries étudiées ont été entreprises. La perméabilisation des liposomes s'est révélée négative pour les **AzoOH** à des faibles rapports azobenzènes/phospholipides mais s'est révélée positive à des rapports azobenzènes/phospholipides élevés. La modélisation de l'interaction avec une bicouche lipidique implicite indique en revanche qu'il serait théoriquement possible que la molécule pénètre la membrane plasmique sans rentrer au cœur de la cellule. Néanmoins, l'énergie d'interaction avec les lipides individuels n'est pas du tout favorable. Ceci permet de suggérer que le mécanisme d'action des molécules n'est pas une perméabilisation totale de la membrane plasmique de la bactérie.

Ainsi, les molécules actives synthétisées présentent des propriétés biologiques intéressantes mais leur mécanisme antibactérien ne semble pas avoir de liens avec la membrane plasmique, ce qui était attendu pour des molécules non-amphiphiles. La prochaine étape de la thèse est de rendre ces molécules affines pour des lipides membranaires bactériens en greffant une tête polaire de type triéthylène glycol sur le groupement hydroxyle libre au niveau cycle aromatique de l'azobenzène.

3

LA FAMILLE DES TRIÉTHYLÈNE GLYCOL MONO(4- ALKYLAZOBENZÈNE) ÉTHER (AzoPEG)

Dans le but d'améliorer les capacités de déstabilisation des membranes cellulaires et de lyser les micro-organismes, la stratégie envisagée dans ce chapitre est de greffer une tête polaire de type triéthylène glycol sur les composés de la famille **AzoOH** pour augmenter leur amphiphilie. De plus, ce type de groupement chimique est bien connu pour ses activités antibactériennes depuis les années 1940²⁵¹. Les groupements polyéthylène glycol de diverses tailles sont des groupements chimiques de choix quand ils sont greffés sur un matériau ou une molécule pour augmenter sa solubilité²⁵²⁻²⁵⁴ ou ses propriétés antibactériennes^{255,256}. Ainsi seront présentées les conditions de réaction en synthèse organique pour effectuer ce greffage, les propriétés physico-chimiques en solution des molécules obtenues, leurs propriétés antibactériennes et antifongiques, leur capacité à perméabiliser des liposomes, et, leur capacité à interagir avec la membrane plasmique par une approche de modélisation. De plus, la variation de taille de la queue apolaire donnera davantage de renseignements quant à les relations structure-activité.

I. Synthèse

Les azobenzènes portant des chaînes polyéthylènes glycol sont connus dans la littérature pour avoir des applications en catalyse micellaire²⁴⁶, pour l'administration de principes actifs de manière ciblée²⁵⁷ ou pour leurs utilisations en tant qu'hydrogel¹⁹⁰. Une tête polaire a été rajoutée en position *para* sur le cycle aromatique de l'azobenzène. Dans le chapitre précédent, il a été montré que cette position était importante pour les activités biologiques, mais notre but ici est d'essayer d'augmenter encore ces activités avec le greffage d'une tête polaire qui augmentera fortement son amphiphilie. Il a été choisi une tête polaire de type triéthylène glycol afin de former des composés **AzoPEG**. En effet, les chaînes de ce type sont largement utilisées dans les détergents et sont connus pour leur capacité à perméabiliser les membranes des cellules eucaryotes^{82,83}. De plus, les chaînes polyéthylènes glycols sont étudiées depuis longtemps pour leurs propriétés antibactériennes en solution et leurs propriétés antiadhésives^{251,258,259}. La synthèse des **AzoPEG** s'est basée sur les travaux de F.Mangin²⁴⁶ (**Figure 56**). La première étape consiste en l'activation d'une fonction alcool primaire du triéthylène glycol avec le chlorure de tosylé. Dans la littérature, il existe une autre procédure utilisant de la soude dans du tétrahydrofurane (THF), néanmoins les temps de réaction sont longs et le rendement n'est que de 28%²⁶⁰. Par la suite, un dérivé **AzoOH** (voir **Chapitre 1**) préalablement synthétisé a été mis en réaction de Williamson avec le triéthylène glycol tosylé. Il est également possible de faire cette réaction de Williamson en utilisant l'acétonitrile comme solvant tout en gardant les mêmes rendements^{227,261}. Il est également possible de faire cette synthèse en condition sans-solvant, mais cette réaction n'est pas sélective et donne uniquement le composé ditosylé correspondant²⁶².

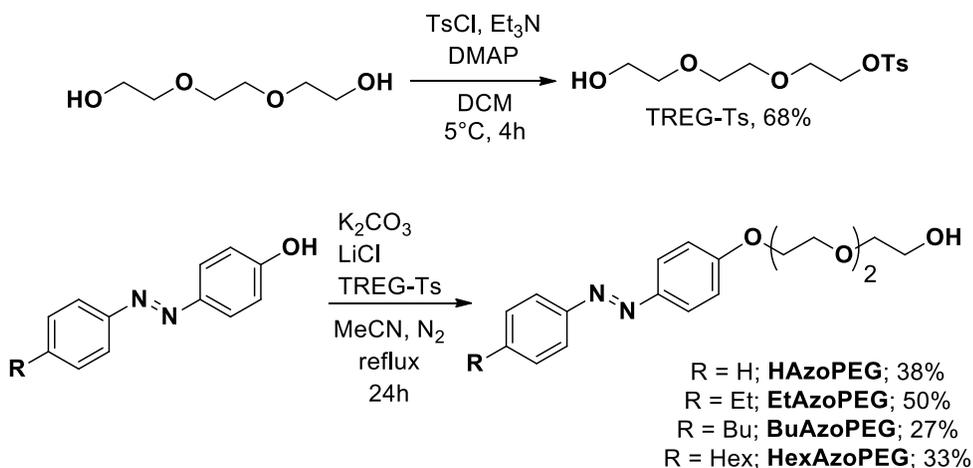


Figure 56 Synthèse des AzoPEG

Le composé TREG-Ts se conserve très mal, car une réaction de substitution sur le OTs peut se produire même à faible température. De fait, la seconde étape étant longue en durée, cela explique les rendements moyens obtenus.

II. Propriétés physico-chimiques

Les composés **AzoPEG** possédant une tête polaire devraient être capables de baisser la tension de surface d'une solution aqueuse contenant la molécule à diverses concentrations, notamment pour les composés avec les plus grandes queues apolaires. Les résultats pour la variation de tension de surface en fonction de la concentration en **AzoPEG** sont représentés dans le **Figure 57**.

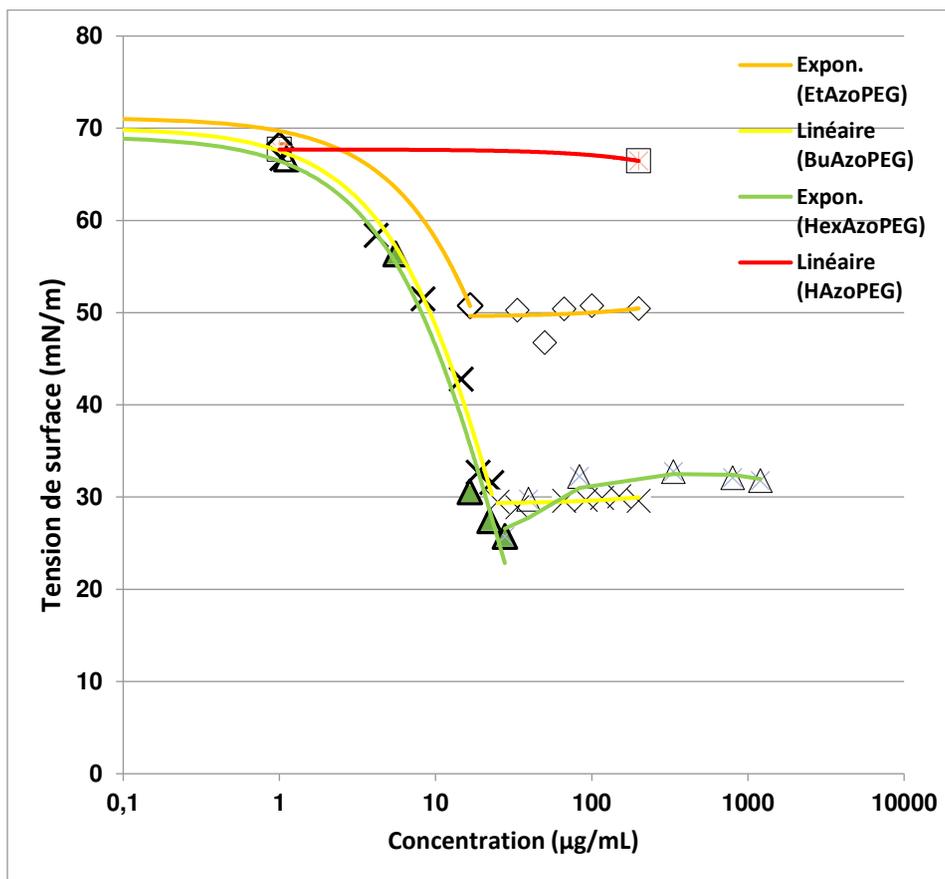


Figure 57 Mesure de la tension de surface en fonction de la concentration en AzoPEG. Les carrés noirs correspondent à HAzoPEG, les losanges gris à EtAzoPEG, les croix grises à BuAzoPEG et les triangles à HexAzoPEG.

Les CMC déterminées avec la rupture de la pente de la tension de surface apparaissent dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 CMC et γ_{CMC} mesurées à 25°C dans l'eau pour la famille AzoPEG

| | HAzoPEG | EtAzoPEG | BuAzoPEG | HexAzoPEG |
|--|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| γ_{CMC} (mN.m ⁻¹) | 0 | 49,6 ± 1,1 | 26,7 ± 4,4 | 29,4 ± 7,4 |
| CMC (µg/mL) | - | 18 ± 1 | 25 ± 4 | 24 ± 7 |
| CMC (µmol/L) | - | 6,4 ± 0,3 | 9,7 ± 1,5 | 9,9 ± 2,9 |

HAzoPEG ne présente pas le profil d'une rupture de pente franche et présente une γ_{CMC} nulle, et ne présentent pas de CMC. De plus, les relatives insolubilités à des concentrations plus élevées excluent le fait que la CMC soit à des concentrations plus élevées.

HAzoPEG n'a donc pas de bonnes propriétés d'adsorption aux interfaces, cela est probablement dû à un caractère amphiphile qui n'est pas assez marqué. Bien qu'**EtAzoPEG** ne parvienne pas à diminuer la tension de surface à une valeur minimale d'une trentaine de mN/m, il présente néanmoins un profil de rupture de pente dans le graphe. Ceci indique que ses propriétés d'adsorption aux interfaces sont relativement modérées. **BuAzoPEG** et **HexAzoPEG** ont un comportement assez similaire au niveau de l'adsorption sur une surface aqueuse, et ont des CMC et des γ_{CMC} relativement proches. L'augmentation de la taille de la chaîne apolaire entraîne une légère augmentation de la CMC, ce qui est contraire à ce qui est communément observé pour les tensioactifs, où l'augmentation de la taille des chaînes apolaires diminue la CMC²⁶³. Ceci est peut-être lié à la relative insolubilité des produits, car on observe l'apparition d'agrégats à des concentrations au-delà de la CMC. L'adsorption à l'interface hydrophile/hydrophobe des composés **BuAzoPEG** et **HexAzoPEG** est énergétiquement favorable, cela indique qu'ils peuvent potentiellement s'incorporer dans la membrane des bactéries.

III. Propriétés antifongiques et antibactériennes

1. Propriétés antifongiques

Le screening de 3 levures (*C.kefyr*, *C.krusei* et *C.tropicalis*) et 3 champignons filamenteux (*A.alternata*, *C.cladosporioides* et *F.solani*) a été réalisé à une concentration de 30 µg/mL. Ces concentrations sont au-dessus de la CMC. Ce screening sur un petit pool de champignons filamenteux et de

levures permettra de mettre en lumière le caractère antifongique de ces composés. L'amphotéricine B, un antifongique interagissant avec la membrane des champignons⁵⁰⁻⁵³, a été testé aussi en tant que témoin positif. Les résultats du screening des levures sont présentés dans le **Figure 58**.

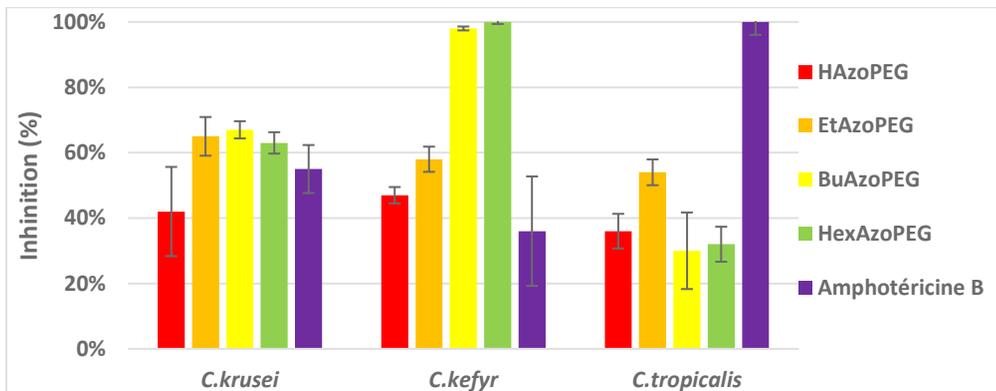


Figure 58 Inhibition de la croissance des 3 levures en fonction de la concentration en AzoPEG

La croissance de *C.krusei* est inhibée à peu près à 50% par tous les **AzoPEG**, de même pour l'amphotéricine B. Pour *C.kefyr* on observe en revanche que sa croissance est inhibée à 100% par **BuAzoPEG** et **HexAzoPEG**. **HAzoPEG** et **EtAzoPEG** inhibent la croissance à 50 et 60% respectivement, ce qui reste meilleur que le témoin positif. La croissance de *C.tropicalis* est inhibée quant à elle uniquement par **EtAzoPEG** au-delà de 50%, ce qui est deux fois moins bien que le témoin. Les autres composés montrent peu d'activité. Pour *C.kefyr*, visiblement plus la queue apolaire est grande plus le composé montrera une grande activité antifongique. Cela va à l'encontre des observations que l'on pouvait faire sur les **AzoOH**.

Les résultats d'inhibitions de la croissance des champignons filamenteux sont indiqués dans le **Figure 59**.

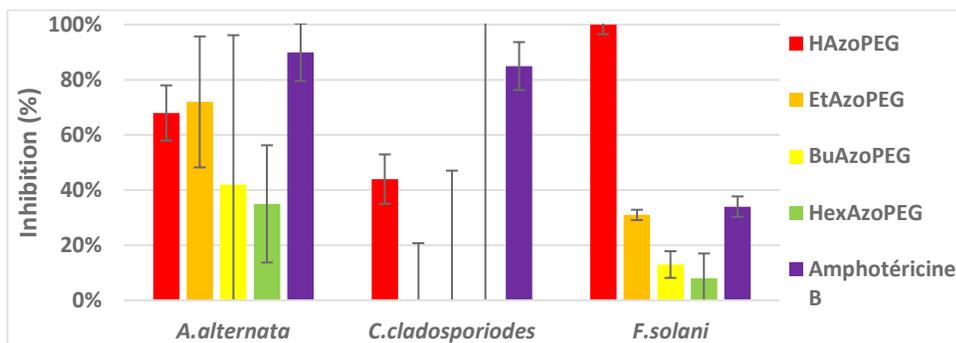


Figure 59 Inhibition de la croissance des 3 champignons filamenteux en fonction de la concentration en AzoPEG

L'inhibition de la croissance d'*A.alternata* se situe entre 40 et 60% pour tous les **AzoPEG** avec une efficacité plus élevée pour les chaînes apolaires courtes, mais les composés sont peu discriminables à cause des écarts-types élevés. Ils ont en revanche significativement moins d'activité que le témoin-positif. La croissance de *C.cladosporiodes* est inhibée à 45% pour **HAzoPEG** mais les autres composés ne semblent pas avoir d'activités, contrairement au témoin-positif qui a inhibé sa croissance à 85%. Pour *F.solani*, **BuAzoPEG** et **HexAzoPEG** n'ont quasiment pas d'activité, **EtAzoPEG** n'inhibe la croissance qu'à 30%, comme l'amphotéricine B. La croissance de ce champignon est en revanche inhibée à 100% par **HAzoPEG**. L'activité antifongique est conditionnée à l'absence de queue apolaire pour *F.solani* et *C.cladosporiodes*. Pour *A.alternata*, les composés avec une queue apolaire sont tous modérément actifs, mais l'inhibition est au-dessus de 50% pour le composé avec les queues les plus courtes. Il semble ainsi que pour les champignons filamenteux, une absence de queue apolaire est à privilégier (*C.cladosporiodes*, *F.solani*), alors que dans le cas des levures, des composés intermédiaires (*C.tropicalis*) ou avec une longue queue apolaire (*C.kefyr*) semblent plus efficaces. Cela pourrait indiquer une différence dans les modes d'action des molécules selon la morphologie fongique.

2. Propriétés antibactériennes

Les composés **AzoPEG** sont donc testés pour leurs propriétés antibactériennes sur *E.coli*, *M.luteus* et *B.subtilis* à des concentrations de 3,75 à 120 µg/mL. Les inhibitions de la croissance d'*E.coli* par les **AzoPEG** sont présentées dans la **Figure 60**.

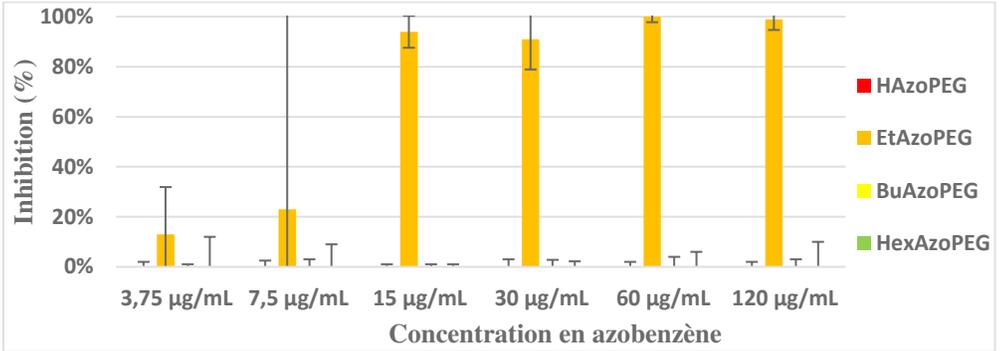


Figure 60 Inhibition de la croissance de *E.coli* en fonction de la concentration en AzoPEG

La croissance de cette bactérie n'est inhibée que par **EtAzoPEG**. Sa croissance est inhibée à plus de 90% jusque 15 µg/mL. En deçà de cette concentration, l'activité biologique est quasiment entièrement perdue. **HAzoPEG**, **BuAzoPEG** et **HexAzoPEG** n'ont aucun impact sur la croissance d'*E.coli*. Tous les composés **AzoPEG** n'ont aucune action sur le temps de latence ou sur la phase exponentielle de manière générale, à part dans les cas d'inhibition totale de la croissance d'*E.coli*, où la bactérie ne se développe pas du tout. (Cinétiques de croissance non-montrées). Il y a probablement une spécificité du composé **EtAzoPEG** car c'est un composé intermédiaire au niveau de la taille de la queue apolaire dans la famille des **AzoPEG**. Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *M.luteus* sont indiqués dans la **Figure 61**.

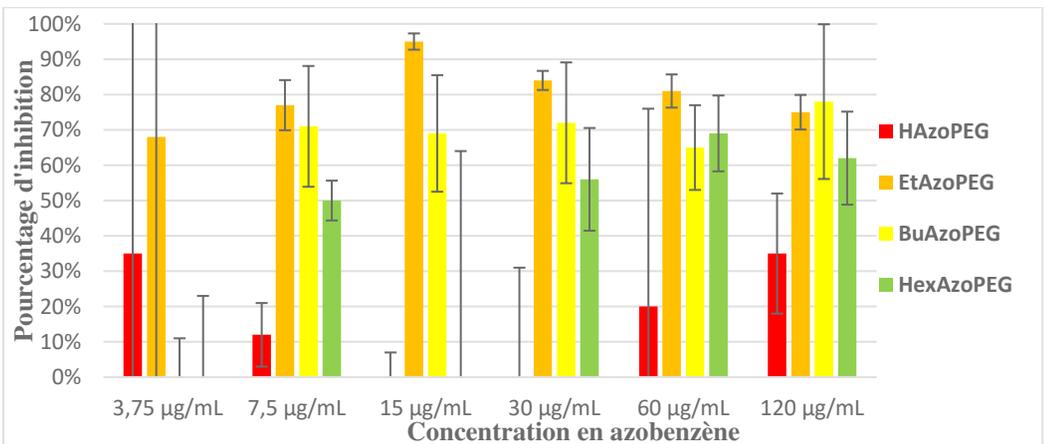


Figure 61 Inhibition de la croissance de *M.luteus* en fonction de la concentration en AzoPEG

L'inhibition exercée par **HexAzoPEG** est assez faible, avec une CMI_{50} de $30\mu\text{g/mL}$. L'inhibition exercée par **BuAzoPEG** est comparable en intensité que celle exercée par **EtAzoPEG**. L'inhibition de la croissance de *M.luteus* est presque nulle avec le composé **HAzoPEG**. En revanche, **EtAzoPEG** est la molécule qui inhibe le plus la croissance de la bactérie à partir de $7,5\mu\text{g/mL}$, avec une inhibition à plus de 70% à cette concentration. L'inhibition de la croissance de *M.luteus* pour les trois plus fortes concentrations d'**EtAzoPEG** est montrée par les cinétiques de croissance dans le **Figure 62**.

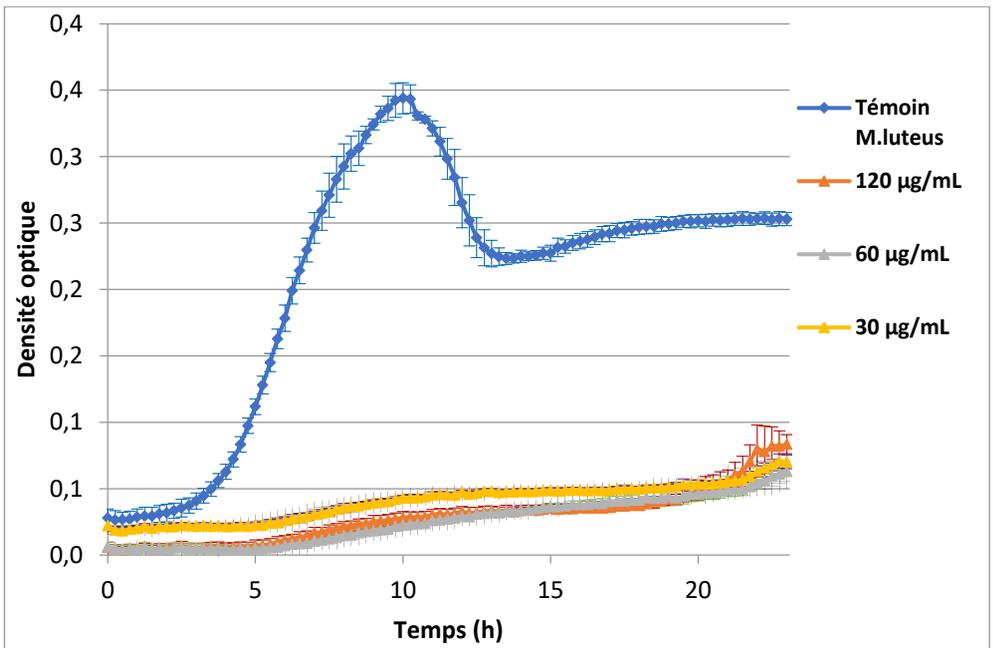


Figure 62 Evolution de la croissance de *M.luteus* en présence d'**EtAzoPEG**

Le temps de latence pour les expériences avec différentes concentrations d'**EtAzoPEG** est le même (aux alentours de 5h) pour toutes les concentrations où ce composé présente une activité alors que pour le témoin on est à 3,5 h. De plus, les bactéries n'atteignent pas de phases exponentielles lorsqu'elles sont en présence de ce composé, alors qu'elles ont un taux de croissance moyen de 0,08 (pour le témoin). Ce profil d'inhibition est généralisable à toute la famille des **AzoPEG** pour *M.luteus*.

En bref, la famille **AzoPEG** inhibe assez fortement la croissance de *M.luteus*. **EtAzoPEG** est le composé le plus actif à faible concentration. L'absence de chaîne apolaire semble être un problème puisqu'**HAzoPEG** n'a quasiment aucune activité. Les résultats de l'inhibition de la croissance de *B.subtilis* par les **AzoPEG** sont indiqués dans le **Figure 63**.

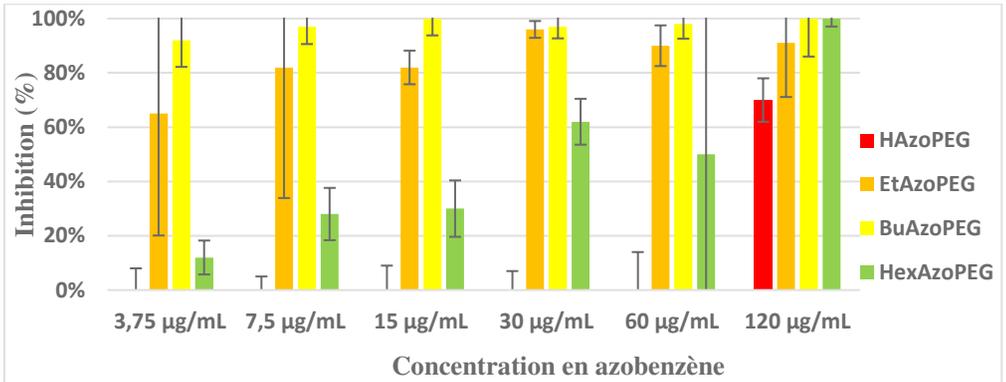


Figure 63 Inhibition de la croissance de *B.subtilis* en fonction de la concentration en **AzoPEG**

L'inhibition de la croissance de *B.subtilis* pour la concentration de 120 µg/mL suit un ordre décroissant avec la taille de la queue apolaire, à savoir que la plus forte inhibition est exercée par **HexAzoPEG**, puis par **BuAzoPEG**, **EtAzoPEG** et enfin **HAzoPEG**. En revanche, à partir de 60 µg/mL, **HAzoPEG** perd toute activité dès que la concentration diminue. **BuAzoPEG** inhibe à hauteur de 90% *B.subtilis* même aux concentrations les plus faibles. **EtAzoPEG** garde une activité jusqu'à la plus faible concentration mais celle-ci est difficile à qualifier à cause des écarts-types. **HexAzoPEG** inhibe la croissance de la bactérie à moins de 50% à partir de 15 µg/mL mais impacte déjà les paramètres cinétiques à des concentrations inférieures. Les valeurs de taux de croissance μ et du temps de latence dans le **Figure 62** ainsi que la cinétique de croissance de *B.subtilis* par les trois concentrations les plus faibles sont présentées dans le **Figure 64**.

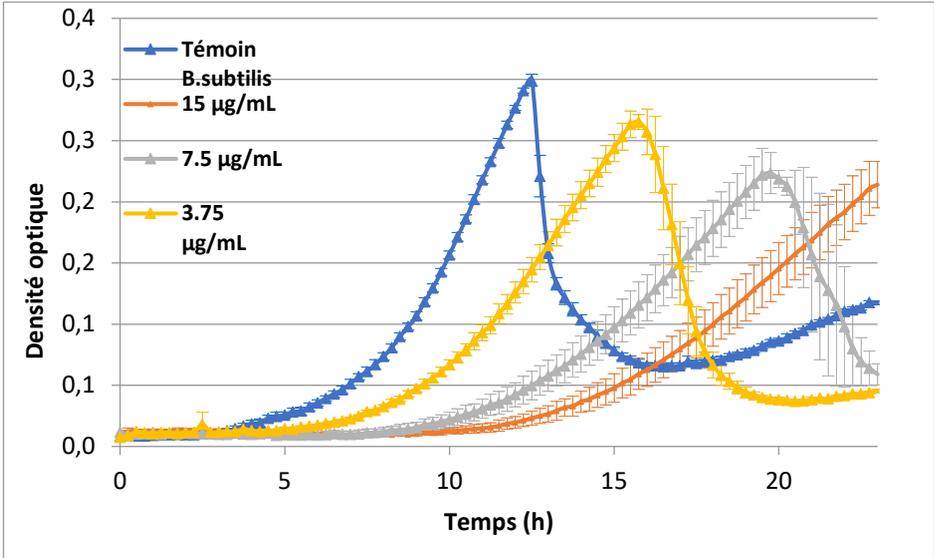


Figure 64 Evolution de la croissance de *B.subtilis* en présence d'HexAzoPEG

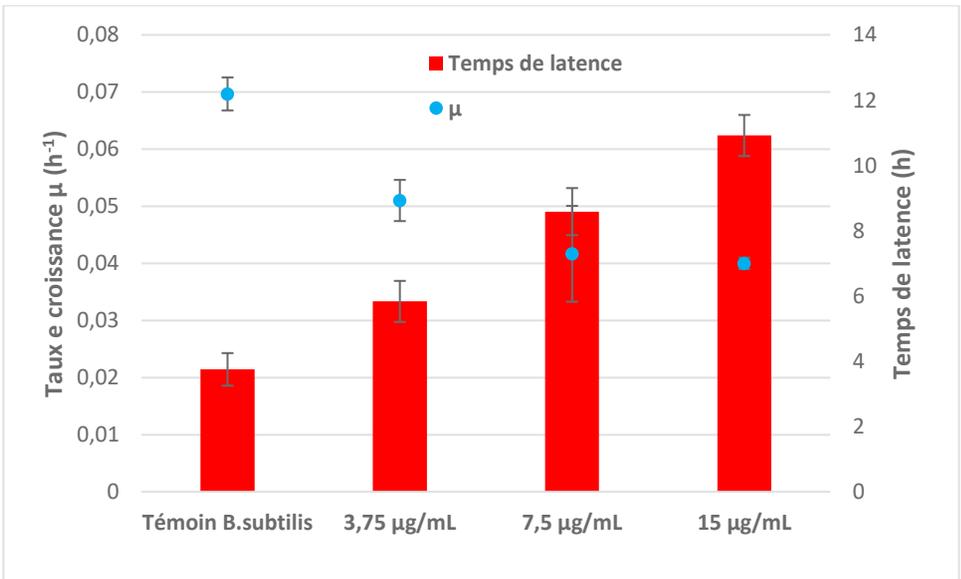


Figure 65 Temps de latence et taux de croissance de *B.subtilis* en fonction de la concentration en HexAzoPEG

L'observation d'une action dose-dépendante d'HexAzoPEG est flagrante dans la **Figure 65** avec une action à la fois au niveau de la pente des phases exponentielles et à la fois au niveau du délai précédant leur début. C'est

également visible au niveau de la **Figure 63** à travers la baisse continue de la valeur du taux de croissance et de la hausse du temps de latence en fonction de la concentration. Dans la cinétique de croissance de *B.subtilis* avec $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'**HexAzoPEG**, la phase exponentielle de croissance n'a même pas atteint son terme au bout de 24h.

De manière plus générale, les composés intermédiaires de la famille des **AzoPEG**, **EtAzoPEG** et **BuAzoPEG**, sont encore une fois les composés présentant les plus grands pourcentages d'inhibition sur 24h comme dans le cas d'*E.coli* et *M.luteus*. **HAzoPEG** et **HexAzoPEG** sont les composés les moins efficaces. Une trop longue queue apolaire ou que l'absence de cette queue apolaire réduit beaucoup l'activité des **AzoPEG**. Les CMI_{50} sont présentés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 CMI_{50} déterminés pour les différents dérivés d'AzoPEG

| CMI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | HAzoPEG | EtAzoPEG | BuAzoPEG | HexAzoPEG |
|---|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| <i>E.coli</i> | >120 | 15 | >120 | >120 |
| <i>M.luteus</i> | >120 | 7,5 | 7,5 | 7,5 |
| <i>B.subtilis</i> | 120 | 7,5 | 3,75 | 30 |

De manière générale, l'inhibition de la croissance bactérienne par les molécules de la famille **AzoPEG** suit la même tendance pour les différentes souches testées. Il apparaît qu'en présence d'une tête polaire de type triéthylène glycol, les azobenzènes ont besoin d'une taille de queue apolaire intermédiaire pour être actifs biologiquement avec notamment le cas particulier d'**EtAzoPEG** qui est le seul composé à pouvoir inhiber la croissance d'*E.coli*. L'absence de cette queue apolaire rend la molécule quasi inactive, et une taille de queue trop longue semble réduire son activité biologique de manière significative. Il est difficile de discriminer **EtAzoPEG** et **BuAzoPEG** dans le cas des bactéries gram-positives, leurs CMI_{50} étant assez proches.

IV. Perméabilisation des liposomes

Le pouvoir perméabilisant des molécules **AzoPEG** est évalué en utilisant des liposomes biomimétiques de bactéries dont les proportions en lipides membranaires (PE, PG, CL et DGDG) sont les plus proches des compositions que l'on peut trouver dans la littérature^{38,122}. Les résultats de la perméabilisation des liposomes mimant la composition membranaire d'*E.coli* sont présentés à la **Figure 66**.

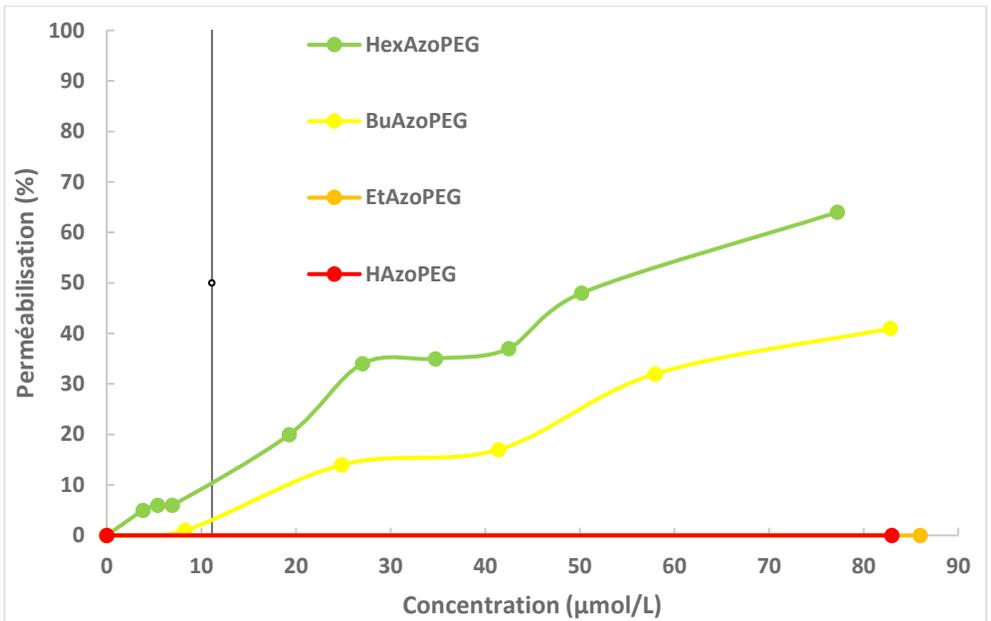


Figure 66 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne d'*E.coli* en fonction de la concentration en AzoPEG. Les liposomes sont constitués d'un mélange PE/PG/CL (70/25/5). La concentration en phospholipides est de $11,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La barre verticale noire correspond à la concentration à laquelle on atteint un rapport azobenzène/phospholipides de 1.

Les liposomes sont perméabilisés à 5% par **HexAzoPEG** pour des rapports azobenzène/lipide de 0,5. Elle est nulle pour les trois autres **AzoPEG**. Pour les concentrations les plus élevées, **HexAzoPEG** parvient à perméabiliser les liposomes à hauteur de 60% à $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$, **BuAzoPEG** à hauteur de 40% pour cette même concentration, mais les deux autres composés ne sont pas capables de perméabiliser les liposomes. Ainsi, plus la queue apolaire est longue, plus la capacité de perméabilisation est grande. Le seul composé à être actif sur *E.coli* étant **EtAzoPEG**, nous pourrions nous attendre à ce que seul ce dernier perméabilise les liposomes si le mécanisme d'action de la molécule était lié à une perméabilisation de la membrane interne. Il n'existe pas de corrélation directe entre les résultats de perméabilisation et les activités contre *E.coli*. Cela suggère que le mécanisme d'action de ces molécules ne concerne pas spécifiquement la membrane plasmique.

La **Figure 67** présente les données de perméabilisation des liposomes mimant la composition de *M.luteus*.

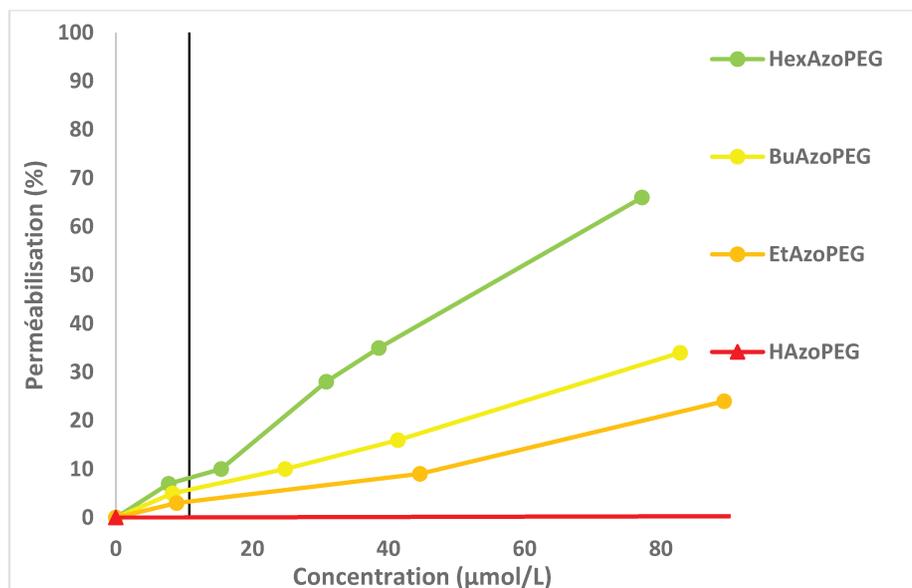


Figure 67 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de *M.luteus* en fonction de la concentration en AzoPEG. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/DMDG/CL (63/32/5). La concentration en phospholipides est de $10,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La barre verticale noire correspond à la concentration à laquelle on atteint un rapport azobenzène/phospholipides de 1.

Les liposomes sont perméabilisés entre 3 et 10% pour des rapports azobenzène/liposomes inférieurs à 1 pour **EtAzoPEG**, **BuAzoPEG** et **HexAzoPEG**. **HAzoPEG** n'a pas d'effet à ces concentrations, ni aux concentrations les plus hautes. Pour ces concentrations, **HexAzoPEG** perméabilise les liposomes à hauteur de 65% à $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$, **BuAzoPEG** à hauteur de 35% à $85 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et **EtAzoPEG** à hauteur de 25% à $90 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Par conséquent, une queue apolaire plus longue favorise le pouvoir perméabilisant. Cette activité de perméabilisation n'est pas corrélée aux activités biologiques pour lesquelles les composés de chaîne intermédiaire sont les plus efficaces. Le mécanisme de l'action antibactérienne de ces molécules ne semble donc pas lié à une perméabilisation de la membrane interne.

La perméabilisation des liposomes dont la composition mime celle de la membrane plasmique de *B.subtilis* est nulle pour tous les composés **AzoPEG** et aux deux concentrations considérées (**Tableau 7**).

Tableau 7 Perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de *B.subtilis* par les différentes molécules de la famille AzoPEG à différentes concentrations. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/PE/CL (81/14/5). La concentration en phospholipides est de 30,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

| | H AzoPEG | Et AzoPEG | Bu AzoPEG | Hex AzoPEG |
|--|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Perméabilisation à un rapport azobenzène/phospholipide de 0,75 | 0% | 0% | 0% | 0% |
| Perméabilisation à un rapport azobenzène/phospholipide de 12 | 0% | 0% | 0% | 0% |

Il n'y a donc aucune corrélation avec les tests antibactériens sur la souche *B.subtilis* dans lesquels une bonne activité était présente pour les composés à chaînes intermédiaires. Cela signifie que le mécanisme de l'action antibactérienne de ces molécules n'est pas régi par des interactions avec la membrane plasmique.

En conclusion de cette partie, on voit qu'il existe peu de corrélations entre les activités biologiques et le potentiel de perméabilisation des liposomes biomimétiques.

V. Modélisation de l'insertion dans une bicouche lipidique

La procédure IMPALA a été appliquée afin d'évaluer les capacités d'insertion de la molécule au sein d'une bicouche phospholipidique⁶. La contrainte énergétique totale de la molécule en fonction de la position du centre de masse de la molécule dans la bicouche est représentée à la **Figure 68**.

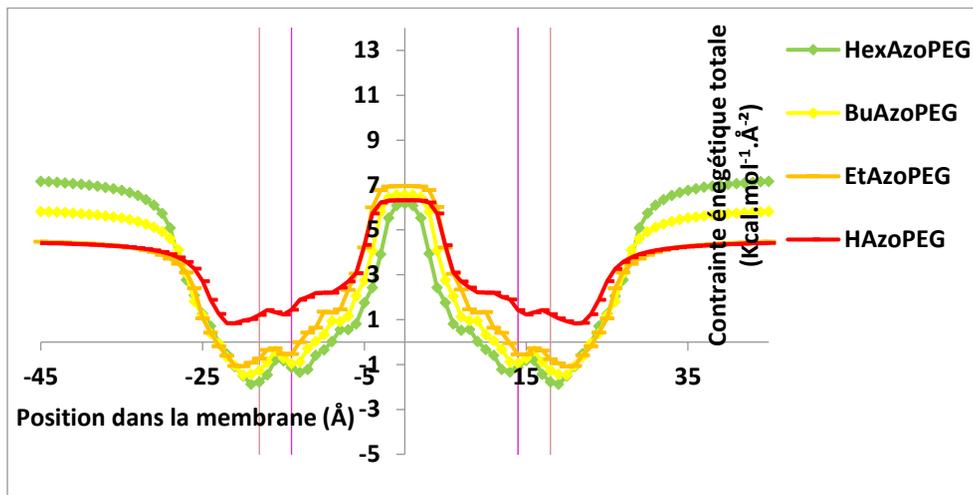


Figure 68 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule d'AzoPEG en fonction de la position de son centre de masse dans une membrane implicite selon le modèle IMPALA. La ligne marron verticale à -18\AA et $+18\text{\AA}$ correspond à la limite entre le milieu aqueux et la partie polaire de la bicouche. La ligne violette verticale à $-13,5\text{\AA}$ et $+13,5\text{\AA}$ correspond à la limite entre les têtes polaires et cœur hydrophobe de la bicouche implicite. La ligne verticale noire correspond centre de la bicouche.

EtAzoPEG se trouve dans le milieu aqueux à la même contrainte énergétique initiale qu'**HAzoPEG** ($4,4\text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$). **BuAzoPEG** se trouve à $5,82\text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$ et **HexAzoPEG** à $7,17\text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$. **HAzoPEG** a un profil énergétique singulier puisque sa contrainte énergétique reste toujours positive quelle que soit sa position dans la membrane et il ne possède pas de minimum énergétique. Ainsi, il est peu probable que ce composé s'adsorbe à l'interface d'une membrane. Les profils d'**EtAzoPEG**, **BuAzoPEG** et **HexAzoPEG**, quant à eux, sont comparables ; Ils descendent en négatif et possèdent deux minima énergétiques, l'un au niveau de l'interface milieu aqueux/partie polaire de la bicouche et l'autre au niveau de l'interface partie polaire/partie apolaire de la bicouche. La différence en énergie d'interaction avec leur niveau initial est telle qu'ils sont plus susceptibles de pénétrer au sein de la bicouche ($-1,05$ et $-0,53$ pour **EtAzoPEG**, $-1,47$ et $-0,94$ pour **BuAzoPEG** et $-1,87$ et $-1,34$ pour **HexAzoPEG**). De manière commune à tous les **AzoPEG**, il y a au cœur de la partie apolaire de la bicouche un pic énergétique situé entre $6,2$ et $6,9\text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$. Ceci indique que les molécules d'**AzoPEG** sont peu susceptibles de pénétrer au cœur de cette bicouche.

En résumé dès deux atomes de carbone dans leur chaîne apolaire, les composés **AzoPEG** ont tendance à s'insérer dans une bicouche lipidique. Ces résultats ne sont pas corrélés aux activités antibactériennes des **AzoPEG** qui montrent une efficacité accrue des composés **EtAzoPEG** et **BuAzoPEG**.

VI. Modélisation des interactions avec les lipides membranaires

La méthode de docking Hypermatrix a été utilisée pour étudier la spécificité d'interaction avec les lipides membranaires bactériens ainsi que pour avoir une description atomique de l'interaction entre les molécules **AzoPEG** et les lipides. Les différences entre les énergies d'interaction des **AzoPEG** avec les lipides bactériens par rapport aux énergies d'interaction que les **AzoPEG** peuvent avoir avec eux-mêmes sont affichées dans la **Figure 69**⁷.

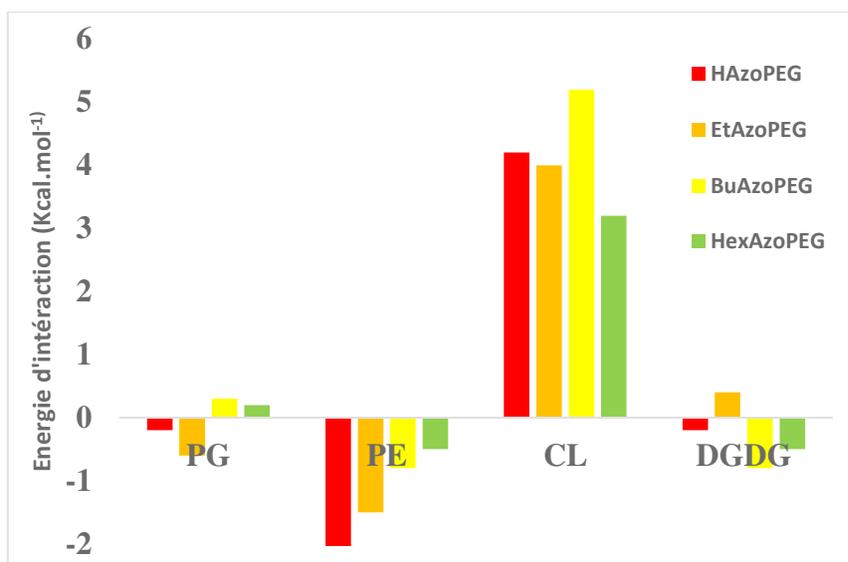


Figure 69 Différences entre les énergies d'interaction des **AzoPEG** avec les lipides bactériens par rapport aux énergies d'interactions avec eux-mêmes dans un assemblage multimoléculaire calculé par la méthode de docking Hypermatrix. PG correspond au phosphatidylglycérol, PE correspond au phosphatidyléthanolamine, CL correspond à la cardiolipine, DGDG correspond au digalactosyldiacylglycérol.

Les énergies d'interaction entre PG, DGDG, CL et les **AzoPEG** sont très faiblement négatives ou positives, ce qui indique qu'il est peu probable qu'ils interagissent ensemble. Pour le cas de PE, on peut voir que c'est très faible, mais que les interactions sont favorables énergétiquement. Cela tend également à indiquer que nos molécules auraient de meilleures activités sur *E.coli*, ce qui n'est pas le cas ici.

VII. Conclusion

La famille des **AzoPEG** a été entièrement synthétisée avec des rendements globaux de 22 à 34%. Les composés possédant une queue apolaire de cette famille ont réussi à abaisser la tension superficielle de l'eau. Seul **HAzoPEG** n'a pas réussi à abaisser suffisamment la tension superficielle dans l'eau de manière à ce qu'on puisse déterminer une CMC. Les **AzoPEG** sont actifs chacun de manière très différente sur les 6 champignons testés si bien qu'il est difficile de conclure de manière globale, mais la tendance d'une meilleure activité en absence de chaîne apolaire ou en présence d'une chaîne courte semble se confirmer pour les filamenteux, tandis qu'une chaîne intermédiaire à longue semble plus efficace sur les levures testées. Seul **EtAzoPEG** a une activité antibactérienne à la fois sur les bactéries gram-positives et gram-négatives, **BuAzoPEG** possède de faibles CMI_{50} sur les bactéries gram-positives, **HexAzoPEG** a une activité plus modérée sur ces souches vues que les CMI_{50} sont plus élevées. Seul **HAzoPEG** s'est montré presque inactif sur les bactéries. L'activité antibactérienne de cette famille semble ainsi présenter un optimum pour une longueur de chaîne apolaire intermédiaire. Les expériences de perméabilisations de liposomes et de la modélisation avec IMPALA ne montrent pas de différences notables entre les différents **AzoPEG**. Ceci n'est pas en accord avec les conclusions de nos tests microbiologiques sur les bactéries. Cela semble indiquer que les activités biologiques ne peuvent pas seulement s'expliquer par des interactions avec la membrane cytoplasmique des bactéries. De plus, le docking sur Hypermatrix confirme les faibles potentiels d'interaction entre les lipides membranaires bactériens et les **AzoPEG**.

En conclusion, le fait d'avoir rendu nos azobenzènes amphiphiles par l'ajout de chaînes triéthylène glycol a diminué leurs activités biologiques. Bien que l'interaction de ces composés avec des membranes biomimétiques soient possibles, ce n'est pas cette propriété qui explique leur mécanisme d'action. Notre objectif étant de développer des molécules antimicrobiennes déstabilisant les membranes plasmiques, une autre famille d'azobenzènes a été envisagée. Dans le chapitre suivant, la stratégie de greffer une nouvelle tête polaire cationique sur ces azobenzènes afin d'essayer de les rendre capable d'interagir avec la membrane phospholipidique des micro-organismes et ainsi, augmenter leurs propriétés antibactériennes et antifongiques est envisagée.

**LA FAMILLE DES IODURE DE 4-
ALKYL-4'-(2-N-N-N-
TRIMÉTHYLAMINIOETHOXY)
AZOBENZÈNE (AzoTAI)**

Le greffage d'une tête polaire de type triéthylène glycol sur les **AzoOH** n'ayant pas permis d'obtenir une meilleure activité sur les membranes plasmiques des micro-organismes, une tête polaire de type ammonium quaternaire sera greffée sur notre molécule plate-forme **AzoOH**. Cette tête polaire est réputée pour ses propriétés antiseptiques et serait un bon agent pour la lyse des micro-organismes^{75,264}. De plus, la nature cationique du composé renforcera encore plus son amphiphilicité et ainsi, augmentera encore plus ses possibilités d'interaction avec la membrane plasmique des bactéries⁷⁸.

I. Synthèse

Les azobenzènes comportant une tête polaire de type ammonium ont déjà été étudiés en tant qu'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase²⁶⁵, ou en tant que surfactant redox^{266,267}. Toutefois, notre cible reste la membrane plasmique des micro-organismes. En gardant comme objectif d'augmenter les activités biologiques des azobenzènes, le choix a été fait de greffer une tête polaire cationique sur les **AzoOH**. (**Figure 70**). Les ammoniums quaternaires sont des fonctions chimiques utilisés depuis 80 ans dans la synthèse d'antiseptiques^{75,264}.

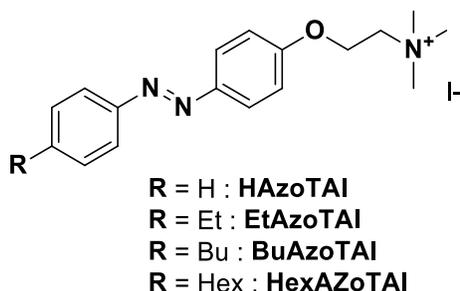


Figure 70 Structure de la famille **AzoTAI**

Un bras espaceur entre l'ammonium quaternaire et l'azobenzène mesurant deux carbones a été choisi afin de bien créer une nette séparation entre la partie polaire et apolaire de la molécule. Le contre-ion est un iodure, provenant du iodométhane utilisé lors de la dernière étape de synthèse. Cet ion a été choisi pour deux raisons : la grande réactivité du iodométhane pour augmenter le rendement, ainsi que les propriétés antibactériennes de l'ion iodure, utilisé depuis longtemps dans les protocoles médicaux, notamment opératoire^{268,269}. Dans la littérature, Salta *et al.* ont choisi de partir d'un méthyl 4-aminobenzoate pour faire une réaction de Mills avec une 4-alkylaniline. Ils déprotègent l'ester de l'azobenzène obtenu avec de la lithine

dans un mélange THF/méthanol. Ils réduisent l'acide carboxylique avec du LiAlH_4 . Ils font ensuite une substitution nucléophile de l'hydroxyde par un brome. Enfin, ils font une dernière substitution nucléophile avec la triméthylamine pour former l'ammonium correspondant. Leur réaction comporte plus d'étapes que la nôtre mais elle présente l'avantage de ne pas présenter d'intermédiaire de réactions instables comme notre synthèse avec les tosylates. Dans notre cas, il n'aurait peut-être pas été possible de quaternariser l'amine via cette procédure car il aurait fallu introduire un groupement iode au lieu d'un groupement bromure²²⁶. La synthèse de leurs azobenzènes cationiques est représentée dans la **Figure 71**.

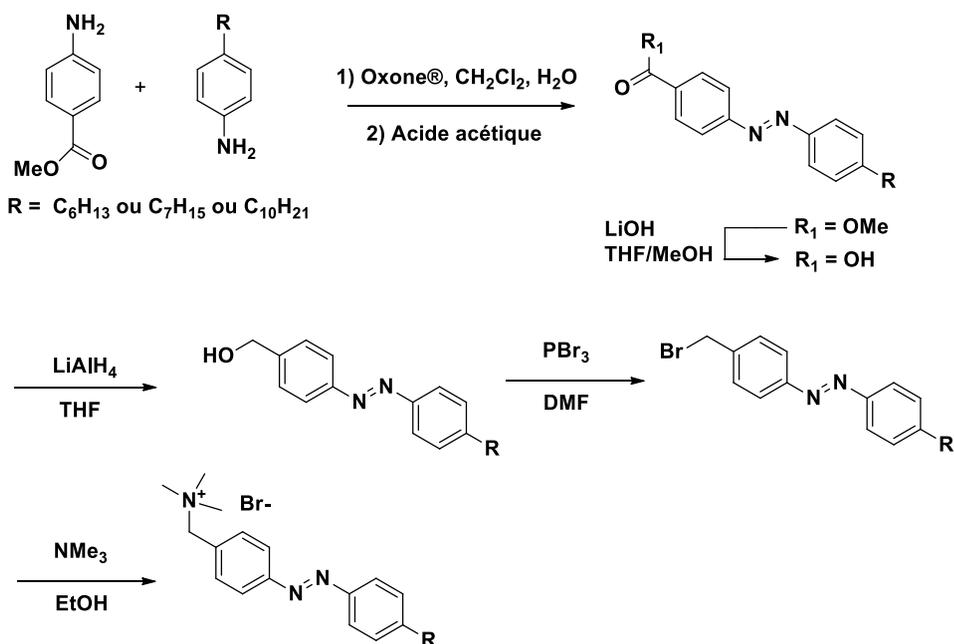


Figure 71 Synthèse d'azobenzènes cationiques selon Salta *et al*²²⁶.

Un autre groupe travaillant sur la photocontrôle de l'activité de cellules nerveuses en utilisant un dérivé de la choline comprenant un azobenzène a déjà synthétisé le composé **HAzoTAI**. Ils partent également d'un hydroxyazobenzène, ils font une substitution nucléophile en utilisant l'hydrochlorure de 2-chloro-*N,N*-diméthyléthylamine dans le diméthylformamide (DMF). La dernière étape est la quaternarisation de l'amine en utilisant l'iodométhane dans le THF. Leur synthèse est plus économe que la notre en termes d'étapes de synthèse (2 au lieu de 3). De plus les rendements sont très bons et ils n'utilisent pas de réactifs particulièrement

plus toxiques, plus chers ou plus dangereux. Néanmoins, cette stratégie de synthèse n'a pas été suivie par soucis de disponibilité des réactifs, car tous les réactifs étaient déjà disponibles au laboratoire pour cette synthèse (au moins pour la synthèse de **BuAzoTAI**). Ce schéma de synthèse aurait dû être repris pour **HAzoTAI** et même envisager de l'adapter également pour la synthèse d'**EtAzoTAI**. Au minimum, la dernière étape de synthèse dans le tétrahydrofurane (THF) aurait pu être tentée au lieu de l'éther éthylique pour constater les rendements qui auraient pu être améliorés²⁶⁵. Leur synthèse de **HAzoTAI** est donnée dans la **Figure 72**.

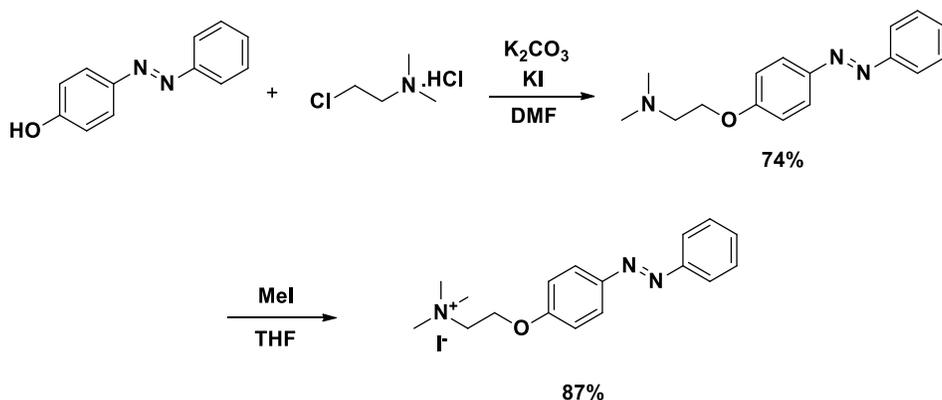


Figure 72 Synthèse de l'**HAzoTAI** selon Damijonaitis *et al*²⁶⁵.

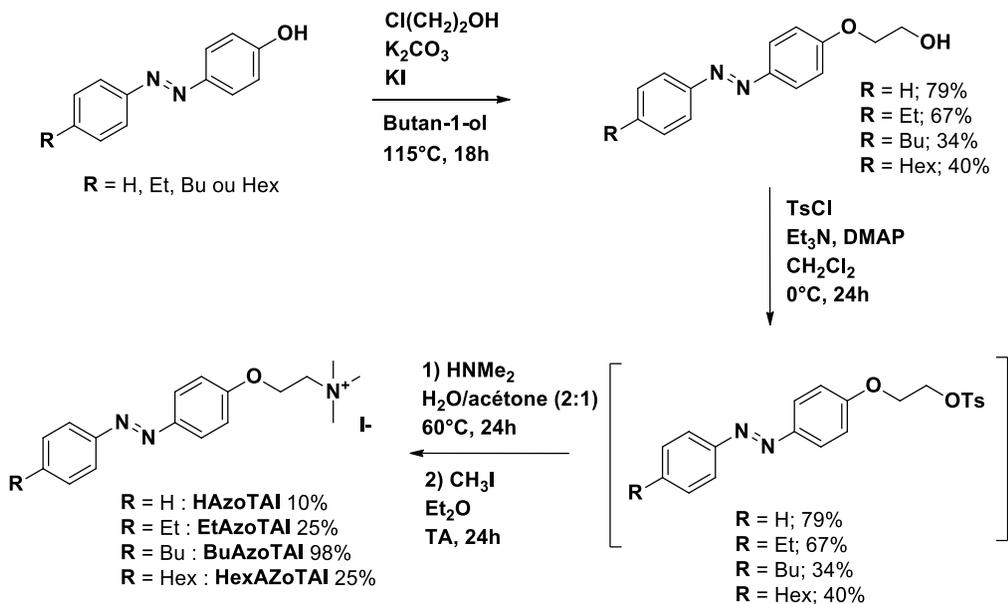


Figure 73 Synthèse de la famille AzoTAI

La stratégie de synthèse présentée dans la thèse de F. Mangin, doctorante précédente au sein de TIMR, a été la base du travail de synthèse organique de cette thèse²⁴⁶. La première étape est une réaction de Williamson. Nous avons procédé ensuite à une activation de la fonction alcool primaire libre par un groupement tosylé. Le brut est ensuite mis en réaction avec une substitution nucléophile par la diméthylamine. La dernière étape est une quaternarisation de l'amine par l'iodométhane (**Figure 73**). Le composé tosylé n'a pas été isolé car ce dernier se dégradait très rapidement, même à basse température. La synthèse étant optimisée pour le **BuAzoTAI**, on observe donc de grandes variations au niveau des rendements des 3 dernières étapes.

II. Propriétés physico-chimiques

Les mesures de la tension de surface en fonction de la concentration en **AzoTAI** sont présentées dans la **Figure 74**.

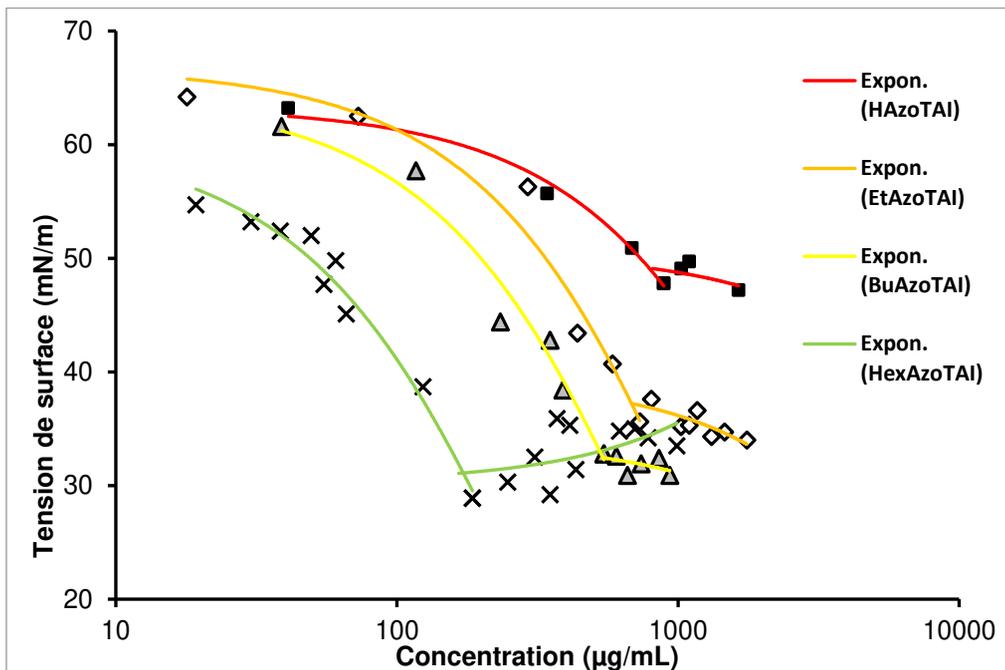


Figure 74 Mesure de la tension de surface en fonction de la concentration en AzoTAI. Les carrés noirs correspondent à HAzoTAI, les losanges blancs à EtAzoTAI, les triangles gris à BuAzoTAI et les croix à HexAzoTAI.

Les CMC et γ_{CMC} correspondant à ces mesures sont dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 CMC et γ_{CMC} mesurées pour AzoTAI à 25°C dans l'eau

| | HAzoTAI | EtAzoTAI | BuAzoTAI | HexAzoTAI |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| γ_{CMC} (mN.m ⁻¹) | 49.2 ± 4.6 | 36.7 ± 6.9 | 32.4 ± 5.1 | 31.1 ± 4.1 |
| CMC (µmol/L) | 1815 ± 10 | 1553 ± 16 | 1205 ± 10 | 345 ± 8 |
| CMC (µg/mL) | 746 ± 4 | 682 ± 7 | 563 ± 5 | 171 ± 4 |

Le composé **HAzoTAI**, n'ayant pas de queue apolaire, abaisse la tension superficielle de l'eau de manière très faible. Le composé présente tout de même une rupture de pente, mais il possède la CMC la plus élevée. Les trois autres **AzoTAI** ont des γ_{CMC} proches et beaucoup plus faible que celle de **HAzoTAI**. En effet, le caractère cationique du composé permet aux **AzoTAI**

d'être fortement amphiphile. Ces molécules ayant montré qu'elles peuvent s'adsorber dans une interface hydrophile/hydrophobe, ceci indique qu'il sera favorable pour ces molécules de s'insérer dans la membrane d'une bactérie ou d'un champignon.

III. Propriétés biologiques

1. Propriétés antifongiques

Dans le but de détecter des composés antifongiques dans la famille des **AzoTAI**, nous avons réalisé un screening à la concentration de $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sur 3 champignons filamenteux (*A.alternata*, *C.cladosporioides* et *F.solani*) et 3 levures (*C.tropicalis*, *C.krusei* et *C.kefyr*). En tant que témoin positif, nous avons utilisé l'amphotéricine B⁵⁰⁻⁵². Les résultats du screening des levures sont présentés dans la **Figure 75**. Le composé **HAzoTAI** n'a pas été testé car les résultats d'un screening préliminaire ont montré des activités antifongiques extrêmement faibles.

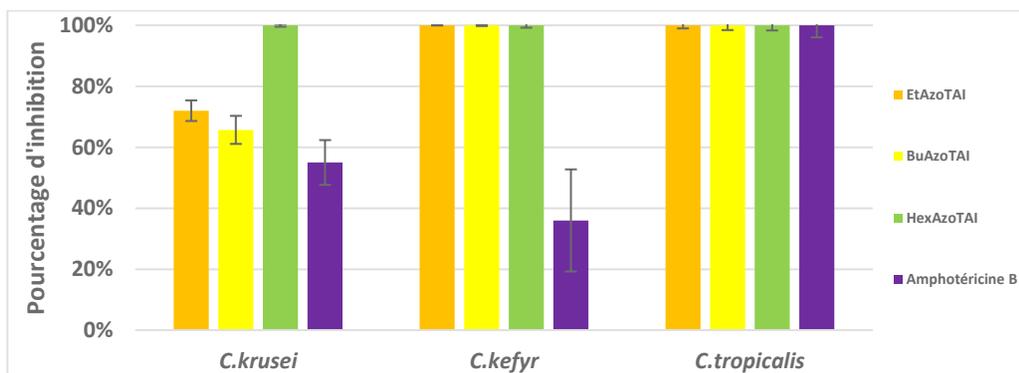


Figure 75 Inhibition de la croissance des levures en présence des **AzoTAI** à $30 \mu\text{g}/\text{mL}$

C.krusei voit sa croissance inhibée à 100% par **HexAzoTAI**. Sa croissance est inhibée aux alentours de 70% par **BuAzoTAI** et **EtAzoTAI**, dans des proportions comparables à l'amphotéricine B. Dans le cas de *C.kefyr*, les trois composés inhibent sa croissance à 100%, ce qui est mieux que le témoin positif. Enfin, pour *C.tropicalis*, 100% d'inhibition est observé pour les trois **AzoTAI** ainsi que par le témoin positif. La tête polaire ammonium augmente grandement l'efficacité antifongique des composés aux queues apolaires longues. Les résultats du screening pour les champignons filamenteux sont présentés dans la **Figure 76**. **HAzoTAI** n'a pas été testé.

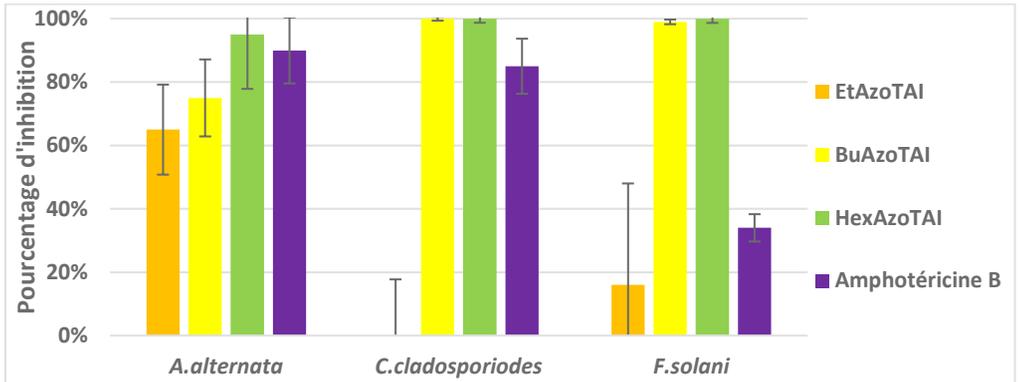


Figure 76 Inhibition de la croissance des champignons filamenteux en présence des AzoTAI à 30µg/mL

La croissance d'*A.alternata* est inhibée à 90% par **HexAzoTAI**, c'est la seule molécule qui entraîne une plus forte inhibition que le témoin positif. Elle n'est que de 75 et 65% pour **BuAzoTAI** et **EtAzoTAI** respectivement. Pour *C.cladosporiodes*, **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** inhibent sa croissance à 100%, c'est plus que l'amphotéricine B, **EtAzoTAI** n'a aucune activité. Ces résultats sont semblables pour *F.solani*, la seule différence c'est que le témoin positif n'a inhibé la croissance de ce champignon qu'à hauteur de 35%, ce qui pourrait montrer un intérêt de nos molécules par rapport à leur spectre d'activité. De la même manière qu'avec les levures, on peut voir que l'augmentation de taille de la queue apolaire augmente l'activité antifongique de la famille **AzoTAI**. Au vu des grandes activités de ces composés sur les 3 levures et les 3 champignons filamenteux, l'inhibition de la croissance des champignons a été menée plus en profondeur afin de déterminer la CMI₅₀ de **BuAzoTAI**, **HexAzoTAI**, les deux composés ayant montré les plus grandes capacités antifongiques, au lieu de faire un simple screening à une concentration fixe. La CMI₅₀ de l'amphotéricine B sera elle aussi déterminée suivant le même protocole expérimental. Les concentrations 1 et 2 µg.mL⁻¹ n'ont pas été testées pour **BuAzoTAI** au vu des résultats pour les concentrations supérieures. L'inhibition de la croissance de *C.krusei* par la gamme de concentration de ces composés est montrée dans la **Figure 77**.

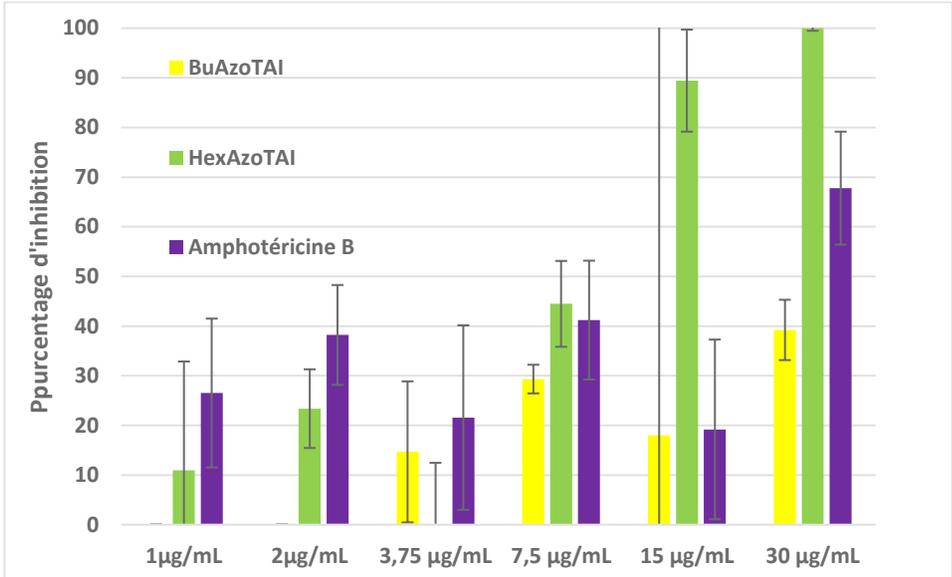


Figure 77 Inhibition de *C.krusei* par **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**

L'inhibition par **HexAzoTAI** chute en dessous de 50% à partir de 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour **BuAzoTAI** également, l'activité antifongique chute brutalement avec la diminution de la concentration (à peine 30% d'inhibition à 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). **HexAzoTAI** reste plus actif que l'amphotéricine B dans cette nouvelle expérience ($\text{CMI}_{50} = 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mais ce n'est pas le cas pour **BuAzoTAI**. L'inhibition de la croissance de *C.kefyr* par les gammes de concentrations des composés est montrée dans la **Figure 78**.

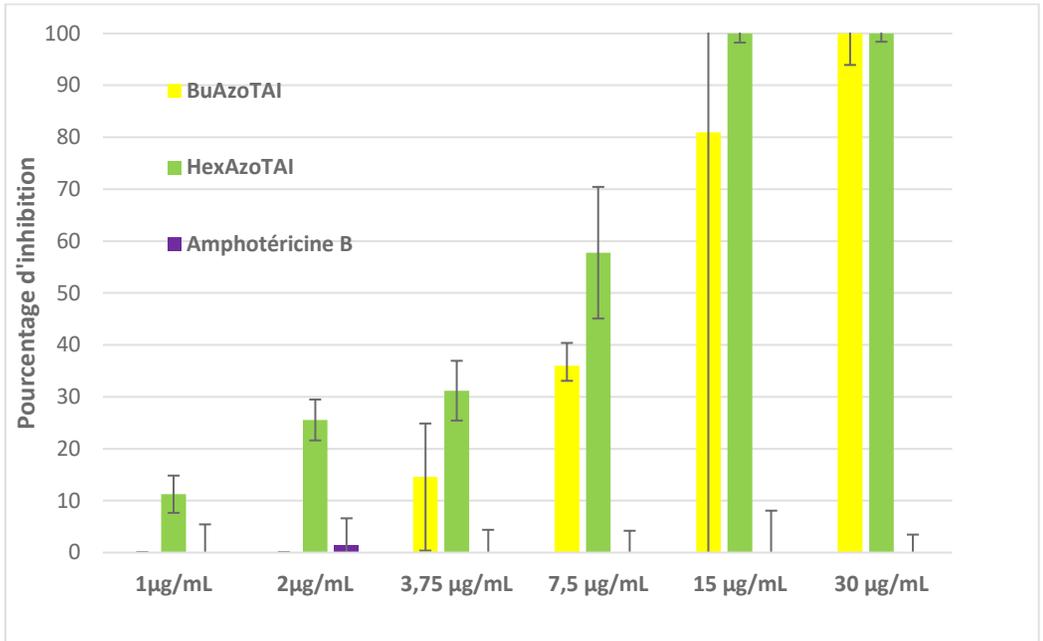


Figure 78 Inhibition de *C.kefyri* par **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**

L'amphotéricine B ne présente pas d'activité sur *C.kefyri* mais **HexAzoTAI** parvient à inhiber à plus de 50% sa croissance à 7,5 µg.mL⁻¹. **BuAzoTAI** présente des activités plus faibles que **HexAzoTAI**, puisqu'il n'inhibe plus la croissance de *C.kefyri* qu'à 35% à la concentration de 7,5 µg.mL⁻¹. L'inhibition de la croissance de *C.tropicalis* par les **AzoTAI** est montrée dans la **Figure 79**.

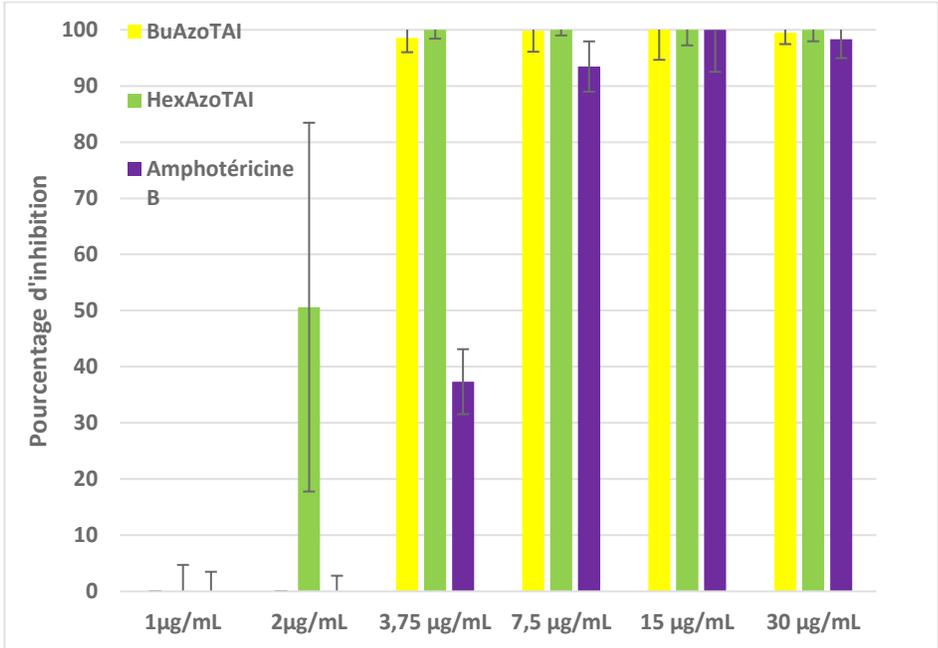


Figure 79 Inhibition de *C.tropicalis* par **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**

Les 3 composés inhibent complètement la croissance du champignon à partir de $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A $3,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, l'amphotéricine B n'inhibe plus la croissance qu'à 35% mais l'activité de **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** restent inchangée. **HexAzoTAI** perd la moitié de son activité à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ puis totalement à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Jusqu'ici, l'activité de nos composés sur les levures sont bonnes puisqu'on peut descendre en concentration tout en ayant une meilleure activité que le témoin, à part pour *C.krusei*.

L'activité de ces composés sur les champignons filamenteux est également mesurée aux mêmes concentrations. L'inhibition de la croissance d'*A.alternata* par ces composés est montrée dans la **Figure 80**. La valeur de l'inhibition pour **HexAzoTAI** à $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ étant aberrante, elle n'est pas représentée ici.

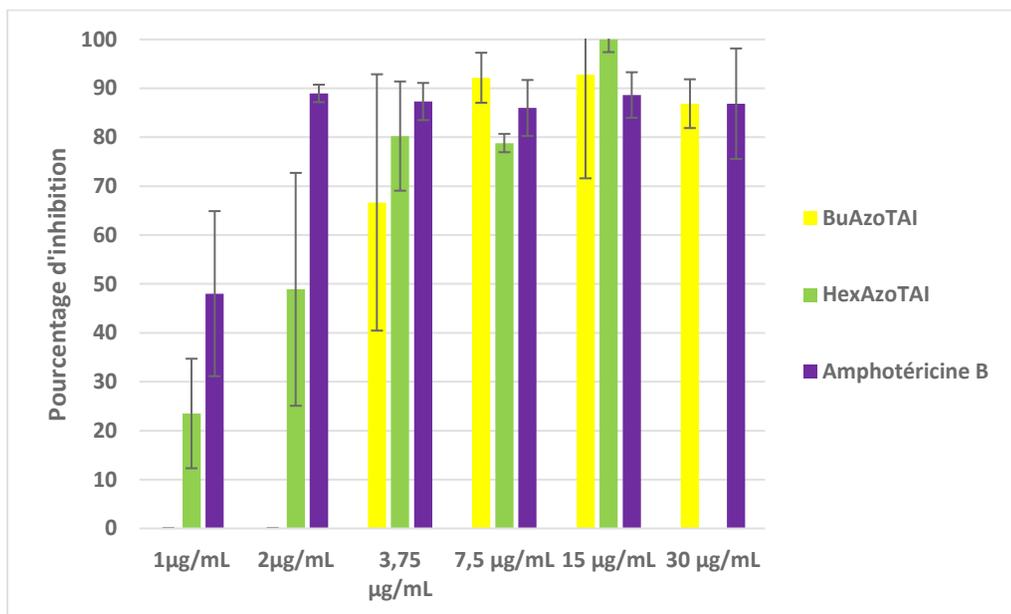


Figure 80 Inhibition de *A. alternata* par BuAzoTAI et HexAzoTAI

BuAzoTAI a sa CMI_{50} à $3,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$. **HexAzoTAI** également, et son activité chute sous les 50% d'inhibition dès $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. L'amphotéricine B possède une meilleure activité car elle inhibe encore 90% de la croissance d'*A. alternata* à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. L'inhibition de la croissance de *C. cladosporioides* par les gammes de concentrations de ces composés est montrée dans la **Figure 81**.

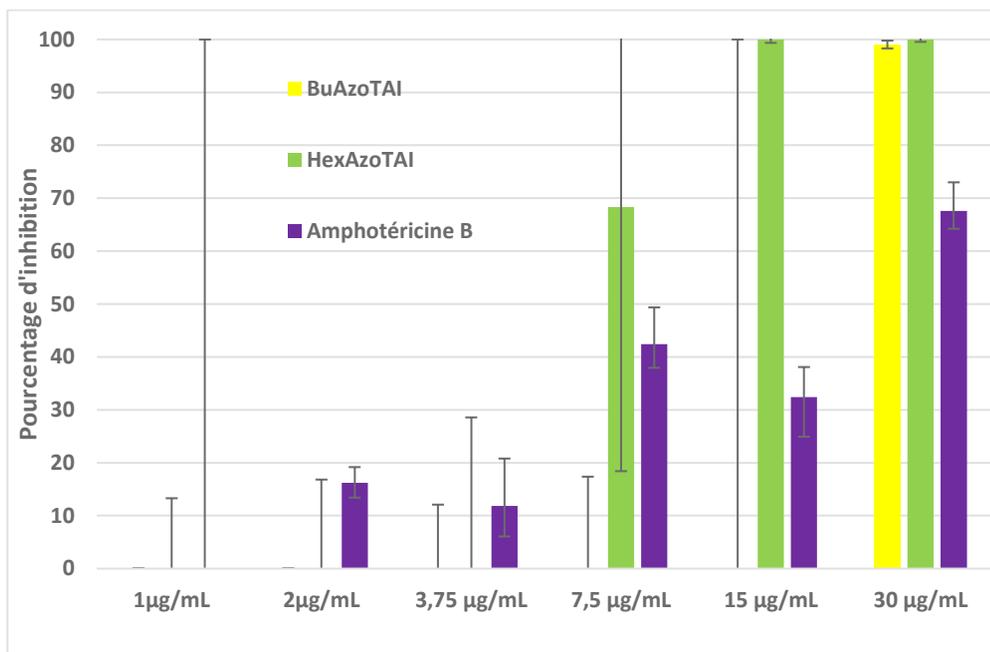


Figure 81 Inhibition de *C.cladosporiodes* par **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**

BuAzoTAI n'est actif qu'à la concentration du screening : 30 µg.mL⁻¹. **HexAzoTAI** présente une CMI₅₀ à 7,5 µg.mL⁻¹. Le témoin positif n'inhibe la croissance de *C.cladosporiodes* qu'à la concentration de 30 µg.mL⁻¹. L'inhibition de la croissance de *F.solani* par les **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** est montrée dans la **Figure 82**.

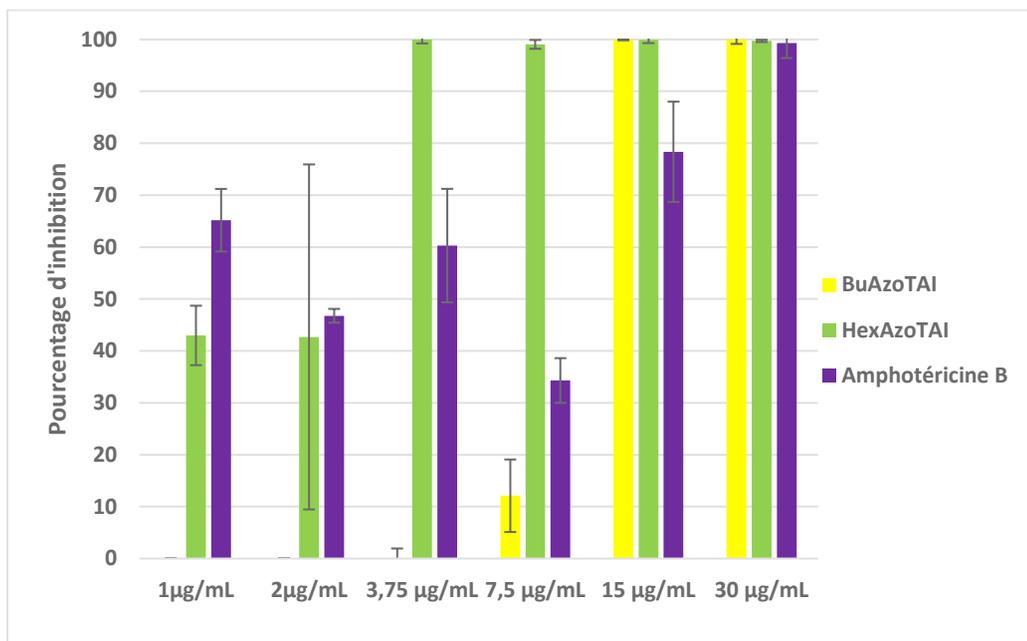


Figure 82 Inhibition de *F.solani* par **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**

HexAzoTAI inhibe 100% de la croissance de *F.solani* à $3,75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puis perd plus de 60% de son activité arrivé à $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **BuAzoTAI** inhibe la croissance du champignon à 100 % à $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mais perd presque toute son activité à partir de $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. L'activité de l'amphotéricine B semble avoir une activité intermédiaire entre **HexAzoTAI** et **BuAzoTAI**. Sur les champignons filamenteux comme sur les levures, nous observons clairement qu'**HexAzoTAI**, qui a la plus grande queue apolaire, présente la meilleure activité. Ce composé arrive même à obtenir des CMI_{50} équivalentes ou plus basses que l'amphotéricine B. (**Tableau 9**).

Tableau 9 CMI₅₀ des composés **AzoTAI** et de l'amphotéricine B pour les six champignons

| | CMI ₅₀ BuAzoTAI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | CMI ₅₀ HexAzoTAI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | CMI ₅₀ Amphotéricine B($\mu\text{g.mL}^{-1}$) |
|--------------------------|--|---|--|
| <i>C.kruséi</i> | >30 | 15 | 30 |
| <i>C.kefyr</i> | 15 | 7,5 | >30 |
| <i>C.tropicalis</i> | 3,75 | 3,75 | 7,5 |
| <i>A.alternata</i> | 3,75 | 3,75 | 2 |
| <i>C.cladosporioides</i> | 30 | 7,5 | 30 |
| <i>F.solani</i> | 15 | 3,75 | 1 |

2. Propriétés antibactériennes

L'inhibition de la croissance de 3 souches de bactéries (*E.coli*, *M.luteus* et *B.subtilis*) en présence des composés **AzoTAI** a été mesurée. L'inhibition de la croissance d'*E.coli* en fonction de la concentration d'**AzoTAI** est présentée dans la **Figure 83**. Au vu des bonnes activités de ces composés lors d'un premier screening, des concentrations plus basses ont été testées par rapport aux autres familles.

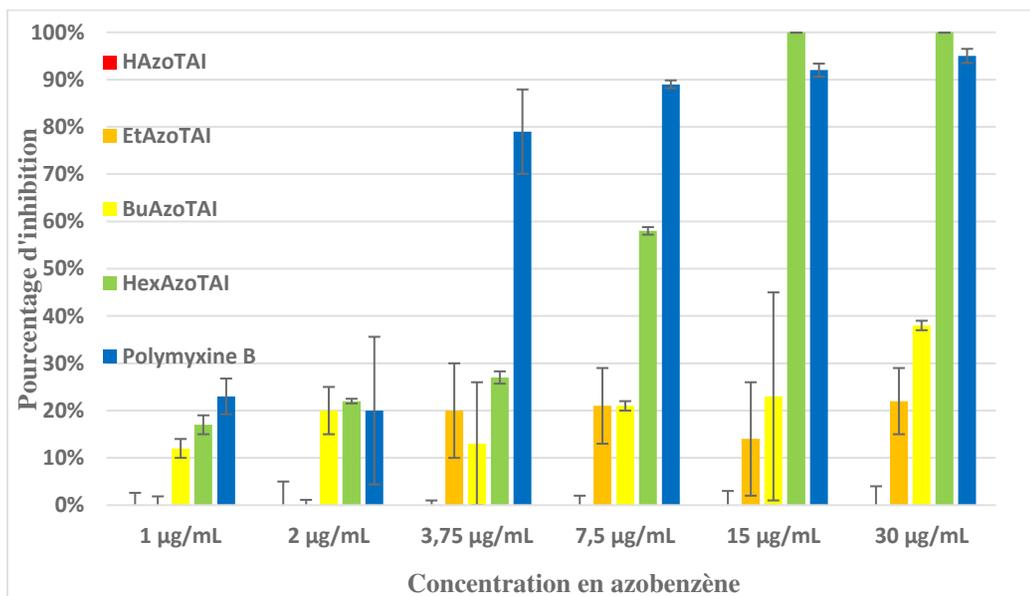


Figure 83 Inhibition de la croissance de *E.coli* en fonction de la concentration en **AzoTAI**

Le composé **HAzoTAI** n'inhibe pas la croissance d'*E.coli* quelle que soit la concentration. **EtAzoTAI** et **BuAzoTAI** n'ont qu'une activité inhibitrice très limitée. **HexAzoTAI** se révèle être le composé le plus actif, avec une inhibition de la croissance d'*E.coli* supérieure à 50% à partir de 7,5 µg/mL. Il reste néanmoins moins actif que la polymyxine B. Les taux de croissance μ et les temps de latence pour **HexAzoTAI** sont donnés dans la **Figure 84**. Les concentrations 15 µg/mL et 30 µg/mL ne sont pas représentées car *E.coli* ne se développe pas du tout à ces concentrations.

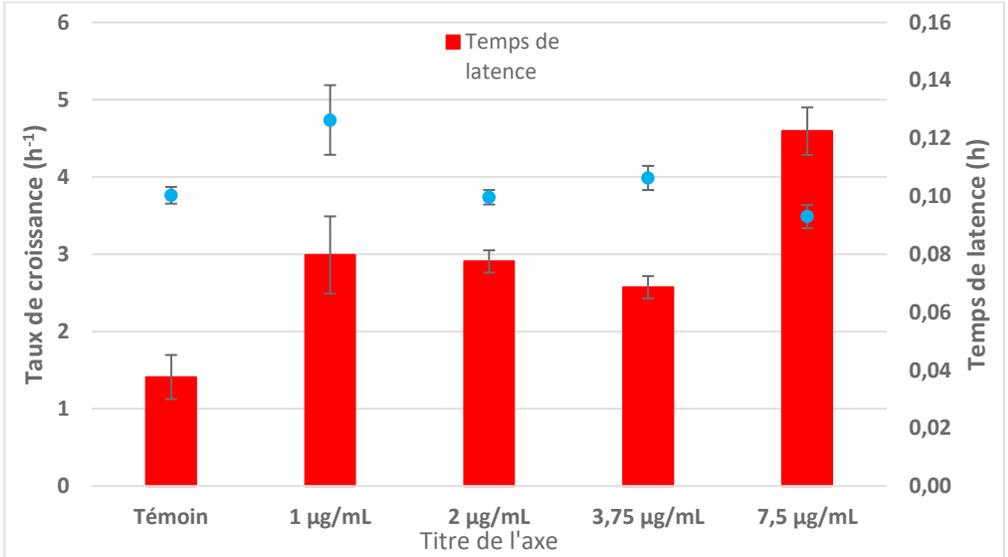


Figure 84 Temps de latence et taux de croissance en fonction de la concentration en **HexAzoTAI**

Le taux de croissance de la phase exponentielle d'*E.coli* n'est pas affecté par ce composé à des concentrations permettant encore la croissance. En revanche, même à la concentration la plus faible où l'inhibition de la croissance est inférieure à 20%, un retard avec un temps de latence qui passe de 1,4 à 3 h est observé. Le retard de croissance augmente encore avec la concentration pour atteindre 4,5 h pour la concentration de 7,5 µg.mL⁻¹. Aucun composé de la famille AzoTAI ne parvient à égaler la polymyxine B qui inhibe à 80% la croissance d'*E.coli* jusque 3,75 µg/mL.

Si les inhibitions entraînées sur *E.coli* par les **AzoTAI** sont considérées de manière globale, ainsi, la présence d'une longue chaîne apolaire confère à la molécule ses propriétés antibactériennes pour *E.coli*. Le type d'activité de l'antibactérien est caractérisé par la suite. En effet, sa CMI₅₀ de 7,5 µg.mL⁻¹ est déjà connue, un comptage des unités formant une colonie (UFC) par millilitres d'**HexAzoTAI** est effectué pour caractériser le type d'activité antibactérienne. L'activité de ce composé apparaît soit bactéricide soit bactériostatique²⁷⁰. Les concentrations testées sont la CMI₅₀, 2 fois la CMI₅₀ et 4 fois la CMI₅₀ (**Figure 85**).

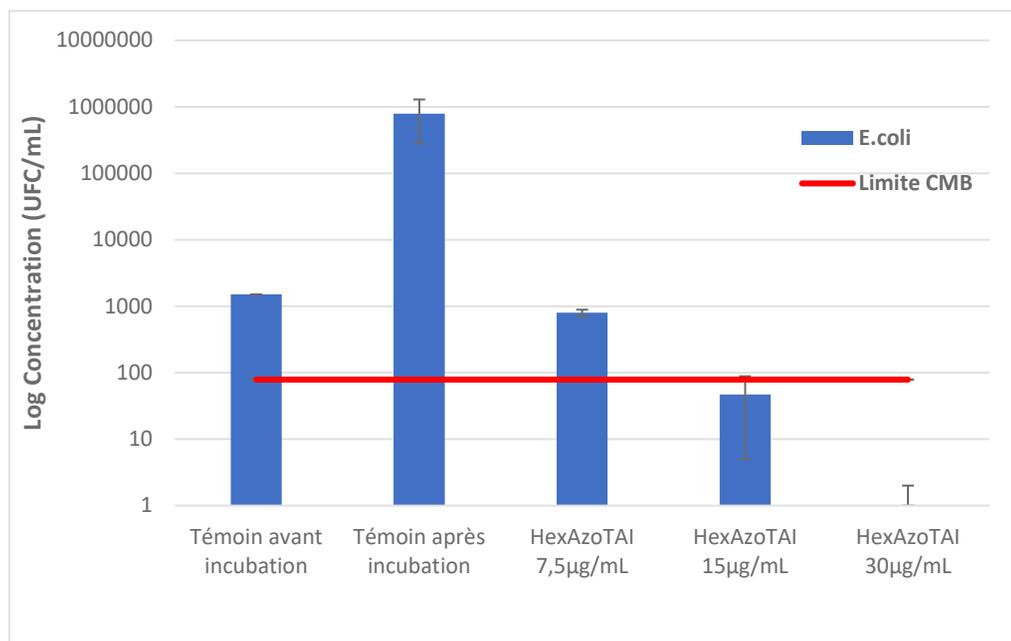


Figure 85 Nombre d'UFC après 24h en fonction de la concentration en **HexAzoTAI** et CMB calculée à partir de l'inoculum

La concentration minimale bactéricide (CMB) d'un composé correspond à la concentration minimale à laquelle 99,99% des bactéries d'un inoculum sont éliminés. Les résultats montrent que la croissance d'*E.coli* en 24h est de 26200%. Comme attendu, dès la CMI₅₀ atteinte, une chute importante du nombre de colonies est constatée. 15 µg/mL est donc la CMB puisqu'à partir de cette concentration 99,99% des bactéries de l'inoculum ont été détruites. Aucune unité viable n'est observée à partir de 30 µg/mL. Le ratio CMB/CMI₅₀ est donc de 2, cela signifie qu'**HexAzoTAI** est un antibiotique bactéricide vis-à-vis d'*E.coli*^{270,271}.

L'inhibition de la croissance de *M.luteus* par les **AzoTAI** se trouve dans le **Figure 86**.

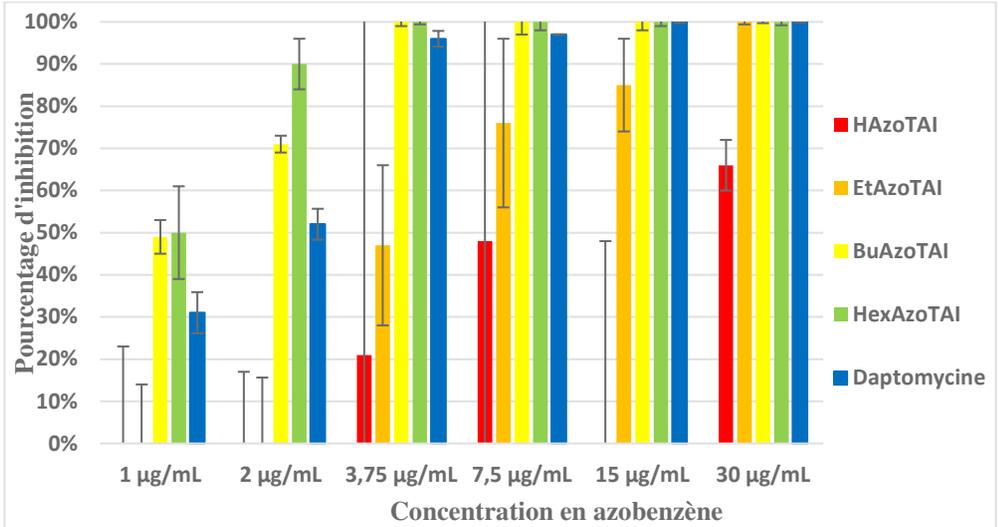


Figure 86 Inhibition de la croissance de *M.luteus* en fonction de la concentration en **AzoTAI**

L'inhibition de la croissance de *M.luteus* par **HAzoTAI** est limitée à la concentration la plus élevée. **EtAzoTAI** montre un pouvoir d'inhibition assez fort, puisque l'inhibition descend en dessous de 50% d'inhibition de la croissance de la bactérie au-delà de 3,75 µg/mL. **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** ont de très fortes activités contre *M.luteus*, et l'inhibent déjà à 50% à partir de la concentration minimale de 1 µg/m. Ces deux derniers composés ont une meilleure activité que la daptomycine puisque celui-ci inhibe à seulement 50% la croissance à 2 µg/mL. Les taux de croissance μ et les temps de latence de *M.luteus* à la plus faible concentration présentant une activité antibactérienne sont observées pour **EtAzoTAI**, **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** sont présentés dans le **Figure 87**.

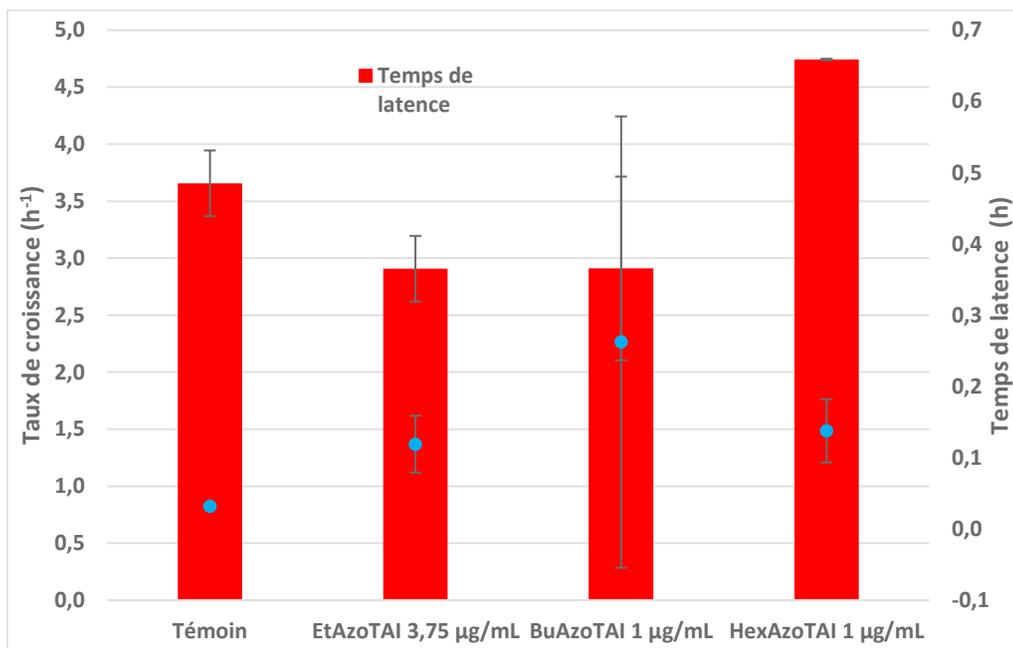


Figure 87 Temps de latence et μ de *M.luteus* en fonction des différents AzoTAI

Le temps de latence de la croissance de *M.luteus* est affecté significativement uniquement par **HexAzoTAI**. Ainsi bien que **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** commencent à inhiber la croissance à partir de la plus faible concentration testée, seul **HexAzoTAI** augmente le temps de latence de la croissance de *M.luteus* à cette concentration. Le taux de croissance μ de la phase exponentielle ne semble pas significativement modifié par la présence des **AzoTAI**. Ainsi, plus la taille de la queue apolaire est importante, plus la molécule inhibe la croissance de *M.luteus*. Une augmentation de l'activité antibactérienne de la molécule s'est bien produite en lui greffant une tête polaire. Le type d'activité antibactérienne de la molécule est évalué, maintenant que l'on connaît la CMI_{50} de **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** (respectivement 2 et 1 $\mu\text{g/mL}$), sa CMB va être évalué par la suite. (**Figure 88**).

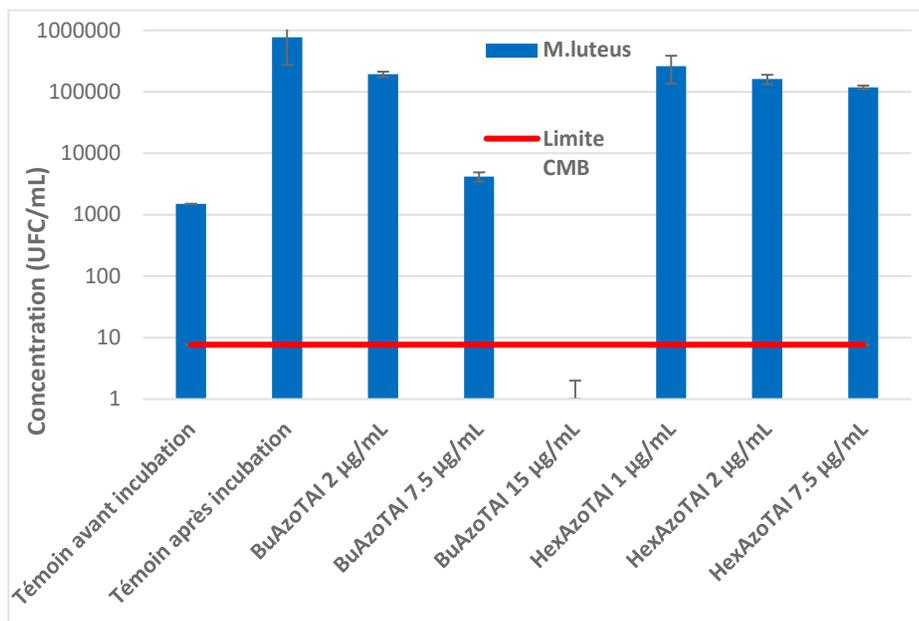


Figure 88 Nombre d'UFC en fonction de la concentration en **HexAzoTAI** et **BuAzoTAI**

La croissance du témoin a été de 25600%. Pour **BuAzoTAI**, il apparaît que la présence du composé n'a que très peu diminué le nombre d'unités viables à 2 µg/mL. Le nombre d'UFC diminue encore légèrement à 7,5 µg/mL mais à partir de 15µg/mL aucune colonies viables n'est détecté. La CMB pour **BuAzoTAI** est donc de 15 µg/mL. Pour le composé **HexAzoTAI** nous n'observons qu'une très faible diminution du nombre d'unités viable, la CMB n'a donc pas pu être déterminé avec ces expériences, nous savons qu'elle est néanmoins supérieure à 4. Le rapport CMB/CMI₅₀ pour *M.luteus* est de 7,5 pour le composé **BuAzoTAI**. L'effet de cette famille **AzoTAI** sur la croissance de *M.luteus* est de type bactériostatique^{270,271}.

L'inhibition de la croissance de *B.subtilis* par les **AzoTAI** se trouve dans le **Figure 89**.

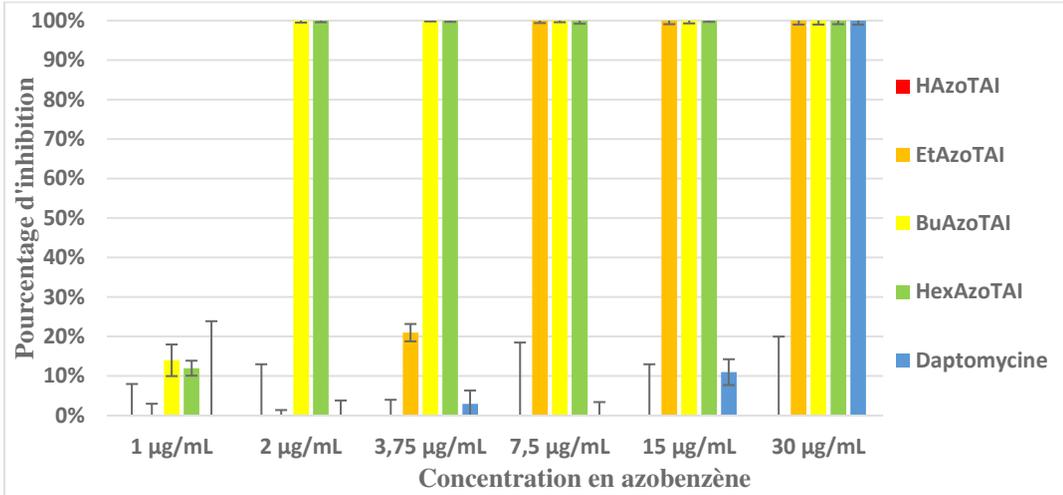


Figure 89 Inhibition de la croissance de *B.subtilis* en fonction de la concentration en AzoTAI

La croissance de *B.subtilis* n'est pas affectée par **HAzoTAI**. **EtAzoTAI** inhibe complètement la croissance de la bactérie à partir de $7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les activités de **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** sont identiques, ils inhibent complètement la croissance de *B.subtilis* à partir de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ils ont une activité antibactérienne beaucoup plus forte que le témoin testé, la daptomycine, qui possède une CMI₅₀ de $30 \mu\text{g/mL}$ pour *B.subtilis*. Les taux de croissance et les temps de latence de *B.subtilis* à la dernière concentration où on a encore une activité antibactérienne contre *B.subtilis* pour **EtAzoTAI**, **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** sont présentés dans le **Figure 90**.

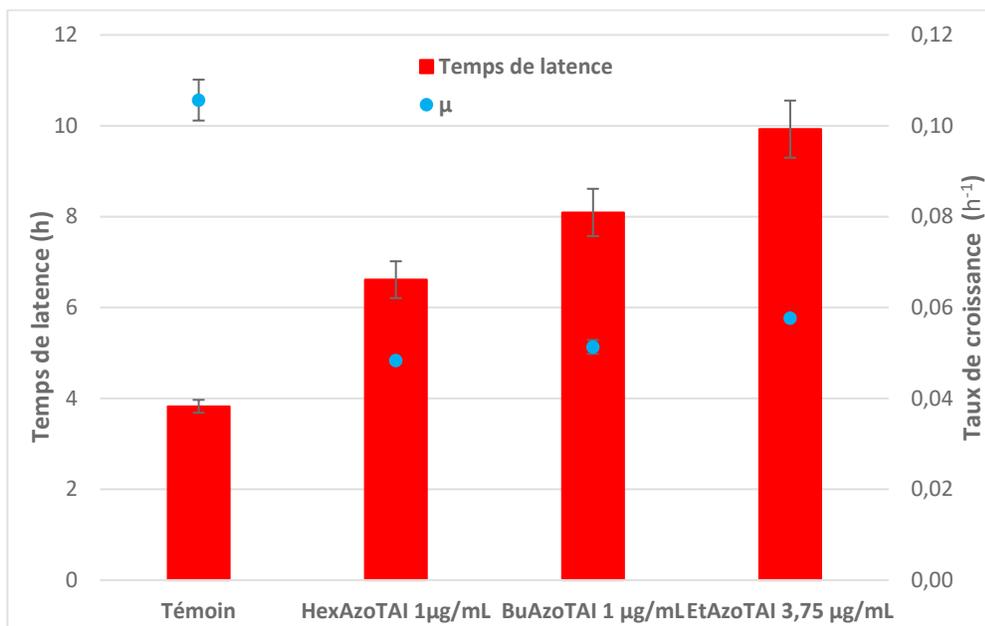


Figure 90 Temps de latence de la croissance et taux de croissance de *B.subtilis* en fonction des différents AzoTAI

Le temps de latence pour *B.subtilis* augmente de 2,5 h pour **HexAzoTAI**, de 4 h pour **BuAzoTAI** et de 6 h pour **EtAzoTAI**. En revanche, chacun de ces composés cause la même diminution du taux de croissance de la phase exponentielle. A l'inverse de l'autre bactérie gram-positif *M.luteus*, **EtAzoTAI** semble le plus retarder la croissance de la bactérie à des concentrations inférieures à la CMI₅₀. A une même concentration, la comparaison de **BuAzoTAI** avec **HexAzoTAI** semble confirmer cette tendance d'une chaîne plus courte retardant plus le début de la croissance, puisque c'est **HexAzoTAI** qui retarde le moins la croissance de la bactérie. Les CMI₅₀ des AzoTAI sont répertoriées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 Détermination des CMI₅₀ des trois souches pour les composés de la famille **AzoTAI**

| CMI ₅₀ (µg/mL) | <i>E.coli</i> | <i>M.luteus</i> | <i>B.subtilis</i> |
|---------------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| HAzoTAI | >30 | 30 | >30 |
| EtAzoTAI | >30 | 7,5 | 7,5 |
| BuAzoTAI | >30 | 2 | 2 |
| HexAzoTAI | 7,5 | 1 | 2 |
| Polymixine B | 3,75 | - | - |
| Daptomycine | - | 2 | 30 |

Il apparaît clairement que la longueur de chaîne joue un rôle sur l'activité antibactérienne. En effet, seul le composé avec une queue apolaire à 6 carbones parvient à avoir une activité sur la souche gram-négative. De plus, l'activité sur les souches gram-positives est plus grande pour les deux composés avec la queue apolaire la plus grande. Dans la littérature, le mode d'action de ces molécules était identifié comme la perturbation de la membrane plasmique²²⁶. Ces CMI₅₀ sont comparables à celles obtenus par Salta *et al.*²²⁶ pour des souches pathogènes de *S.aureus* (1 µg.mL⁻¹ pour le meilleur composé) et également pour les souches pathogènes d'*E.coli* (8 µg.mL⁻¹ pour le meilleur composé). Ils n'obtiennent pas d'activités pour *P.aeruginosa*.

Nous pouvons donc supposer que le greffage d'une tête polaire cationique de ce type a augmenté l'amphiphilicité de la molécule de manière à ce qu'elle puisse réagir avec la membrane plasmique des champignons et des bactéries. Ainsi, dans la prochaine partie, une évaluation de la capacité de ces composés à interagir avec les lipides membranaires de bactérie sera effectuée, afin de constater de la possibilité que le mode d'action des **AzoTAI** est la perméabilisation de la membrane plasmique des micro-organismes.

IV. Modélisation de l'insertion dans une bicouche lipidique

La procédure IMPALA a été appliquée afin d'évaluer les capacités d'insertion de la molécule au sein d'une bicouche phospholipidique⁶. La contrainte énergétique totale de la molécule en fonction de sa position dans la bicouche est représentée dans la **Figure 91**.

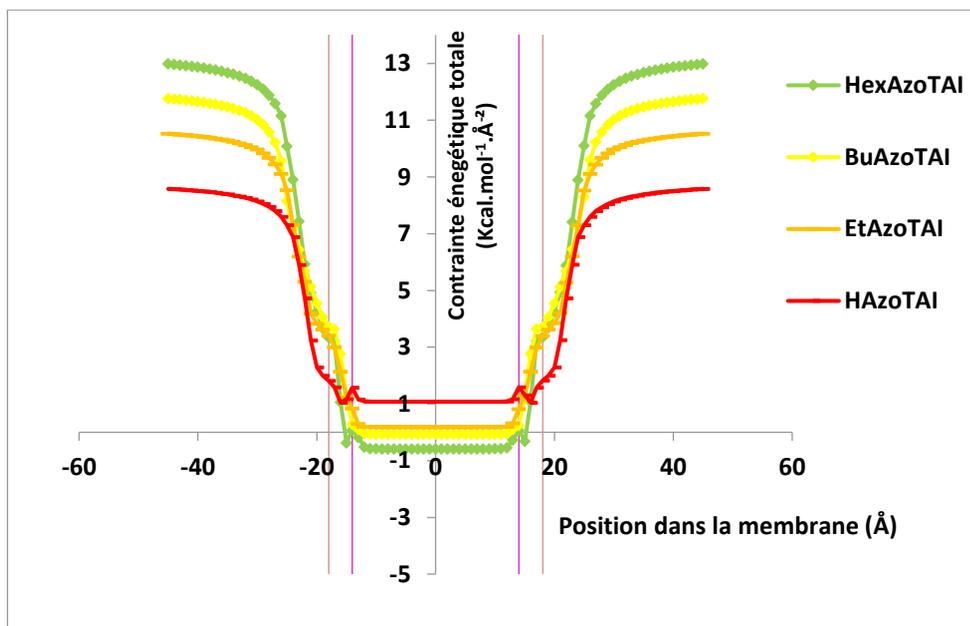


Figure 91 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule d'AzoTAI en fonction de la position de son centre de masse dans une membrane implicite selon le modèle IMPALA. La ligne marron verticale à -18\AA et $+18\text{\AA}$ correspond à la limite entre le milieu aqueux et la partie polaire de la bicouche. La ligne violette verticale à $-13,5\text{\AA}$ et $+13,5\text{\AA}$ correspond à la limite entre les têtes polaires et cœur hydrophobe de la bicouche implicite. La ligne verticale noire correspond au centre de la bicouche.

Les **AzoTAI** présentent un profil énergétique d'insertion similaire. Celui-ci part d'une valeur élevée dans le milieu aqueux (entre $+8$ et $+13\text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$), puis descend brusquement à l'approche de la bicouche phospholipidique. Cette chute continue même après avoir pénétré la partie polaire de la bicouche, jusqu'à atteindre une valeur d'énergie minimale au niveau de l'interface polaire/apolaire de la bicouche phospholipidique ($-0,7$ à $+0,2\text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$). Ce type de profil est favorable à une insertion dans une bicouche phospholipidique. La chute de contrainte énergétique est d'autant plus grande que la longueur de la chaîne de l'**AzoTAI** est grande, ce qui suggère une insertion encore plus favorable pour les composés **AzoTAI** à longue chaîne. Ceci est corrélé aux activités antibactériennes. La valeur minimale énergétique est constante tout le long de la partie apolaire de la bicouche, cela suggère que les molécules **AzoTAI** peuvent se mouvoir à travers toute la membrane. Il est intéressant de noter que dans le cas de **HAzoTAI** un petit pic de contrainte énergétique positif existe à l'interface polaire/apolaire de la bicouche ($+1,7\text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$).

V. Perméabilisation des liposomes

Le pouvoir perméabilisant des AzoTAI synthétisés est évalué en formant des liposomes dont les proportions en lipides membranaires bactériens (PE, PG, CL et DGDG) sont les plus proches des compositions que l'on peut trouver dans la littérature^{38,122}. Les résultats de la perméabilisation des liposomes mimant la composition de la membrane plasmique d'*E.coli* sont présentés dans la **Figure 92**.

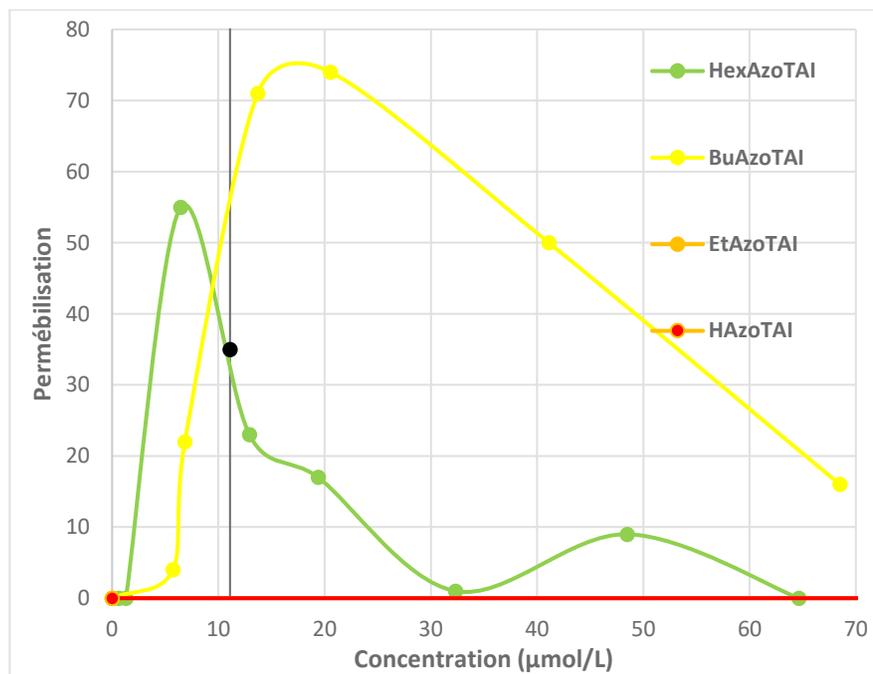


Figure 92 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne d'*E.coli* en fonction de la concentration en AzoTAI. Les liposomes sont constitués d'un mélange PE/PG/CL (70/25/5). La concentration en phospholipides est de 11,1 µmol.L⁻¹.

HAzoTAI et **EtAzoTAI** n'ont aucun effet perméabilisant, quelle que soit leur concentration. Il est possible que cela soit dû au trop faible potentiel apolaire de la molécule qui l'empêcherait d'interagir avec les lipides membranaires bactériens. **HexAzoTAI** et **BuAzoTAI**, quant à eux, perméabilisent les liposomes à hauteur de 55 et 20% à un rapport azobenzène/phospholipide de 0,5. Le pourcentage de perméabilisation décroît ensuite pour **HexAzoTAI** mais 75% de perméabilisation sont obtenus à une concentration de 15 µmol.L⁻¹. La décroissance apparente de la perméabilisation des liposomes avec l'augmentation de la concentration en

azobenzène ne fait pas de sens avec la réalité. La baisse de ce pourcentage est due à un quenching de notre sonde fluorescente (calcéine) aux hautes concentrations. Ce phénomène a également été observé lorsque la calcéine est en mélange avec les **AzoTAI** en absence de liposomes. Dans la littérature, des quenchers de fluorescence avec des structures azobenzéniques et des amines tertiaires ont été synthétisés en tant que quencher de la fluorescence pour faire des microanalyses comme l'étude des interactions faibles entre les protéines, ou l'hybridation de l'ADN/ARN^{272,273}. Néanmoins, les **AzoTAI** ne permettent pas le quenching à 100%. Il est donc possible de constater leur grand pouvoir de perméabilisation, même si les résultats sont sous-estimés. Ainsi, **HexAzoTAI**, la seule molécule d'**AzoTAI** ayant une activité antibactérienne sur *E.coli*, permet de perméabiliser les liposomes mimant la composition de sa membrane plasmique. **BuAzoTAI** a peu d'activité biologique mais a tout de même un certain pouvoir de perméabilisation. **HAzoTAI** et **EtAzoTAI** n'ont presque pas d'activités antibactériennes et n'ont pas de pouvoir de perméabilisation des liposomes. Les résultats de perméabilisation semblent donc être corrélés à l'activité antibactérienne envers *E.coli*. Cela suggère que le mode d'action des **AzoTAI** passe par une perméabilisation de la membrane plasmique des bactéries.

La perméabilisation de liposomes mimant la composition de la membrane plasmique de *M.luteus* est exposée dans la **Figure 93**.

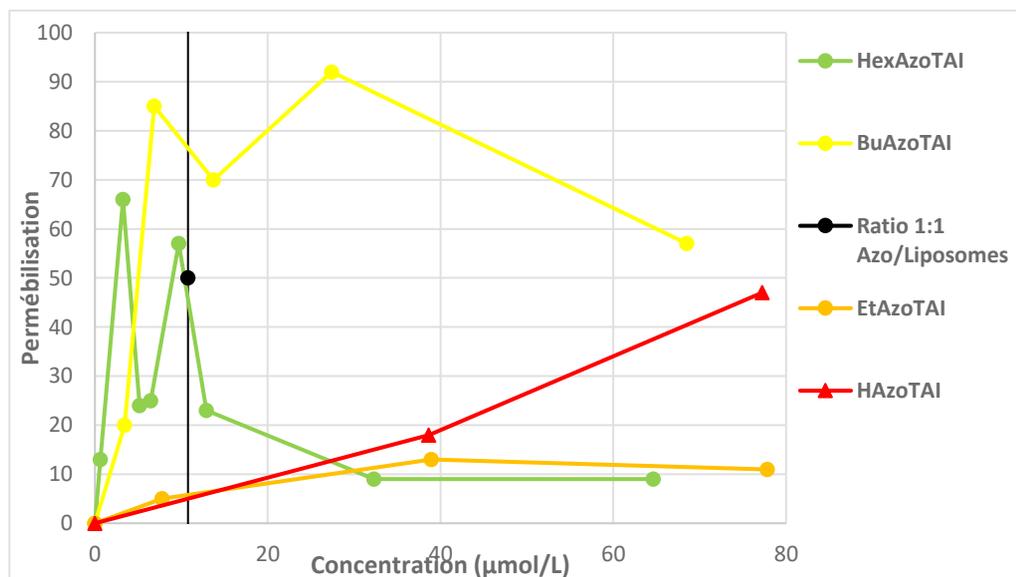


Figure 93 Mesure de perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de *M.luteus* en fonction de la concentration en AzoTAI. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/DMDG/CL (63/32/5). La concentration en phospholipides est de 10,8 µmol.L⁻¹.

A un rapport azobenzène/phospholipide de 0,5, **HAzoTAI** et **EtAzoTAI** ont des activités très faibles (5%) pour la perméabilisation de liposomes mimant la composition de la membrane interne de *M.luteus*. A ce même ratio, **BuAzoTAI** perméabilise les liposomes à hauteur de 50% et **HexAzoTAI** à hauteur de 65%. A des concentrations plus élevées, le phénomène est plus compliqué à interpréter vu les phénomènes de quenching. **HexAzoTAI** et **BuAzoTAI** possèdent à la fois de très bonnes activités antibactériennes, mais elles possèdent également un fort pouvoir de perméabilisation de liposomes biomimétiques de la membrane interne de *M.luteus*. Cela signifie donc que le mode d'action antibactérien des **AzoTAI** peut être supposé lié à une perméabilisation de cette membrane interne. **HAzoTAI** et **EtAzoTAI** ont à la fois de moins bonnes activités antibactériennes et un moins bon pouvoir de perméabilisation, c'est donc aussi cohérent.

La même expérience a été menée avec des liposomes mimant la composition de la membrane de *B.subtilis* (**Figure 94**).

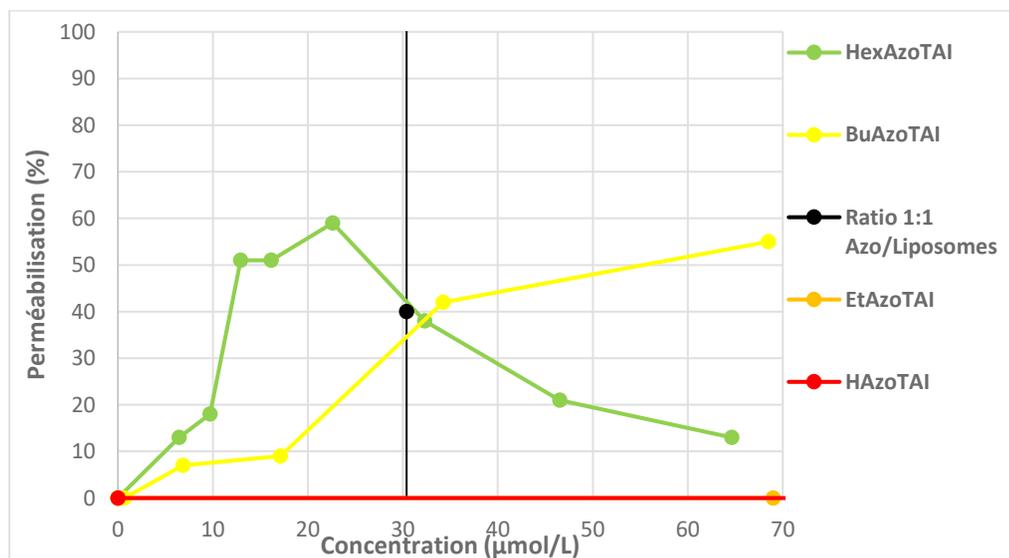


Figure 94 Perméabilisation des liposomes mimant la membrane plasmique interne de *B.subtilis* par les différentes molécules de la famille AzoTAI à différentes concentrations. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/PE/CL (81/14/5). La concentration en phospholipides est de 30,4 µmol.L⁻¹.

EtAzoTAI et **HAzoTAI** n'ont aucun effet perméabilisant, et ce, quelle que soit la concentration. A un rapport de 0,5 azobenzène par lipide, **HexAzoTAI** parvient à une perméabilisation de 50%, en revanche **BuAzoTAI** a un effet de perméabilisation de 10% à ce ratio. Lorsque les concentrations augmentent, les résultats sont plus difficiles à interpréter car l'effet du

quenching des composés sur la calcéine fait baisser en apparence la perméabilisation d'**HexAzoTAI**. Pour **BuAzoTAI**, 50% de perméabilisation est constaté pour un rapport azobenzène/lipide de 2. Pour **HexAzoTAI** et **BuAzoTAI**, leur pouvoir de perméabilisation significatif est cohérent avec leur forte activité antibactérienne. Pour **HAzoTAI**, une cohérence existe aussi car on a une activité biologique très modérée et une perméabilisation des liposomes nulle. Cependant, pour **EtAzoTAI**, l'activité biologique modérée n'est pas soutenue par une activité de perméabilisation des liposomes.

En conclusion, à l'exception du cas d'**EtAzoTAI** pour *B.subtilis*, il existe une corrélation entre l'activité antibactérienne des composés **AzoTAI** et leur propriété de perméabilisation des liposomes biomimétiques de la composition de la membrane interne de la bactérie testée. Il semblerait ainsi que le mode d'action des **AzoTAI** soit lié à une perméabilisation de la membrane interne de la bactérie, et plus particulièrement de la partie lipidique de cette membrane. Pour analyser l'éventuelle spécificité lipidique de ce mécanisme, des liposomes dont la composition ne comprend pas de PE ont été formés. Ils se composent de 94% de PG et 6% de CL. Les résultats de perméabilisation de ces liposomes par les **AzoTAI** sont montrés à la **Figure 4**. En comparant ceux-ci avec ceux mimant la membrane interne d'*E.coli* comportant une proportion très forte de PE (PE/PG/CL (70/25/5)) et avec ceux mimant la membrane interne de *B.subtilis* qui en comporte très peu (PG/PE/CL (81/14/5)), on pourra apprécier l'importance de la présence de PE (**Figure 95**).

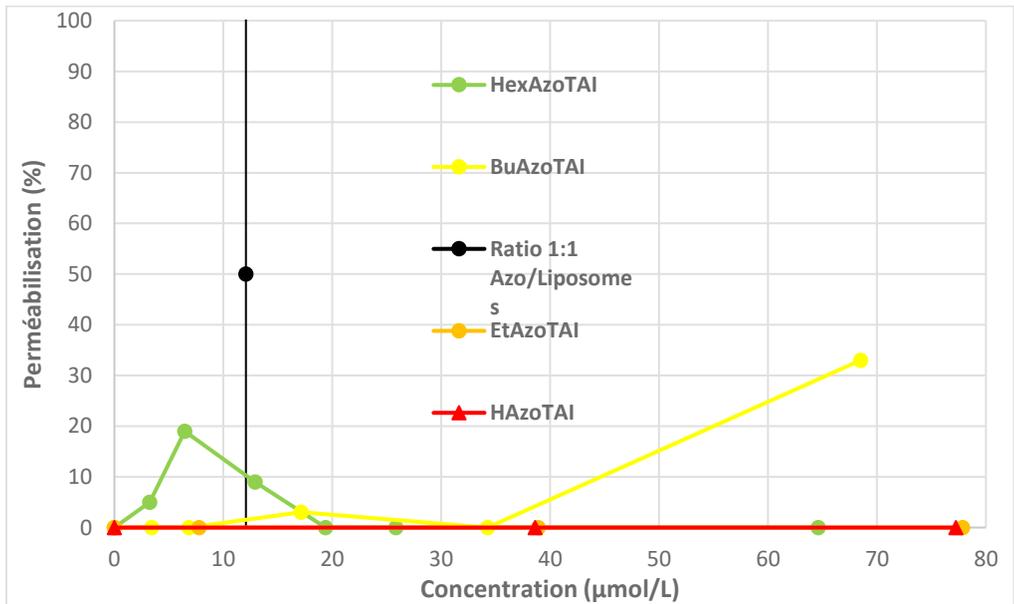


Figure 95 Perméabilisation des liposomes sans PE par les différentes molécules de la famille AzoTAI à différentes concentrations. Les liposomes sont constitués d'un mélange PG/CL (94/6). La concentration en phospholipides est de $12,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$

HAzoTAI et **EtAzoTAI** n'ont aucun effet perméabilisant comme précédemment observé. L'activité perméabilisante s'est effondrée pour **HexAzoTAI** puisque pour un ratio azobenzène/phospholipides de 0,5 on n'atteint plus qu'un pouvoir de perméabilisation de 20%. **BuAzoTAI** n'a plus d'effet perméabilisant à ce ratio. Il faut atteindre un ratio azobenzène/lipides de 6 pour seulement voir **BuAzoTAI** perméabiliser les liposomes à hauteur de 30%.

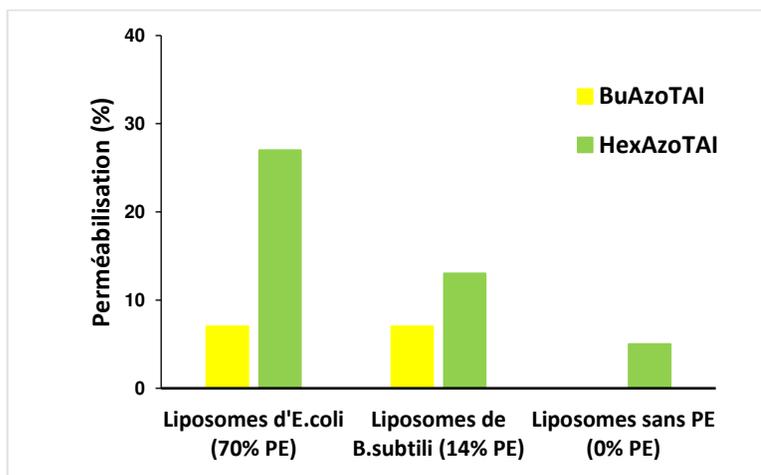


Figure 96 Perméabilisation des liposomes sous l'action de **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** à un rapport d'azobenzènes/phospholipides de 0,75

Une autre observation importante est la dépendance entre la perméabilisation et le pourcentage de phosphatidyléthanolamine (PE) dans la composition lipidique des liposomes. Une teneur en PE plus élevée entraîne une augmentation de la perméabilisation. Cela suggère que les dérivés d'azobenzène ont une interaction spécifique avec la PE. A l'inverse, il semblerait que le PG n'ait pas une grande affinité avec ces deux molécules, vu le peu d'activités qu'ont nos molécules sur les liposomes sans PE. La proportion de CL étant constante dans tous les liposomes, et au vu des activités de perméabilisation assez différentes des composés, il n'est pas possible à ce stade de conclure au sujet de l'affinité des **AzoTAI** pour cette dernière. De même pour l'affinité du DMDG avec les composés **AzoTAI** il n'est pas possible à ce stade de conclure dans la mesure où les seuls liposomes comportant du DMDG sont ceux mimant la composition de *M.luteus*.

VI. Capacité d'adsorption sous une monocouche lipidique

Dans le but de comprendre de manière plus fine les interactions spécifiques entre les composés de la famille **AzoTAI** et les lipides membranaires bactériens, des expériences d'adsorption des **AzoTAI** sous une monocouche lipidique ont été effectuées à l'aide d'une balance à film de Langmuir. Ces expériences ont été menées uniquement sur **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** car ce sont les seuls composés présentant une activité perméabilisante et donc susceptibles d'interagir avec la membrane. L'augmentation de la pression de surface est mesurée en fonction du temps à différentes pressions initiales

exercée par la monocouche pure. La **Figure 96**, présente un exemple de l'augmentation de la pression de surface en fonction du temps de **BuAzoTAI** sous une monocouche constituée de PE avec une pression initiale de 12 mN/m.

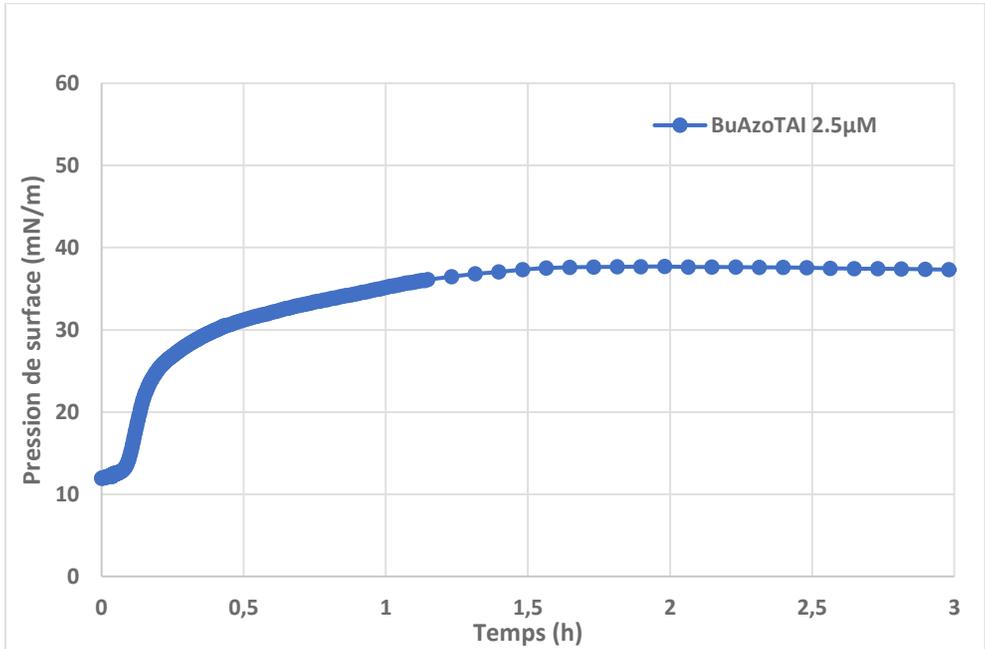


Figure 97 Evolution en fonction du temps de la pression de surface de la monocouche de PE initialement comprimée à 12mN/m suite à l'injection de BuAzoTAI dans la sous-phase (t=0).

L'expérience est répétée pour différentes pressions de surface initiales. Ainsi, le graphe de la variation de pression de surface ($\Delta\Pi$) en fonction de la pression de surface initiale (Π_i) peut être tracé (**Figure 98**).

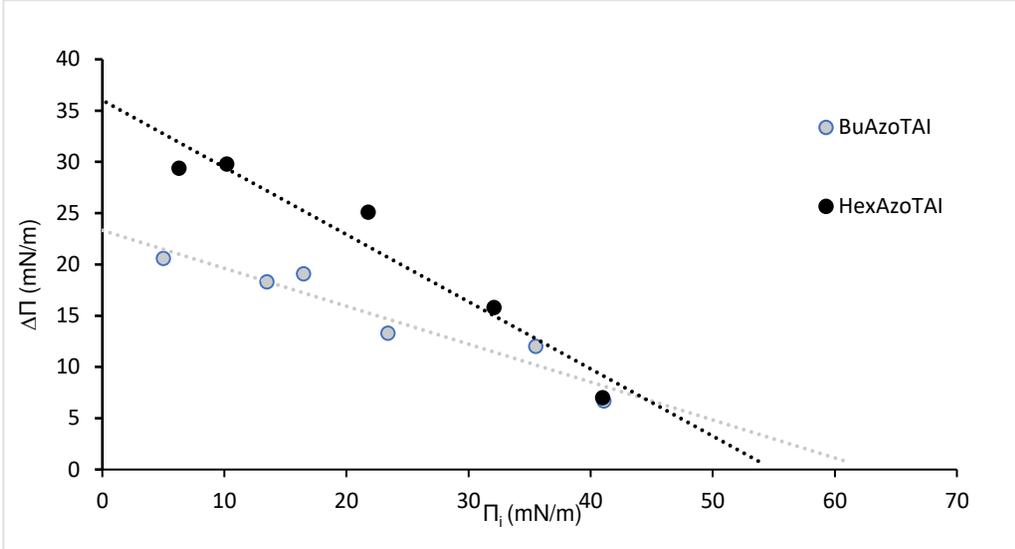


Figure 98 Variation de la pression de surface $\Delta\Pi$ de la monocouche de PE en fonction de la pression initiale Π_i

De ces courbes, deux paramètres peuvent être calculés. Le premier est la pression initiale différentielle ($d\Pi_0$) qui renseigne sur l'effet attracteur ou non des lipides. $d\Pi_0$ correspond à la différence entre $\Delta\Pi_0$ qui est l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire du graphe $\Delta\Pi$ vs Π_i , et Π_e qui est l'augmentation de la pression de surface à l'équilibre obtenue dans une expérience indépendante effectuée à la même concentration de AzoTAI mais sans lipides à l'interface. Le deuxième paramètre est la pression d'insertion maximale (MIP) qui reflète le pouvoir d'insertion du composé au sein d'une monocouche constitué d'un lipide déterminé. Cette valeur correspondant à l'intersection de la régression linéaire de la courbe avec l'axe des abscisses. Les valeurs de MIP et de $d\Pi_0$ sont renseignées dans le **Figure 99**.

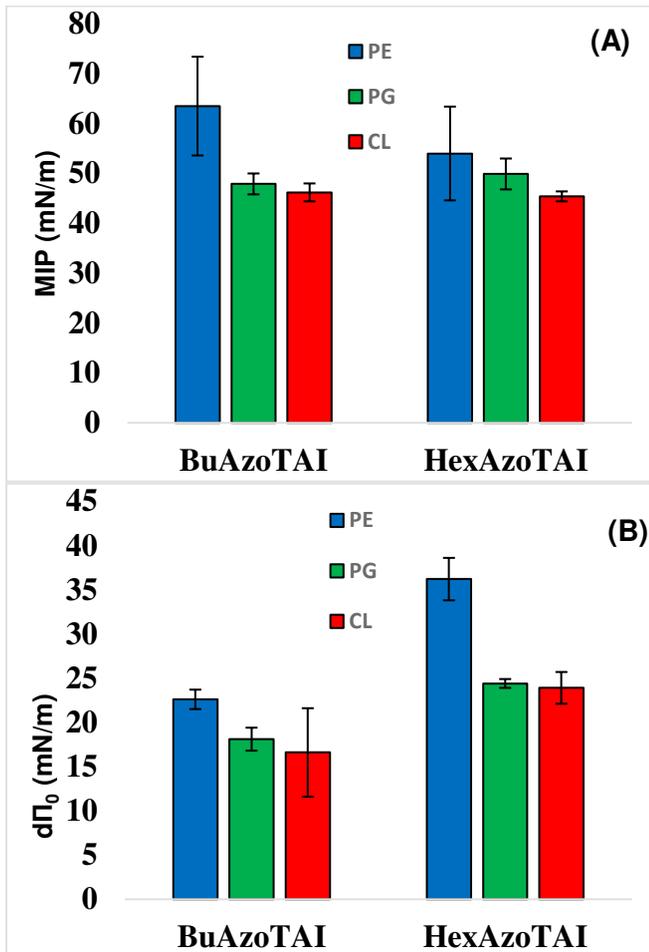


Figure 99 (A) MIP de PE, PG et CL pour **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** (B) $d\Pi_0$ de PE, PG et CL pour **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**

Toutes les valeurs de MIP sont supérieures à $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, qui est la valeur de la pression de surface estimée dans les membranes biologiques naturelles²⁷⁴. Ainsi, il semblerait que **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** soient capables de s'insérer dans des membranes plasmiques naturelles renfermant ces lipides. De plus, toutes les valeurs de $d\Pi_0$ sont positives. Cela confirme l'effet attracteur de chaque lipide vis-à-vis des deux molécules **AzoTAI**. Ces valeurs sont supérieures pour **HexAzoTAI** par rapport à **BuAzoTAI**, signifiant que l'augmentation de la longueur de la queue apolaire augmente cet effet attracteur. En outre, l'effet attracteur de PE est supérieur dans chaque cas. Cela constitue un indice supplémentaire quant aux fortes interactions spécifiques entre ces deux molécules et le PE, comme supposé précédemment sur base des données de perméabilisation des liposomes.

VII. Modélisation des interactions avec les lipides membranaires

La méthode de docking Hypermatrix a été utilisée pour étudier la spécificité d'interaction avec les lipides membranaires bactériens ainsi que pour avoir une description atomique de l'interaction entre les molécules **AzoTAI** et les lipides. Les différences entre les énergies d'interaction de **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** avec les lipides bactériens par rapport aux énergies d'interaction qu'elles peuvent avoir avec elles-mêmes sont affichées dans la **Figure 100**.

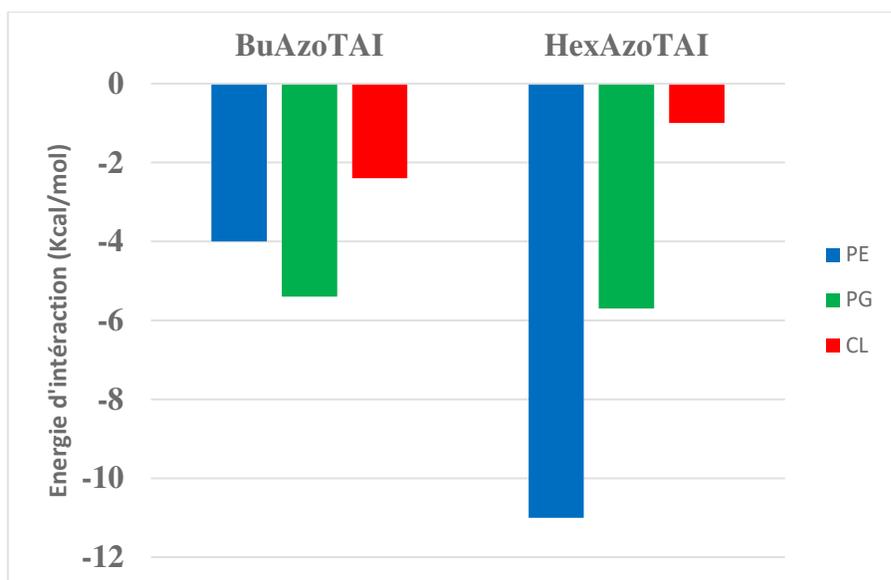


Figure 100 Energie d'interaction de **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** dans un assemblage multimoléculaire calculé par la méthode de docking Hypermatrix.

Les énergies d'interactions entre le PG et les **AzoTAI** sont toutes négatives (-5 Kcal.mol^{-1}). Pour PE, elles sont également négatives. Elles sont plus négatives pour **HexAzoTAI** ($-11 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) que pour **BuAzoTAI** (-4 Kcal.mol^{-1}). Pour le cas de CL, les énergies d'interactions sont faiblement négatives pour les deux composés. Il est donc peu probable que les composés **AzoTAI** interagissent avec ce lipide.

La représentation visuelle de l'assemblage multimoléculaire de PE, PG et CL avec **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** est présentée dans la **Figure 101**

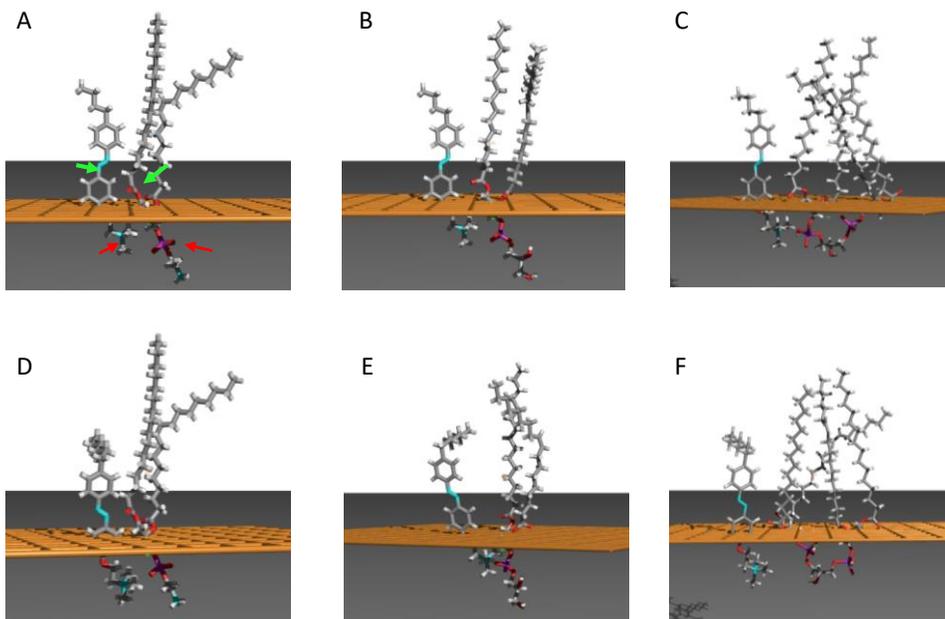


Figure 101 Interactions entre **BuAzoTAI** (A,B,C) et **HexAzoTAI** (D,E,F) et le PE (A et D), PG (B et E) et CL (C et F) obtenues en utilisant la méthode de docking HyperMatrix. Le plan orange représente l'interface hydrophobe (au-dessus du plan)/hydrophile (en dessous du plan). Les flèches vertes (Figure 100A) pointent les atomes pris pour référence pour le calcul des distances N-O et les flèches rouges (Figure 98A) pointent les atomes pris en référence pour les distances N-P.

Celle-ci montre clairement un positionnement différentiel de **HexAzoTAI** par rapport à la PE comparativement aux autres lipides et à **BuAzoTAI** avec tous les lipides. La répartition hydrophile / hydrophobe de **HexAzoTAI** correspond parfaitement à celle de PE (**Figure 100D**), c'est-à-dire que le groupe azo est en regard du groupe C=O de PE alors que ce n'est pas le cas pour les autres systèmes. Ce positionnement préférentiel conduit à des distances réduites entre **HexAzoTAI** et PE comme indiqué dans le tableau suivant.

Tableau 11 Distance N-O et N-P entre la molécule d'azobenzène et le phospholipide calculé par HyperMatrix

| | Distance N-O (Å) | Distance N-P (Å) |
|---------------------|------------------|------------------|
| BuAzoTAI-PE | 5,1 | 6,1 |
| HexAzoTAI-PE | 4,7 | 2,9 |
| BuAzoTAI-PG | 5,1 | 4,6 |
| HexAzoTAI-PG | 4,8 | 11,3 |
| BuAzoTAI-CL | 4,8 | 6,2 |
| HexAzoTAI-CL | 9,1 | 9,2 |

Le groupement azobenzène peut donc jouer un rôle positif dans l'interaction d'un amphiphile cationique avec la bicouche phospholipidique d'un micro-organisme.

VIII. Evaluation de la cytotoxicité et du pouvoir hémolytique

1. Cytotoxicité

Les azobenzènes étant connus pour leurs activités cytotoxiques²³⁹ et hémolytiques²⁴¹, les composés **EtAzoTAI**, **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**, jugés les plus prometteurs pour leurs activités biologiques, ont été testés afin de savoir si ces molécules pouvaient présenter des problèmes pour des applications en désinfection ou en santé humaine. La CC_{50} (Concentration à laquelle une cytotoxicité de 50% est observée) pour la culture *in vitro* de cellules du rein HEK-293 est référencée dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 CC₅₀ d'**EtAzoTAI**, **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** sur les cellules HEK-293

| | EtAzoTAI | BuAzoTAI | HexAzoTAI |
|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| CC ₅₀ (μg/mL) | >32 | 11,4 | 18,7 |

EtAzoTAI n'est pas cytotoxique, contrairement à **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**. Une cytotoxicité de 50% est un seuil qui est considéré comme sévère²⁷⁵. Il est intéressant de constater que la cytotoxicité n'augmente pas de manière linéaire avec la taille de la queue apolaire. En effet, le composé le plus cytotoxique est **BuAzoTAI**. Cette cytotoxicité peut poser problème pour les applications, néanmoins, cette concentration est relativement élevée. Cette valeur est supérieure à la CMI₅₀ d'**HexAzoTAI** pour les trois souches de bactéries testées et pour les 6 souches de champignons.

2. Pouvoir hémolytique

Les CH₁₀ et CH₅₀ (Concentrations pour lesquelles 10% et 50% de taux d'hémolyse sont observés respectivement) sur les érythrocytes humains sont indiqués dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 CH₁₀ et CH₅₀ d'**EtAzoTAI**, **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** sur les érythrocytes humains

| | EtAzoTAI | BuAzoTAI | HexAzoTAI |
|--------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| CH ₁₀ (μg/mL) | >32 | >32 | 14,6 |
| CH ₅₀ (μg/mL) | >32 | >32 | 21,8 |

Dans l'idéal, cette valeur doit être à une concentration de plusieurs centaines de microgrammes par millilitre de manière à ce que les molécules n'endommagent pas les érythrocytes. Ces valeurs sont atteintes par plusieurs peptides antibactériens^{276,277}. Parmi les **AzoTAI**, seul **HexAzoTAI** présente un pouvoir hémolytique. Ceci est probablement dû au fait que ce composé est le plus amphiphile, comme le reflète sa CMC qui est la plus faible de la famille **AzoTAI**. Le pouvoir hémolytique augmente fortement à partir de 15 μg/mL jusqu'à atteindre la CH₅₀ à 21,8 μg/mL. Le fait que le composé **HexAzoTAI** soit cytotoxique, il risque d'être plus difficile de trouver une application à ce composé sans risquer des atteintes à la santé humaine.

3. Conclusion

Une famille de quatre azobenzènes cationiques dérivés de la famille AzoOH a été obtenue par greffage d'une tête polaire de type triméthylammonium. Les gains en amphiphilicité de cette famille ont permis de déterminer des CMC chez tous les membres de cette famille et sont en faveur d'une capacité à s'insérer au niveau d'interfaces polaires/apolaires comme la membrane d'un champignon ou d'une bactérie. Les activités antibactériennes et antifongiques de ces composés augmentent avec l'augmentation de la taille de la queue apolaire. Le composé **HexAzoTAI** inhibe la croissance de toutes les souches et possède des CMI₅₀ assez faibles sur la plupart des champignons. Il a un effet bactéricide sur *E.coli* et bactériostatique sur *M.luteus*. Le composé **BuAzoTAI** possède de faibles CMI₅₀ uniquement sur les souches gram-positives, et a des CMI₅₀ un peu plus élevé sur les champignons. Il exerce un effet bactériostatique sur *M.luteus*. **EtAzoTAI** est encore moins actif sur les bactéries, et **HAzoTAI** ne l'est quasiment pas. Néanmoins, les activités cytotoxiques et hémolytiques des composés risquent de freiner les utilisations concrètes de ces composés. Les expériences de perméabilisation de liposomes ont été positives pour **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**, où ces deux molécules ont parfois perméabilisé à plus de 50% les liposomes même à des concentrations très faibles. En partant de ce constat, nous avons démontré que la perméabilisation de ces liposomes était liée à la proportion de PE dans la composition de ces liposomes. Les expériences sur les monocouches avec la balance à film de Langmuir ont permis de montrer la grande affinité de **BuAzoTAI** et d'**HexAzoTAI** pour les lipides membranaires bactériens, et leurs capacités à s'insérer dans un monocouche constitué de ces lipides. De même, la modélisation de l'interaction avec une bicouche lipidique implicite révèle que tous les composés de cette famille ont la possibilité de pénétrer au cœur de la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique, et qu'il est même possible pour ses molécules de se déplacer tout le long du cœur apolaire de cette bicouche, et que les meilleurs candidats possédaient une longue queue apolaire. Enfin, HyperMatrix a permis de déterminer que **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI** avaient des énergies d'interaction fortement négative avec PE et PG. Nous avons pu également constater l'importance que prenait la fonction azobenzène dans les interactions entre PE et **HexAzoTAI**. Cette affinité peut expliquer pourquoi cet azobenzène est ainsi bactéricide pour *E.coli*, qui possède naturellement une grande proportion de PE dans sa membrane plasmique. Ainsi, presque toutes les expériences montrent qu'il faut une grande tête apolaire aux composés **AzoTAI**, et que ces composés peuvent pénétrer la membrane plasmique des bactéries via des affinités entre ces molécules et les lipides bactériens. Le mode d'action fortement suggéré est donc lié à une perméabilisation de la membrane plasmique, entraînant une lyse de la cellule.

Dans le chapitre suivant de cette thèse nous allons comparer les familles entre elles afin d'apporter les premiers éléments d'une relation structure-activités des azobenzènes.

5

Relations STRUCTURE-FONCTION

I. Analyse des activités antibactériennes

Dans le but de tirer les premiers éléments permettant de dégager un début de relations structure-activité, une Analyse en Composante Principale (ACP) est effectuée sur les CMI₅₀ des 12 azobenzènes sur les trois souches de bactéries testées (*E.coli*, *M.luteus* et *B.subtilis*). Cet outil va permettre de voir quels sont les différents profils des activités antibactériennes des molécules en positionnant sur un axe en deux dimensions des points à proximité de vecteurs représentant les souches en fonction, ici, de leurs CMI₅₀ (**Figure 102**). Ainsi, plus une molécule aura une faible CMI₅₀ pour une souche donnée, plus elle se trouvera proche du vecteur correspondant à cette souche. Cela permet de donner graphiquement un aperçu de différents résultats. En abscisse et en ordonnée est indiquée la quantité d'informations que contient chaque axe. Il va ainsi être possible de voir en fonction de la longueur de la taille des queues apolaires si cette dernière permet d'augmenter ses propriétés antibactériennes.

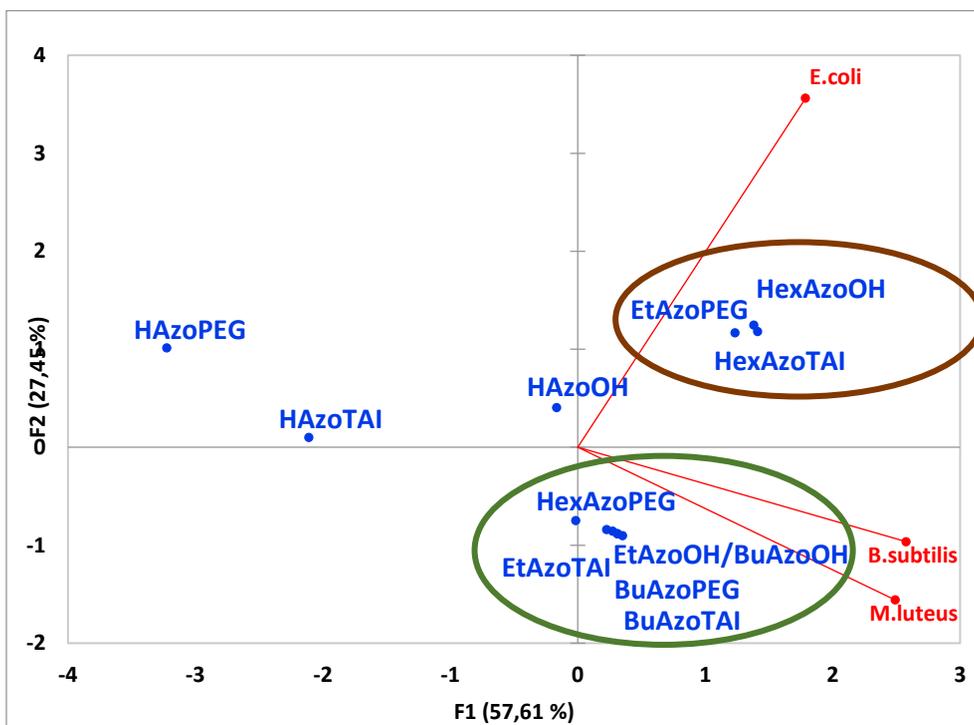


Figure 102 ACP des CMI₅₀ des azobenzènes en fonction de la souche bactérienne. A l'exception des molécules sans queue apolaire, ces azobenzènes se distinguent en deux groupes (Cercle vert et cercle marron).

Un angle aigu est formé entre les deux vecteurs correspondant aux deux souches gram-positives, reflétant leur similarité de réponse aux

antimicrobiens testés et soulignant ainsi l'importance des structures pariétale dans leur action antibactérienne. Ceci est confirmé par le fait que ces deux vecteurs et celui d'*E.coli* sont pratiquement orthogonaux, ce qui souligne une différence de réponse aux composés testés de la souche gram-négative. De plus, il apparait sur le graphe que les composés des trois familles avec une absence de queue apolaire sont les plus isolés et les plus lointains des trois vecteurs, indiquant leur manque d'efficacité sur les modèles bactériens utilisés. La proximité sur le graphique des molécules **HexAzoPEG**, **EtAzoTAI**, **EtAzoOH**, **BuAzoOH**, **BuAzoPEG** et **BuAzoTAI** font qu'elles forment un premier groupe d'azobenzènes (cercle vert dans la **Figure 99**), assez proche des vecteurs de *M.luteus* et *B.subtilis*. Ces molécules ont des CMI₅₀ assez faibles pour les bactéries gram-positives mais ont en revanche des activités nulles sur la croissance d'*E.coli* (**Tableau 13**). Un second groupe de molécules, constitué par **EtAzoPEG**, **HexAzoOH** et **HexAzoTAI**, est formé par les azobenzènes ayant de bonnes activités sur les trois souches de bactéries, elles sont positionnées entre les vecteurs des bactéries gram-positives et celui de la bactérie gram-négatives. Les CMI₅₀ des deux membres de chaque famille ayant les meilleures activités antibactériennes sont présentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 CMI₅₀ des composés ayant les meilleures activités antibactériennes

| | <i>E.coli</i> | <i>M.luteus</i> | <i>B.subtilis</i> |
|------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| BuAzoOH | >120 | 3,75 | 3,75 |
| HexAzoOH | 3,75 | 3,75 | 3,75 |
| EtAzoPEG | 15 | 7,5 | 7,5 |
| BuAzoPEG | >120 | 7,5 | 3,75 |
| BuAzoTAI | >30 | 2 | 2 |
| HexAzoTAI | 7,5 | 1 | 2 |

Les azobenzènes **HAzoOH**, **HAzoPEG** et **HAzoTAI** sont très éloignés des vecteurs car ce sont les composés avec les activités les plus faibles sur la croissance des bactéries. Ainsi, quelque soit le mode d'action de ces molécules, il est nécessaire qu'une chaîne carbonée soit positionnée en 4' d'un 4-azobenzène pour avoir un composé actif. Ensuite, le second groupe est formée par les **AzoOH** et les **AzoTAI** avec des tailles de queue apolaire intermédiaire (**EtAzoOH** et **BuAzoOH**, **EtAzoTAI** et **BuAzoTAI**) et par les **AzoPEG** avec les tailles de queue apolaire les plus importantes (**BuAzoPEG** et **HexAzoPEG**). Enfin, pour les **AzoOH** et les **AzoTAI**, la capacité antibactérienne augmente avec l'augmentation de la taille de la queue

apolaire. De même, ce n'est qu'à partir d'une longueur de chaîne carbonée de 6 que le composé acquiert une capacité antibactérienne vis-à-vis d'*E.coli* (gram-négative). Dans chacune des familles, une seule molécule montre une activité biologique sur la croissance d'*E.coli*. Pour **AzoOH** et **AzoTAI** c'est le composé avec une queue apolaire de type hexyl mais pour **AzoPEG** c'est le composé avec une queue apolaire de type éthyl. Les composés portant une tête polaire de type triéthylène glycol semblent donc être à part. Une hypothèse est que le pouvoir antibactérien des **AzoPEG** est dû à un mode d'action différent par rapport aux **AzoOH** et aux **AzoTAI**. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le mode d'action des **AzoTAI** est probablement lié aux interactions entre les azobenzènes et la membrane plasmique des bactéries (**Chapitre 4**), et par le fait qu'à priori les **AzoPEG** interagissent peu avec les lipides membranaires bactériens (**Chapitre 3**).

Si on regarde maintenant souche par souche, en commençant par les gram-positives. Il est possible de faire une autre ACP en prenant comme paramètre une donnée expérimentale ou une donnée issue de la modélisation afin de voir si tous ces résultats sont corrélés d'une part, et si les molécules adoptent une position proche par rapports à ces expériences, ou si au contraire ces dernières se positionneront de manière assez éloignés de ces vecteurs, bien qu'elles présentent une bonne activité antibactérienne. Cela pourra également mettre en valeur les potentielles proximités entre les composés de différentes familles et pourra ainsi renseigner sur l'éventuel mode d'action que pourront partager les azobenzènes. Ceci pourrait montrer visuellement à quel point l'activité de ces molécules est due aux interactions qu'elles peuvent avoir avec la membrane plasmique dans la mesure où nos expériences biophysiques ainsi que les modélisations étaient ciblés sur ce paramètre. Dans cette analyse, les paramètres suivants sont utilisés : la CMI₅₀, la CMC, la perméabilité des liposomes mimant la composition membranaire à un rapport d'un azobenzène par phospholipide, la différence d'énergie d'interaction des azobenzènes entre eux-mêmes et le phospholipide majoritaire de la composition membranaire de la bactérie (PG pour les gram-positives, PE pour *E.coli*) et enfin la contrainte énergétique totale calculée via IMPALA au centre de la bicouche phospholipidique. Les deux azobenzènes les plus actifs de chaque famille seront utilisés pour rendre les graphiques plus lisibles (**BuAzoOH**, **HexAzoOH**, **EtAzoPEG**, **BuAzoPEG**, **BuAzoTAI** et **HexAzoTAI**).

1. Cas de *Micrococcus luteus*

La Figure 103 présente cette ACP pour *M.luteus*.

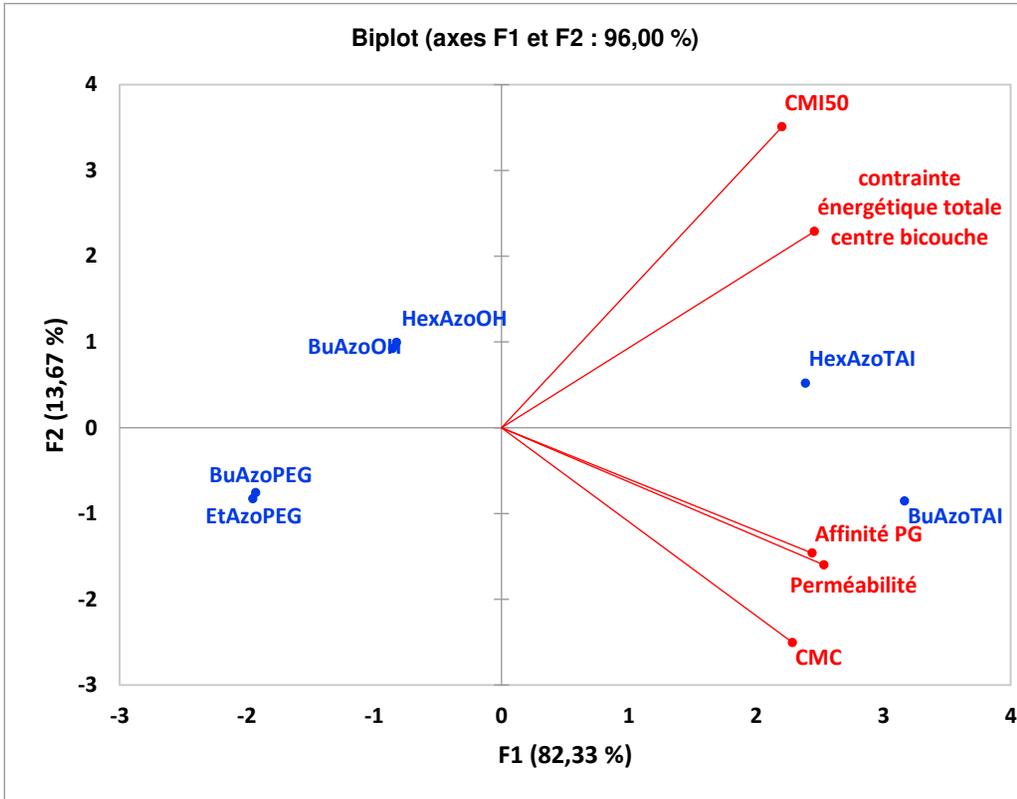


Figure 103 ACP de toutes les données expérimentales et issues de la modélisation dans le cas de *M.luteus*

Les deux membres de chaque famille sont assez proches, confirmant une similarité de réponse aux différents paramètres utilisés, car les différences entre chaque membre de chaque famille est ici simplement un allongement de la chaîne carbonée d'un groupement éthyle, ce qui correspond à une variation de la structure assez minime. Les **AzoTAI** sont assez proches de tous les vecteurs. Ceci était attendu étant donné que des interactions entre ces composés et la membrane plasmique ont été mises en évidence au moyen de la biophysique. Les familles **AzoOH** et encore plus **AzoPEG** sont très éloignés de tous les vecteurs représentant les expériences biophysiques relevant de l'étude des interactions entre ces composés et les lipides membranaires bactériens. Ce résultat était également attendu car les

modélisations ainsi que les expériences biophysiques ont montré un faible potentiel d'interaction entre ces molécules et les lipides membranaires bactériens. Ce graphique met donc en valeur la plus grande proximité de réponse aux tests utilisés entre les familles **AzoOH** et **AzoPEG**, par rapport aux **AzoTAI**. La proximité des vecteurs entre eux met également en valeur la cohérence de ces expériences pour déterminer le mécanisme d'action des molécules, à savoir une perméabilisation de la membrane interne. Il donne encore une interprétation plus visuelle des liens entre la famille **AzoTAI** et l'affinité avec la membrane plasmique.

2. Cas de *Bacillus subtilis*

Une autre ACP avec le même type de données mais pour le cas de *B.subtilis* se trouve dans le **Figure 104**.

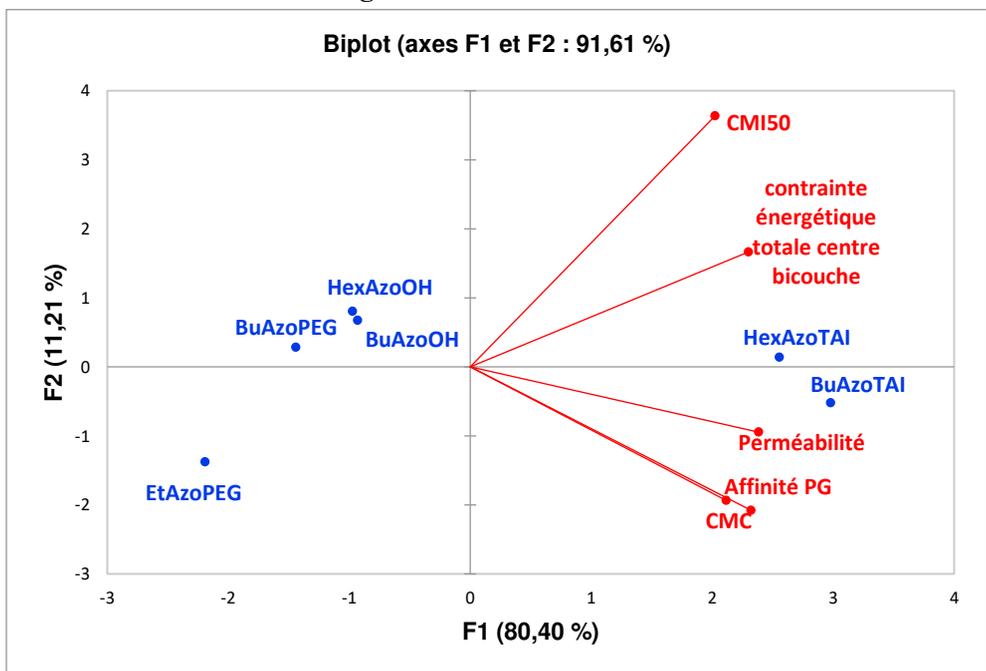


Figure 104 ACP de toutes les données expérimentales et issues de la modélisation dans le cas de *B.subtilis*

Les deux membres de chaque famille sont assez proches, à l'exception des **AzoPEG**, où **BuAzoPEG** est plus proche des **AzoOH** que d'**EtAzoPEG**. Ces quatre molécules sont assez éloignées des vecteurs, à l'exception de la **CMI₅₀**. Les **AzoTAI** sont assez proches de tous les vecteurs, de la même manière que pour *M.Luteus*, une autre bactérie gram-positives. La proximité des **AzoTAI** avec chaque vecteur peut s'expliquer par les fortes interactions

entre ces molécules et la membrane plasmiques. Les **AzoOH** et **AzoPEG** ayant également montré une absence totale de perméabilisation de perméabilisation de liposomes, ainsi que des énergies d'interaction avec PG très élevées, ils sont ainsi très éloignés de ces trois vecteurs. La relative proximité de tous les vecteurs montre une certaine cohérence entre les différentes expériences de biophysique et la modélisation. Cette ACP valide une fois encore les liens entre la bonne activité antibactérienne des **AzoTAI** et leurs fortes interactions avec la membrane plasmique, ainsi que la plus grande proximité entre la famille **AzoOH** et **AzoPEG** comparativement aux **AzoTAI**. Comme pour l'autre souche bactérienne gram positive utilisée, il semble que la meilleure corrélation avec les résultats de CMI obtenus soit avec l'énergie de rétention au centre de la bicouche en faisant un paramètre potentiellement intéressant pour la prédiction des activités antibactériennes de molécules ciblant les membranes.

3. Cas d'*Escherichia coli*

Une autre ACP traitant les mêmes données mais pour *E.coli* est montrée dans le **Figure 105**.

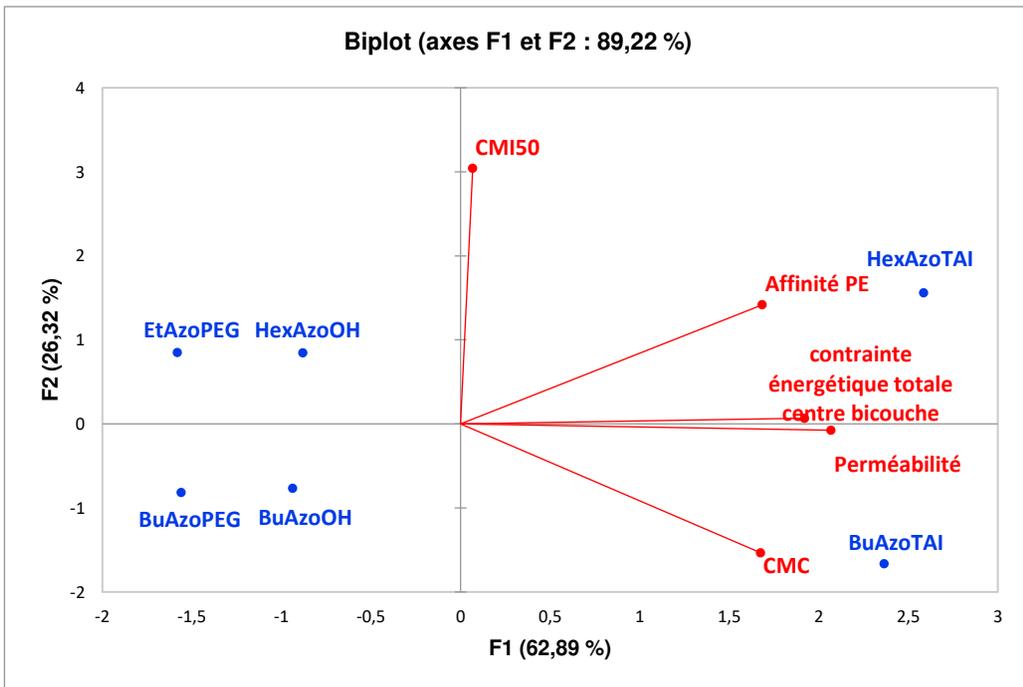


Figure 105 ACP de toutes les données expérimentales et issus de la modélisation dans le cas de *E.coli*

Il est intéressant de noter que les molécules ne sont plus regroupées par famille mais en fonction de leur pouvoir antibactérien : d'un côté il y a une proximité entre le vecteur CMI₅₀ et les molécules **HexAzoTAI**, **HexAzoOH** et **EtAzoPEG**. De l'autre, ce sont les molécules **BuAzoPEG**, **BuAzoOH** et **BuAzoTAI** qui sont proches. Les **AzoOH** et les **AzoPEG** sont très éloignés des autres vecteurs. **HexAzoTAI** est proche du vecteur CMI₅₀, contrainte énergétique totale au centre de la bicouche et perméabilité. Ce dernier reste néanmoins plus proche des vecteurs correspondant aux expériences biophysiques que du vecteur CMI₅₀. **BuAzoTAI**, quant à lui, est proche du vecteur CMC et perméabilité. **BuAzoPEG** et **BuAzoOH** n'ayant ni activité sur *E.coli*, ni de bonnes interactions avec la membrane plasmique, il est normal que ces composés soient très éloignés de tous les vecteurs. **EtAzoPEG** et **HexAzoOH** ont également de très mauvaises interactions avec la membrane plasmique mais ont une bonne CMI₅₀. Il est normal qu'ils se retrouvent assez proche du vecteurs CMI₅₀ mais éloignés des autres vecteurs. **HexAzoTAI** ayant une CMI₅₀ assez faible et une très bonne interaction avec la membrane plasmique, il se retrouve au centre de tous les vecteurs. **BuAzoTAI**, en revanche, n'a aucune activité sur la croissance d'*E.coli*, mais possède de fortes interactions avec la membrane plasmique. Il se retrouve donc très éloigné du vecteur CMI₅₀ mais assez proche des autres vecteurs, en particulier celui de CMC et perméabilité. Comparé aux ACP réalisées sur les souches gram-positives, on voit sur cette ACP que le vecteur CMI₅₀ est plus éloigné des autres vecteurs. Ceci signifie que l'activité antibactérienne est moins corrélée aux paramètres physico-chimique mesurant les interactions avec la membrane plasmique pour *E.coli* que pour les deux bactéries gram-positives, ceci peut s'expliquer par la présence du LPS dans la membrane externe des bactéries gram-négatives, celui-ci pouvant prémunir la bactérie contre les composés antibactériens⁹¹. La nature anionique de ce LPS en fait potentiellement un partenaire privilégié à cause de sa position externe par rapport à la membrane plasmique et par sa charge anionique²⁷⁸. En effet, les composés **AzoTAI**, de par leur nature cationique, ont pu avoir été empêchés d'interagir avec la membrane interne de la bactérie, comme avec les peptides antibactérien cationique²⁷⁹.

II. Conclusion sur les relations structure-fonction

Les différentes représentations graphiques ACP des données ont pu mettre en lumière le fort pouvoir d'interaction entre les **AzoTAI** et la membrane plasmique comparativement aux deux autres familles. La première ACP montre en particulier que l'activité antibactérienne n'est pas tant corrélée à la nature de la tête polaire qu'à la taille de la queue apolaire. Les ACP suivantes

montrent en revanche que la nature de la tête polaire permet à la molécule d'interagir ou non avec la membrane plasmique de la bactérie. Si on regarde les ACP dans leur ensemble, ces dernières ont ainsi pu mettre en valeur le fait que les différentes données issues de la modélisation et des expériences de biophysique sont relativement cohérentes entre elles au vu de la proximité des vecteurs associés dans les ACP. Nous avons néanmoins démontré que pour avoir une bonne activité antibactérienne, les interactions avec la membrane plasmiques ne sont pas le seul mode d'action à privilégier. La molécule pouvant être active via un ou plusieurs autres modes d'action. Bien que l'ensemble des données récoltées dans cette thèse ne permettent pas de déterminer quel est ce mode d'action. Des études précédentes suggèrent notamment une inhibition de l'ATP synthase²²⁸⁻²³⁰. Néanmoins, dans notre étude, il a été montré qu'une tête polaire cationique et une queue apolaire plutôt longue sont nécessaires afin de favoriser au maximum les interactions entre l'azobenzène et la membrane plasmique de la bactérie.

III. Perspectives

Les premiers éléments des relations structure-activité ayant été dégagés, il est maintenant nécessaire d'augmenter significativement le nombre de molécules synthétisées afin de pouvoir mesurer le réel impact des chaînes carbonées sur les propriétés physico-chimiques et biologiques. De plus, il serait intéressant de voir l'effet d'azobenzènes comportant des queues apolaires ramifiées (un groupement isopropyl par exemple) ou des chaînes cycliques (un cyclohexyl par exemple). sur leurs interactions avec les lipides membranaires des micro-organismes D'autres têtes polaires cationiques peuvent également être envisagées comme des phosphoniums²⁸⁰ ou des ammoniums quaternarisés avec des groupements autres que des groupements méthyls⁷⁵. Au niveau des activités antifongiques, la suite du travail serait de réaliser les mêmes expériences au niveau de l'étude du mécanisme d'action, mais sur des membranes biomimétiques de champignons et en utilisant les lipides fongiques majoritaires des parois de champignons.

Un paramètre limitant l'application de des **AzoTAI** les plus actifs est leur activité hémolytique et cytotoxique (Voir **Chapitre 4**). Néanmoins, si on envisage d'utiliser plutôt ces composés dans un dispositif de désinfection qui fonctionnera de manière entièrement isolée par rapport à l'utilisateur, la potentielle nocivité des composés ne sera plus un problème. Ce travail est en cours de protection intellectuelle

Une autre manière de réduire les activités cytotoxiques sur les cellules humaines des composés est de jouer sur sa nature azobenzénique. En effet, il est possible de faire changer la conformation du composé de la forme *trans* à

la forme *cis* en utilisant des ultraviolets. Ainsi avec une irradiation on pourrait jouer sur l'activation et l'inactivation des composés, principe sur lequel repose la photopharmacologie^{212,281}. Dans le cadre de la thèse, une étude préliminaire via l'outil de modélisation IMPALA a permis de mettre en évidence une différence de comportement de pénétration des composés *cis* et *trans* dans une bicouche phospholipidique implicite (**Figure 106**).

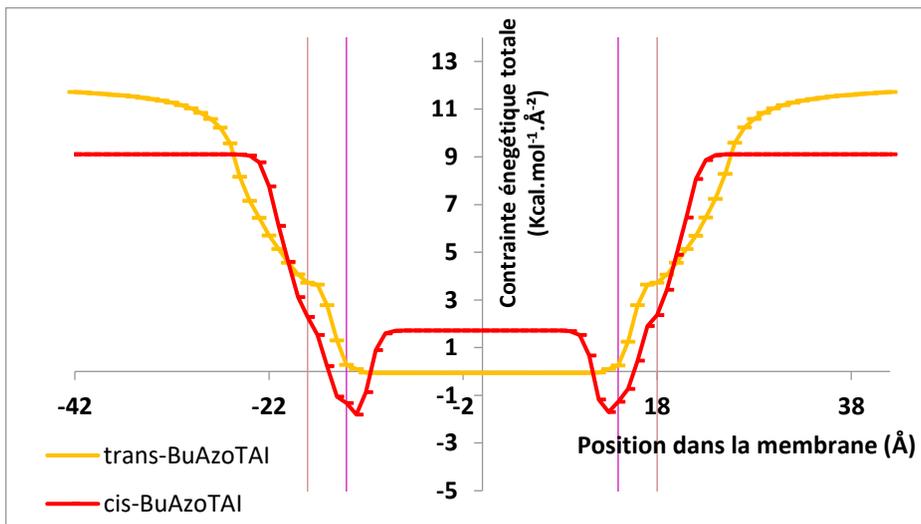


Figure 106 Evolution de la contrainte énergétique d'une molécule de BuAzoTAI en forme *cis* ou *trans* en fonction de la position de son centre de masse dans une membrane implicite selon le modèle IMPALA. La ligne marron verticale à -18\AA et $+18\text{\AA}$ correspond à la limite entre le milieu aqueux et la partie polaire de la bicouche. La ligne violette verticale à $-13,5\text{\AA}$ et $+13,5\text{\AA}$ correspond à la limite entre les têtes polaires et cœur hydrophobe de la bicouche implicite. La ligne verticale noire correspond au centre de la bicouche.

Une différence de domaine où les deux composés ont leur minimum énergétique est à observer. En effet, le **cis-BuAzoTAI** présente un minimum énergétique au niveau de l'interface tête polaire-cœur hydrophobes des lipides et une valeur d'énergie positive au centre de la membrane, conduisant à dire que cette molécule est peu encline à traverser la membrane alors que pour le composé **trans-BuAzoTAI**, cette traversée semble favorable. En évitant cette traversée, l'activité cytotoxique pourrait être réduite

MATÉRIELS & MÉTHODES

I. Réactifs, solvants et matériels utilisés en synthèse organique

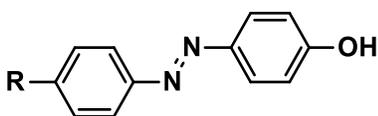
Les réactifs et solvants organiques proviennent d'Acros Organics (division de Fisher Bioblock Scientific), de Sigma-Aldrich ainsi que de SDS Carlo-Elba. Les réactifs n'ont subi aucun traitement préalable à leur utilisation. L'eau utilisée pour les synthèses et pour les différentes étapes de purification des milieux réactionnels provient d'un système Veolia Elga Purelab Flex afin de pouvoir être qualifiée d'eau Ultra Pure 18,2 M Ω . Les analyses CCM ont été réalisées sur des plaques d'aluminium (Merck Kieselgel 60F254, épaisseur de silice : 0,2 mm). Les bruts réactionnels ont été purifiés par un appareil de chromatographie flash Reveleris (avec des colonnes de silice (12 ou 40 g). Les analyses des masses moléculaires ont été réalisées par spectrométrie de masse avec une ionisation par impact électronique (GC-EI-HRMS). Les composés ont été identifiés par QExactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS (Thermo-Fisher, Villebon, France), en utilisant une colonne capillaire BP5MS (SGE, 30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m). Le gaz utilisé était de l'hélium à un flux de 1,2 mL.min⁻¹. La température du four était initialement de 50°C durant 2 minutes après l'injection, puis elle a été augmentée de 15 °C.min⁻¹ pour atteindre une température finale de 350 °C maintenue pendant 2 minutes. Un volume de 1 μ L de chaque échantillon a été injecté à 250 °C sans diviseur de flux ou avec diviseur de ratio 1/10. Le contrôle du spectromètre de masse et le traitement des spectres ont été réalisés en utilisant le logiciel Xcalibur (Version 4.0.27), la bibliothèque spectrale de masse NIST 2014 et la base de données HRMS élaborée de manière interne. Les spectres de masse ont été réalisés par ionisation par impact électronique (EI). Le système HRMS a acquis les données de l'ordre de 509-00 m/z à un mode de résolution de 60,000 avec une énergie de 70 eV pour l'ionisation par impact électronique. Le spectromètre a été calibré de manière externe. Ces analyses ont été réalisées avec le soutien de la Région Picardie, France (cofinancement d'équipements dans le cadre du projet CPER 2007-2020). Les spectres infrarouges ont été mesurés sur un appareil JASCO FT/IR-4100 type A équipé d'un ATR. Les analyses des composés en RMN ont été réalisées sur un appareil Brücker UltraShield 400MHz/54 mm Ultra long hold (UTC, Compiègne). Les déplacements chimiques, abrégés δ , sont donnés en ppm. Leurs valeurs sont basées sur le signal d'un étalon interne, le tétraméthylsilane (TMS). Les abréviations suivantes ont été utilisées dans la description des signaux :

| | | | | | | |
|----------|---------|--------------------------|---------|------------|------------|-----------|
| s | d | dd | t | q | quin | m |
| singulet | doublet | doublet de doublet | triplet | quadruplet | quintuplet | multiplet |

II. Protocoles généraux et caractérisation par produit des composés obtenus

1. Famille AzoOH

a) Procédure générale de synthèse des AzoOH



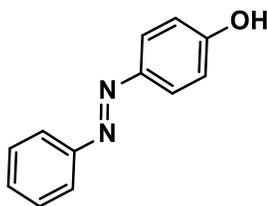
R = H : HAzoOH

R = Et : EtAzoOH

R = Bu : BuAzoOH

R = Hex : HexAzoOH

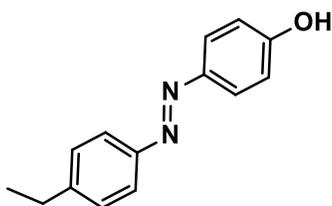
15 mL d'une solution aqueuse de NaNO_2 (8,4 g, 0,12 mol) est ajoutée goutte à goutte à une solution de 4-alkylaniline (0,1 mol) dans une solution d'HCl aqueux à 37% (25 mL) pendant 30 minutes. La réaction est réalisée dans un bain de glace et sous agitation pendant 1h. Le milieu contenant le sel de diazonium est versé à 0°C dans une solution de phénol (10,35 g, 0,1 mol) dans une solution de soude (50 mL, 6M). Le mélange est agité et placé dans un bain de glace à 0°C pendant 1h, il devient orange. Le précipité marron formé par la neutralisation de HCl est extrait avec 2x100 mL d'AcOEt. La phase organique est concentrée puis séché par MgSO_4 et filtrée. Le résidu obtenu est purifié sur silice (AcOEt/Cyclohexane 7:3) pour obtenir un solide orange.

HAzoOH - (E)-4-(phényldiazényl)phénol

Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸². On obtient 11,1 g d'un solide orange (56%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7,88 (m, 4H, CHAr) ; 7,48 (m, 3H, CHAr) ; 6,95 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, CHAr). ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 158,4 ; 152,8 ; 147,3 ; 130,6 ; 129,2 ; 125,2 ; 122,7 ; 115,9.

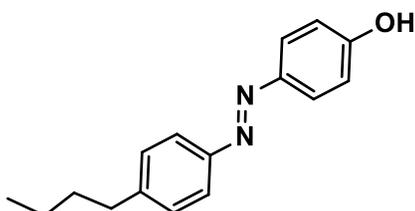
Proportion trans/cis : 100/0 (¹H NMR)

EtAzoOH - (E)-4-((4-éthylphényl)diazényl)phénol

Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸³. On obtient 16,96 g d'un solide orange (75%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7,86 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, CHAr) ; 7,81 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CHAr) ; 7,32 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CHAr) ; 6,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 2,72 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂) ; 1,28 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H, CH₃). ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 158,3 ; 150,9 ; 147,4 ; 147,2 ; 126,7 (x2) ; 125 (x2) ; 122,8 (x2) ; 116 (x2) ; 28,9 ; 15,6

Proportion trans/cis : 100/0 (¹H NMR)

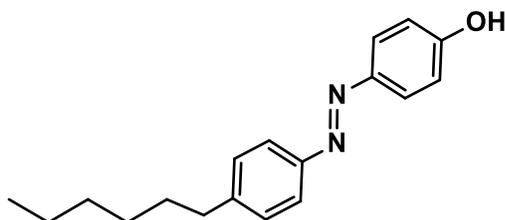
BuAzoOH - (E)-4-((4-butylphényl)diazényl)phénol

Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸⁴. On obtient 19,31 g d'un solide orange (76%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7,85 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 7,79 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, CHAr) ; 7,30 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, CHAr) ; 6,92 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 2,68 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, CH₂) ; 1,75 (s, 1H, OH) ; 1,64 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂) ; 1,37 (m, 2H, CH₂) ; 0,94 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃) ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 158,0 ; 150,8 ; 147,1 ; 145,9 ; 129,0 (2x) ; 124,7 (2x) ; 122,5 (2x) ; 115,7 (2x) ; 35,5 ; 33,4 ; 22,3 ; 13,9

Proportion trans/cis : 100/0 (¹H NMR)

HexAzoOH - (E)-4-((4-hexylphényl)diazényl)phénol

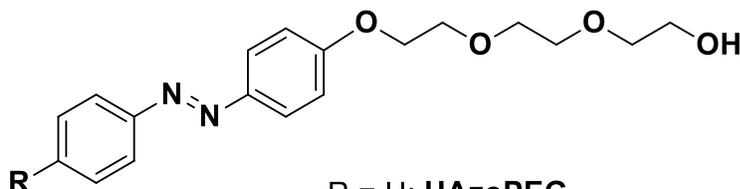


Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸⁴. On obtient 14,39 g d'un solide orange (51%).

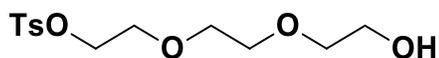
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 7,86 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, CHAr) ; 7,8 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CHAr) ; 7,3 (, d, *J* = 8,6 Hz, 2H, CHAr) ; 6,94 (m, 2H, CHAr) ; 2,67 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂) ; 1,65 (m, 2H, CH₂) ; 1,32 (m, 6H, CH₂) ; 0,89 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃) ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 158,3 ; 150,3 ; 147,2 ; 146,2 ; 129,2 (x2) ; 125 (x2) ; 122,7 (x2) ; 115,9 (x2) ; 36 ; 31,9 ; 31,4 ; 29,1 ; 22,7 ; 14,2.

Proportion trans/cis : 100/0 (¹H NMR)

2. Famille AzoPEG



R = H; **HAzoPEG**
 R = Et; **EtAzoPEG**
 R = Bu; **BuAzoPEG**
 R = Hex; **HexAzoPEG**

a) Triéthylène glycol monotosylate

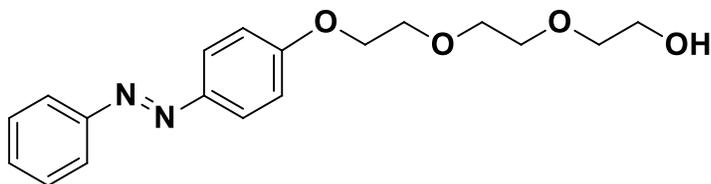
Du triéthylène glycol (11g, 73,3 mmol), de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (45 mg, 0,7 mmol) et de la triéthylamine (2,6 mL, 19,1 mmol) sont mis en solution dans 95 mL de dichlorométhane à 5°C. Le chlorure de tosyle (3,5 g, 18,1 mmol) est ajouté à 5°C. Le mélange est agité pendant 4h, puis lavé avec une solution de HCl 1N, H₂O puis NaCl saturé. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur silice (AcOEt/Cyclohexane 7:3) pour obtenir une huile jaune (3,74 g, 68%).

Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁶⁰. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, CHAr) ; 7,35 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, CHAr) ; 4,16 (t, *J* = 4,7 Hz, 2H, CH₂) ; 3,70 (q, *J* = 4,7 Hz, 4H, CH₂) ; 3,61 (m, 4H, CH₂) ; 3,57 (t, *J* = 4,5 Hz, 2H, CH₂) ; 2,45 (s, 3H, CH₃) ; 2,32 (s, 1H, OH) ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 144,8 ; 132,8 ; 129,7 (2x) ; 127,9 (2x) ; 72,4 ; 70,7 ; 70,2 ; 69,1 ; 68,6 ; 61,6 ; 21,6

b) Procédure générale de synthèse des AzoPEG

Le triéthylène glycol monotosylate (3,74 g, 12,3 mmol) est dissous dans de l'acétonitrile (150 mL) et sous N₂ en présence de K₂CO₃ (8,42 g, 61,5 mmol). Une solution de 4-alkyl-4'-hydroxyazobenzène (15,4 mmol) dans de l'acétonitrile (50 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte. Le milieu est porté à reflux pendant 18h sous N₂. En fin de réaction, le solvant est évaporé sous vide puis le résidu est dissout dans du dichlorométhane avant d'être lavée avec une solution de NaCl aqueuse saturée (3 x 100 mL). Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄ et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié sur silice (AcOEt/Cyclohexane 7:3).

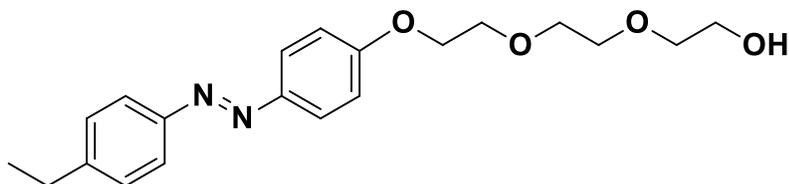
HAzoPEG - (E)-2-(2-(2-(4-(phényldiazényl)phénoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol



Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸⁵. On obtient 1,6 g d'un solide orange (36%). (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (dd, $J_1 = 14,6$, $J_2 = 8,3$ Hz, 4H, CHAR) ; 7,42 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, CHAR) ; 6,95 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, CHAR) ; 4.14 (s, 2H, CH₂) ; 3.82 (m, 2H, CH₂) ; 3,66-3,70 (m, 6H, CH₂) ; 3.55 (s, 2H, CH₂) 2.33 (s, 1H, OH) ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 161,2 ; 152,7 ; 147,1 ; 130,4 ; 129 ; 124,7 ; 122,6 ; 114,8 ; 72,5 ; 71,3 ; 70,9 ; 69,6 ; 67,6 ; 61,8

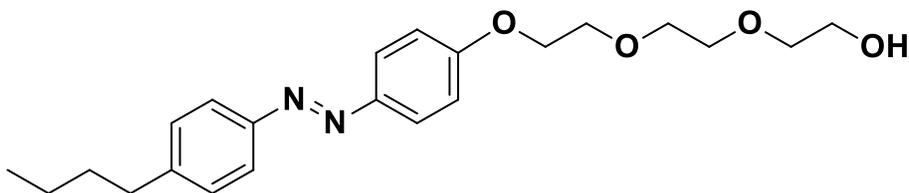
Proportion trans/cis : 93/7 (¹H NMR)

EtAzoPEG - (E)-2-(2-(2-(4-(4-éthylphényl)diazényl)phénoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol



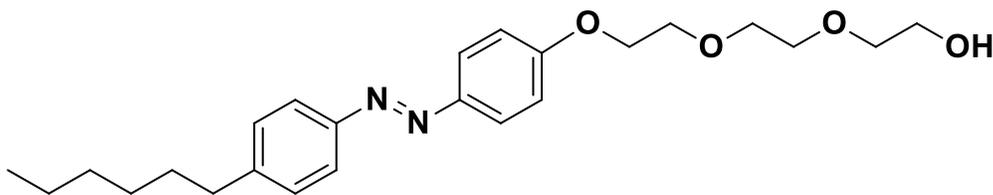
On obtient 2,2 g d'un solide orange (50%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 (d, $J = 8$ Hz, 2H, CHAR) ; 7,81 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, CHAR) ; 7,31 (d, $J = 8$ Hz, 2H, CHAR) ; 7,02 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, CHAR) ; 4,20 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H, CH₂) ; 3,88 (t, $J = 4,7$ Hz, 2H, CH₂) ; 3,67-3,74 (m, 6H, CH₂) ; 3,61 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H, CH₂) ; 2,71 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH₂) ; 2,42 (s, 1H, OH) ; 1,27 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, CH₃) ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 161 ; 151 ; 147,2 ; 147,1 ; 128,5 (2x) ; 124,6 (2x) ; 122,6 (2x) ; 114,8 (2x) ; 72,5 ; 70,8 ; 70,4 ; 69,6 ; 67,6 ; 61,7 ; 28,8 ; 15

Proportion trans/cis : 88/12 (¹H NMR)

BuAzoPEG - (E)-2-(2-(2-(4-((4-butylphényl)diazényl)phénoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol

Les données sont cohérentes avec la littérature⁴. On obtient 1,28g d'un solide orange (27%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 7,82 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, CHAr) ; 7,31 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, CHAr) ; 7,04 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 4,24 (t, *J* = 4,6 Hz, 2H, CH₂) ; 3,92 (t, *J* = 4,6 Hz, 2H, CH₂) ; 3,72–3,78 (m, 6H, CH₂) ; 3,65 (t, *J* = 4,4 Hz, 2H, CH₂) ; 2,70 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, CH₂) ; 2,34 (s, 1H, OH) ; 1,66 (quin, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂) ; 1,39 (sex, *J* = 7,4 Hz, 2H, CH₂) ; 0,96 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃) ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) δ 160,9 ; 150,9 ; 147,2 ; 145,8 ; 129 (2×) ; 124,5 (2×) ; 122,5 (2×) ; 114,7 (2×) ; 72,4 ; 70,8 ; 70,3 ; 69,6 ; 67,6 ; 61,7 ; 35,5 ; 33,4 ; 22,3 ; 13,9

Proportion trans/cis : 94/6 (¹H NMR)

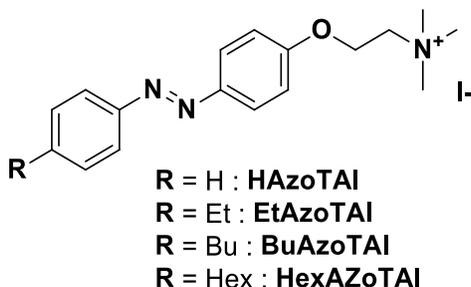
HexAzoPEG - (E)-2-(2-(2-(4-((4-hexylphényl)diazényl)phénoxy)éthoxy)éthoxy)éthanol

Les données sont cohérentes avec la littérature²⁸⁶. On obtient 1,68g d'un solide orange (33%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,89 (d, *J* = 9 Hz, 2H, CHAr) ; 7,79 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, CHAr) ; 7,29 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, CHAr) ; 7,02 (d, *J* = 9 Hz, 2H, CHAr) ; 4,20 (t, *J* = 4,6 Hz, 2H, CH₂) ; 3,89 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H, CH₂) ; 3,69–3,75 (m, 6H, CH₂) ; 3,61 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H, CH₂) ; 2,67 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, CH₂) ; 1,64 (q, *J* = 7,8 Hz, 2H, CH₂) ; 1,28–1,36 (m, 6H,

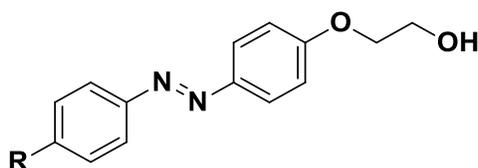
CH₂) ; 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH₃) ¹³C (100 MHz, CDCl₃) 160,9 ; 150,9 ; 147,2 ; 145,9 ; 129 (2x) ; 124,5 (2x) ; 122,5 (2x) ; 114,8 (2x) ; 72,5 ; 70,8 ; 70,3 ; 69,2 ; 67,6 ; 61,7 ; 35,9 ; 31,7 ; 31,3 ; 29 ; 22,6 ; 14,1.

Proportion trans/cis : 92/8 (¹H NMR)

3. Famille AzoTAI

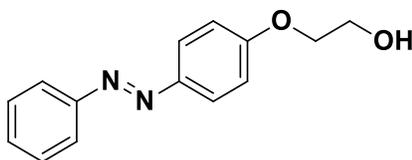


a) Procédure générale de synthèse de 4-alkyl-4'-(2-hydroxyéthoxy)azobenzène



Le 4-alkyl-4'-hydroxyazobenzène (**HAzoOH**, **EtAzoOH**, **BuAzoOH** ou **HexAzoOH**, 19,7 mmol) est dissous dans du *n*-butanol (15 mL) en présence de K₂CO₃ (2,72g, 19,7 mmol) et KI (116 mg, 0,7 mmol). Après l'ajout, goutte-à-goutte, du 2-chloroéthanol (1,4 mL, 19,7 mmol), le mélange est chauffé à 115°C pendant 6h. Puis on rajoute 1,4 mL supplémentaire de 2-chloroéthanol et on laisse chauffer pendant 18h supplémentaires. En fin de réaction, le produit est filtré et lavé à l'eau (2x 15 mL), puis extrait au dichlorométhane (3x 60 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée sous vide. Le résidu est ensuite purifié sur silice (AcOEt, Cyclohexane 7:3).

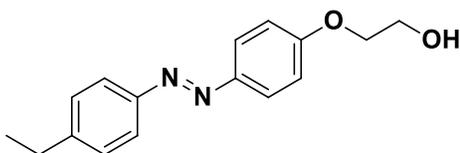
2-(hydroxyéthoxy)azobenzène



Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸⁷. On obtient 3,76 g d'un solide orange (79%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (dd, *J*₁= 8,1 Hz, *J*₂= 12,7 Hz, 4H, CHAr) ; 7,48 (m, 3H, CHAr) ; 7,01 (d, *J*= 8,9 Hz, 2H, CHAr) ; 4,14 (m, 2H, CH₂) ; 3,99 (m, 2H, CH₂). ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 161,1 ; 152,8 ; 147,3 ; 130,3 ; 129,1 (x2) ; 124,9 (x2) ; 122,7 (x2) ; 114,9 (x2) ; 69,6 ; 61,3

Proportion trans/cis : 96/4 (¹H NMR)

4-éthyl-4'-(2-hydroxyéthoxy)azobenzène



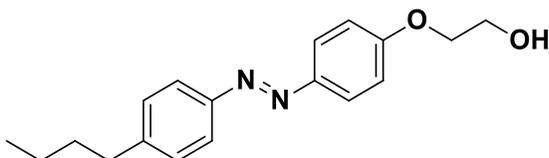
On obtient 3,57 g d'un solide orange (67 %) *m*_p = 126 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,83 (d, *J*= 9,2 Hz 2H, CHAr) ; 7,74 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H, CHAr) ; 7,21 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H, CHAr) ; 6,95 (d, *J*= 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 4,10 (m, 2H, CH₂) ; 3,93 (m, 2H, CH₂) ; 2,65 (q, *J*= 7,6 Hz, 2H, CH₂) ; 1,21 (t, *J*= 7,6 Hz, 3H, CH₃). ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 160,9 ; 151,1 ; 147,5 ; 147,4 ; 128,6 (x2) ; 124,7 (x2) ; 122,8 (x2) ; 114,9 (x2) ; 69,6 ; 61,5 ; 29 ; 15,6

Proportion trans/cis : 86/14 (¹H NMR)

FTIR : 3334 cm⁻¹ (w), 2931 cm⁻¹ (w), 1597 cm⁻¹ (s), 1500 cm⁻¹ (s), 1252 cm⁻¹ (s), 1079 cm⁻¹ (s), 1045 cm⁻¹ (s), 848 cm⁻¹ (s), 841 cm⁻¹ (w)

HRMS (ESI+) *m/z* calculé pour [(C₁₆H₁₈N₂O₂)H]⁺ 368.2696.1227 trouvé 368.2709

4-butyl-4'-(2-hydroxyéthoxy)azobenzène

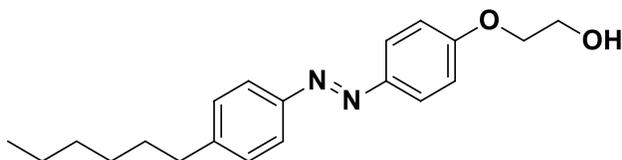


Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸⁸. On obtient 2g d'un solide orange (34%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,88 (d, *J*= 9 Hz, 2H, CHAr) ; 7,81 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H, CHAr) ; 7,31 (d, *J*= 8,5 Hz, 2H, CHAr) ; 7,03 (d, *J*= 9 Hz, 2H, CHAr) ; 4,17 (t, *J*= 4,5 Hz, 2H, CH₂) ; 4,01 (m, 2H, CH₂) ; 2,68 (t, *J*= 7,7 Hz, 2H, CH₂) ; 1,64 (m, 2H, CH₂) ; 1,38 (sex, *J*= 7,4 Hz, 2H, CH₂) ; 0,95 (t, *J*= 7,3 Hz, 3H, CH₃) ¹³C (100 MHz, CDCl₃) : δ 158 ;

150,8 ; 147,1 ; 145,9 ; 129,0 (x2) ; 124,7 (x2) ; 122,5 (x2) ; 115,7 (x2) ; 35,5 ; 33,4 ; 22,3 ; 13,9

Proportion trans/cis : 93/7 (^1H NMR)

4-hexyl-4'-(2-hydroxyéthoxy)azobenzène



Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁸⁸. On obtient 2,57 g d'un solide orange (40%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,90 (d, $J= 8,4$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,80 (d, $J= 7,8$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,30 (d, $J= 7,7$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,03 (d, $J= 8,4$ Hz, 2H, CHAr) ; 4,16 (m, 2H, CH_2) ; 4,01 (m, 2H, CH_2) ; 2,67 (t, $J= 7,6$ Hz, 2H, CH_2) ; 1,65 (m, 2H, CH_2) ; 1,31 (m, 6H, CH_2) ; 0,89 (m, 3H, CH_3) ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 160,9 ; 151,1 ; 147,5 ; 146,2 ; 129,2 (x) ; 124,7 (x2) ; 122,7 (x2) ; 114,9 (x2) ; 69,6 ; 61,5 ; 36 ; 31,4 ; 29,1 ; 22,7 ; 19,1 ; 14,2

Proportion trans/cis : 82/18 (^1H NMR)

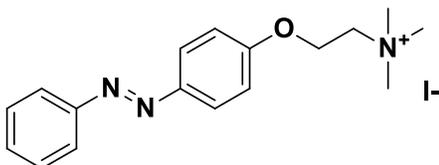
b) Procédure générale de synthèse des iodure de 4-alkyl-4'-(2-N,N,N-triméthylaminioéthoxy)-azobenzène

Le 4-alkyl-4'-(2-hydroxyéthoxy)azobenzène (4 mmol) est dissous dans du dichlorométhane (25 mL) en présence de triéthylamine (1 mL, 6,2 mmol) et de DMAP (15 mg, 2mol%). Le chlorure de tosyle (1,2 g, 6,2 mmol) est ajouté petit à petit à 0°C. Le mélange est laissé sous agitation pendant 24h à température ambiante. En fin de réaction, le brut est lavé successivement par NH_4Cl saturé (2x 20 mL), NaHCO_3 saturé (2 x 20 mL) et H_2O (2 x 20 mL). On évapore ensuite la phase organique et on obtient un solide orange. Le produit se dégradant facilement, il est mis immédiatement en réaction sans purification.

Le 4-alkyl-4'-(2-tosyloxyéthoxy)azobenzène (4 mmol) est dissous dans 80 mL d'un mélange acétone/eau (2:1). 1,4 mL d'une solution de diméthylamine à 40% dans l'eau est ajouté (8,2 mmol) est ajoutée. On chauffe à 60°C avec un reflux pendant 24h. On évapore l'acétone, puis on extrait avec 3 x 40 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont lavées avec K_2CO_3 saturé (2 x 40 mL) et H_2O (2 x 40 mL) puis séchée avec MgSO_4 et

évaporées sous vide. On solubilise le résidu obtenu dans 150 mL d'éther éthylique. Puis 2 mL d'iodométhane (32,2 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pendant 24 à température ambiante. Le produit est ensuite filtré sous vide.

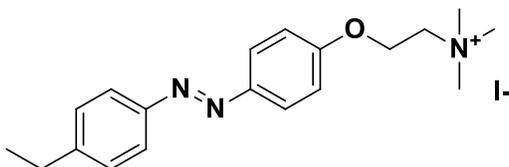
HAzoTAI – iodure de (E)-N,N,N-triméthyl-2-(4-(phényldiazényl)phénoxy)éthylammonium



Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁶⁵. On obtient 164 mg d'un solide orange (10% sur les deux dernières étapes). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,95 (d, *J*= 8,2 Hz, 2H, CHAr) ; 7,86 (d, *J*= 7,3 Hz, 2H, CHAr) ; 7,58 (d, *J*= 6,9 Hz, 2H, CHAr) ; 7,22 (d, *J*= 8,5 Hz, 2H, CHAr) ; 4,59 (s, 2H, CH₂) ; 3,83 (s, 2H, CH₂) ; 3,2 (s, 9H, CH₃) ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 160,1 ; 151,9 ; 146,6 ; 143,4 ; 129,4 (x2) ; 124,6 (x2) ; 122,3 (x2) ; 115,4 (x2) ; 64 ; 62,1 ; 53,1 (x3)

Proportion trans/cis : 76/24 (¹H NMR)

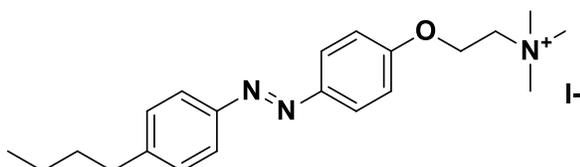
EtAzoTAI – iodure de (E)-2-(4-((4-éthylphényl)diazényl)phénoxy)-N,N,N-triméthyléthylammonium



Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁶⁶. On obtient 439 mg d'un solide orange (25% sur les deux dernières étapes). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,92 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 7,80 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CHAr) ; 7,36 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, CHAr) ; 7,12 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, CHAr) ; 4,6 (s, 2H, CH₂) ; 3,93 (m, 2H, CH₂) ; 3,26 (s, 9H, CH₃) ; 2,72 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H, CH₂) ; 1,27 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H, CH₃) ¹³C (1400 MHz, CDCl₃) : δ 161,1 ; 149,1 ; 149 ; 129,5 (x2) ; 125,6 (x2) ; 124,1 (x2) ; 115,8 (x2) ; 66,5 ; 63,5 ; 54,9 (x3) ; 38,4 ; 29,8 ; 16

Proportion trans/cis : 88/12 (^1H NMR)

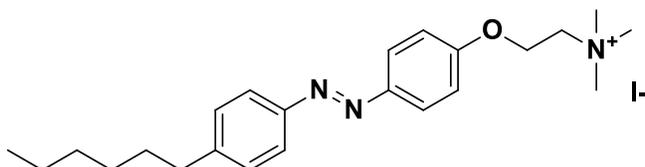
BuAzoTAI - - iodure de (E)-2-(4-((4-butylphényl)diazényl)phénoxy)-N,N,N-triméthyléthanammonium



Les données obtenues sont cohérentes avec la littérature²⁶⁷. On obtient 1,85 g d'un solide orange (99% sur les deux dernières étapes). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,92 (d, $J= 9.0$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,79 (d, $J= 8.3$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,33 (d, $J= 8.3$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,18 (d, $J= 9.0$ Hz, 2H, CHAr) ; 4,60 (m, 2H, CH_2) ; 3,92 (m, 2H, CH_2) ; 3,31 (s, 3H, CH_3) ; 2,69 (t, $J= 7.7$ Hz, 2H, CH_2) ; 1,64 (m, 2H, CH_2) ; 1,39 (m, 2H, CH_2) ; 0,95 (t, $J= 7.4$ Hz, 3H, CH_3) ^{13}C (1400 MHz, CDCl_3) : δ 161,1 ; 152,2 ; 149,0 ; 147,6 ; 130,3 (2x) ; 125,7 (2x) ; 123,7 (2x) ; 116,2 (2x) ; 66,5 ; 63,5 ; 3 x 54,9 ; 36,5 ; 34,8 ; 23,4 ; 14,3

Proportion trans/cis : 90/10 (^1H NMR)

HexAzoTAI - - iodure de (E)-2-(4-((4-hexylphényl)diazényl)phénoxy)-N,N,N-triméthyléthanammonium



On obtient 500 mg d'un solide orange (25% sur les deux dernières étapes). $m_p = 196$ °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,79 (d, $J = 8$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,34 (d, $J = 8$ Hz, 2H, CHAr) ; 7,18 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, CHAr) ; 4,6 (m, 2H, CH_2) ; 3,92 (m, 2H, CH_2) ; 3,31 (s, 9H, CH_3) ; 2,7 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH_2) ; 1,66 (m, 2H, CH_2) ; 1,34 (m, 6H, CH_2) ; 0,90 (m, 3H, CH_3) ^{13}C (1400 MHz, CDCl_3) : δ 161,1 ; 152,3 ; 149,1 ; 147,1 ; 130,2 (x2) ; 125,7 (x2) ; 123,7 (x2) ; 116,2 (x2) ; 66,5 ; 63,5 ; 49 (x3) ; 36,8 ; 32,9 ; 32,6 ; 30 ; 23,7 ; 14,4

Proportion trans/cis : 80/20 (^1H NMR)

FTIR : 2928 cm^{-1} (w), 1737 cm^{-1} (w), 1600 cm^{-1} (w), 1500 cm^{-1} (w), 1243 cm^{-1} (s), 1155 cm^{-1} (w), 1059 cm^{-1} (w), 953 cm^{-1} (s), 843 cm^{-1} (s)

HRMS (ESI+) m/z calculé pour $[(\text{C}_{46}\text{H}_{38}\text{I}_2\text{N}_6\text{O}_2)\text{H}]^+$ 863.4443.1227 trouvé 863.4522

III. Solvants et matériels utilisés pour la physico-chimie

Les adsorptions aux interfaces air/eau à température ambiante avec une balance à film de Langmuir équipée d'une sonde (MicroTrough X, Kibron Helsinki, 15.9 cm^2). Les azobenzènes étaient préalablement dissous dans du DMSO et dispersée (20 μL) dans la sous-phase (Eau MilliQ) jusqu'à atteindre des gammes de concentrations de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 1750 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La sous-phase était sous agitation durant toute l'expérience. La mesure de tension de surface était réalisée après que cette valeur soit stabilisée ($\Delta\Pi_{\text{eq}}$). La CMC a été déterminée en traçant le graphique $\Delta\Pi_{\text{eq}}=f(C)$ à l'intersection entre la régression linéaire de la rupture de pente et du plateau.

IV. Matériels, milieux de culture et techniques pour les propriétés biologiques

1. Les bactéries

Les souches bactériennes utilisées sont *E.coli* ATCC 25922TM (American Type Culture Collection, USA), *M.luteus* CRBIP 107660 (Institut Pasteur, France) et *B.subtilis* ATCC 6051 (American Type Culture Collection, USA). Elles sont cultivées sur milieu solide Trypto-caséine soja (TSA, CONDA, Madrid) et incubées à 30°C à l'obscurité dans un incubateur (SANYO, incubator, MIR-253) pendant 24h. Les boîtes de culture sont ensuite conservées en chambre froide à 4°C ou utilisées pour inoculer 5 mL d' milieu liquide 24h avant le test en microplaque (Glucose 10 g/l, KCl 0,250 g/L, NaH_2PO_4 6,464 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10,408 g/L, MgSO_4 0.244g/L, NO_3NH_4 1 g/L, MgCl_2 0,05 g/L; pH = 7).

2. Les levures

Les levures utilisées sont *C.krusei* (isolat du laboratoire TIMR/MAB), *C.kefyr* MUCL 46196 (BCCM/MUCL Agro-food & Environmental Fungal Collection, Louvain, Belgique) et *C.tropicalis*. MUCL29893 (BCCM/MUCL Agro-food & Environmental Fungal Collection, Louvain, Belgique). Elles sont conservées sur milieu solide PDA (Potato Dextrose Agar, Pronadisa). Elles sont repiquées sur milieu PDA chaque semaine et mise en croissance

dans un incubateur BINDER à 23°C suivant des alternances luminosité/obscurité (12h-12h). Les boîtes de culture sont ensuite conservées en chambre froide à 4°C. Les pré-cultures liquides se font dans un milieu liquide par ajout d'une colonie une semaine avant le test en microplaque (Glucose 5g/L, KCl 0,250 g/L, NaH₂PO₄ 1,544 g/l, Na₂HPO₄.2H₂O 0,008 g/L, MgSO₄ 0.244g/L, NO₃NH₄ 1 g/L, MgCl₂ 0,05 g/L; pH = 5).

3. Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux utilisés sont *F.solani* (MUCL 35016), *A.alternata* (MUCL 53651) et *C.cladosporioides* (Isolat du laboratoire (Source : sol pollué)). Elles sont conservées en milieu solide PDA (Potato Dextrose Agar, Pronadisa). Elles sont repiquées chaque semaine sur milieu PDA et cultivées dans un incubateur BINDER à 23°C en suivant des alternances luminosité/obscurité (12h-12h). Certaines boîtes de culture sont ensuite conservées en chambre froide à 4°C. On récupère les spores de boîtes incubées au minimum 3 semaines en utilisant une solution d'eau stérile avec du Tween 80. Un comptage des spores est effectué avec une cellule de Malassez de manière à calculer la dilution à réaliser pour obtenir 2.10⁴ spores pour 20 mL d'inoculum dans un milieu liquide (Glucose 5g/L, KCl 0,250 g/L, NaH₂PO₄ 1,544 g/l, Na₂HPO₄.2H₂O 0,008 g/L, MgSO₄ 0.244g/L, NO₃NH₄ 1 g/L, MgCl₂ 0,05 g/L; pH = 5).

4. Détermination de l'inhibition

Une suspension d'inoculum de bactéries ou de levures avec une densité optique (DO) comprise en 0,1 et 0,2 (Ultraspec10 Amersham Bioscience) est préparée à partir d'une pré-culture de respectivement 24h ou 1 semaine. Une suspension de spores calibrée à 2.10⁴ spores/mL est utilisée comme inoculum pour les champignons filamenteux. Les tests sont effectués sur microplaques de 96 puits (Thermo Scientific, Nunc™ Edge) en triplicata. Les azobenzènes sont mis en solution dans du DMSO, puis stérilisés par filtration à l'aide de filtre-seringues (VWR, 13 mm, membrane en PTFE, pores de 2 µm de diamètre). Les suivis de croissances sont réalisés avec un spectrophotomètre Thermo Fisher Scientific Multiskan GO (Type 1510). Pour les bactéries, il est réglé pour effectuer des mesures de DO à 600 nm de chaque puits toutes les 15 min pendant 24h pour suivre la cinétique de croissance. Pour les champignons, la mesure de DO à 600 nm est ponctuelle (toutes les 24h) et le couvercle de la microplaque est essuyé contre la condensation avant chaque mesure. Dans les puits de la microplaque, 196-198 µL d'inoculum et 2-4 µL de solution-mères des composés testés dissous dans le DMSO. (%_{DMSO} total = 1-2 %). Pour AzoOH et AzoPEG, les concentrations testées sont 120, 60, 30, 15, 7,5 et 3,75 µg.mL⁻¹. Pour AzoTAI, les concentrations testées sont 30, 15, 7,5, 3,75, 2, et 1 µg.mL⁻¹. Des témoins-positifs où sont rajoutés

uniquement 2-4 μL de DMSO sont réalisés afin de tester la toxicité du solvant. D'autres témoins-positifs sont réalisés avec 196-198 μL d'inoculum et 2-4 μL de milieu de culture afin de mesurer la croissance normale du champignon ou de la bactérie. Un contrôle négatif était également réalisé avec du milieu de culture sans inoculum afin de vérifier l'absence de contamination. L'absorbance éventuelle des composés testés et son évolution au cours du temps étaient également mesurées avec des puits contenant 196-198 μL de milieu de culture et 2-4 μL de solution-mère de ces composés sans inoculum. Le pourcentage d'inhibition était calculé comme ceci :

$$\%_{Inhibition} = \left(1 - \frac{DO_{var\ test}}{DO_{var\ control}} \right) \times 100$$

$DO_{var\ test}$ correspond à la différence de DO entre le point le plus élevé de la courbe de croissance et le point le plus bas sur la courbe. $DO_{var\ control}$ correspond à la différence de DO entre le point le plus élevé et le point le plus bas sur la courbe du témoin. On considère comme valeur de CMI_{50} la valeur de la concentration à partir de laquelle on a 50% d'inhibition ou plus.

5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Un inoculum liquide contenant 1500 UFC/mL est préparé et mesuré à partir d'une courbe d'absorbance en fonction du nombre d'UFC préétablie. Trois tubes de 15 mL contenant 5 mL d'inoculum sont incubés sous agitation en présence de concentrations en composé testé correspondant à la CMI_{50} , 2 CMI_{50} et 4 CMI_{50} pendant 24h à 30°C. Ils sont ensuite centrifugés (Eppendorf 5804R) à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé, le culot est suspendu dans 5 mL de milieu minérale puis il est inoculé une boîte sur milieu TSA est inoculé en utilisant un inoculateur spirale (Easyspirale, Interscience) à raison de 500 μL /boîte. Les expériences sont réalisées en triplicata. Le comptage des colonies est fait après 24h en utilisant les consignes du constructeur de l'inoculateur afin de remonter aux concentrations en bactéries viables cultivables. La concentration minimale bactéricide (CMB) d'un composé correspond à la concentration minimale à laquelle on a éliminé 99,99% des bactéries d'un inoculum^{270,271}.

V. Matériels et méthode pour la formation de liposomes et les mesures de perméabilisation des liposomes

Les liposomes ont été préparés en utilisant différents mélanges de lipides membranaires bactériens provenant d'Avantis Polar Lipids. La composition des liposomes mimant la composition de la membrane interne des bactéries est indiquée dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 Proportion molaire des lipides membranaires bactériens utilisés pour former les liposomes

| | <i>E.coli</i> | <i>M.luteus</i> | <i>B.subtilis</i> | Sans PE |
|------|---------------|-----------------|-------------------|---------|
| PE | 70% | | 14% | |
| PG | 25% | 63% | 81% | 94% |
| CL | 5% | 5% | 5% | 6% |
| DGDG | | 32% | | |

Le dimannosyldiacylglycérol (DMDG) a été substitué par du digalactosyldiacylglycérol dans la composition de *M.luteus* car le DMDG n'est pas commercial.

Deux à trois mmols du mélange de lipide souhaité est dissous dans 5 mL d'un mélange chloroforme/méthanol dans un ballon à fond rond. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif et le ballon est recouvert de papier aluminium. Il est laissé une nuit dans un dessiccateur sous vide. Le film est ensuite réhydraté avec 5 mL de solution tampon (Tris-HCl, pH = 7,4) contenant 10 mM de calcéine. Le ballon est ensuite fermé et recouvert de parafilm, puis vortexé pendant 3 minutes. Il est ensuite placé dans un bain-marie pendant une heure à 37°C. Toutes les 10 minutes, le ballon est sorti du bain pour être vortexé pendant 1 minute. Le contenu du ballon est ensuite transvasé dans un tube en polypropylène. Cinq cycles de congélation/décongélation sont effectués en plongeant le tube successivement dans de l'azote liquide et dans le bain-marie. Le tube en polypropylène est ensuite fixé sur le sonificateur en veillant à ce que les parois du tube ne touchent pas l'appareil et baigne dans un bain de glace. Une quinzaine de cycles comprenant deux minutes de sonification à 0,5 W et une minute de pause sont effectués. La dispersion de liposomes est ensuite transférée dans des Eppendorf afin d'être centrifugée à 6200 rotations par minutes pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau

tube en polypropylène. Le contenu du tube est transféré dans une colonne de Sephadex 75 (1,7 g, préalablement chauffé à 150°C pendant deux heures sous agitation). La fraction jaune claire récupérée contient les liposomes uniquement. La perméabilisation des liposomes est suivie par spectrométrie de fluorescence, et correspond à la perte de calcéine par les liposomes. Les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation sont respectivement de 472 et 512 nm. Le pourcentage de perméabilisation est calculé selon la formule :

$$\%_{\text{Perméabilisation}} = \left| \frac{F_{\text{exp}} - F_{\text{DMSO}}}{F_{\text{triton}} - F_{\text{DMSO}}} \right| \times 100$$

Avec F_{exp} qui correspond à la fluorescence mesurée mesurée à une concentration d'azobenzène connue, F_{DMSO} correspond à la fluorescence mesurée simplement en présence de DMSO à la même concentration, F_{triton} correspond au signal mesuré en présence d'une solution de Triton X-100 à 0,5%, qui correspond à la perméabilisation totale de tous les liposomes.

Le dosage des phospholipides se fait en les diluant 5 fois dans la solution tampon (Tris-HCl, pH = 7,4). On prépare en triplicatas des tubes contenant 30 et 60 μL de tampon, et des tubes contenant 30 et 60 μL de liposomes. Ces tubes sont placés au sécheur à 60°C pendant 30 minutes. En parallèle, 4 tubes contenant 400 μL d'une solution étalon de phosphate à 125 μM sont préparés, ainsi que 4 tubes contenant de l'acide perchlorique. Les tubes secs sont ensuite tous remplis avec 400 μL d'acide perchlorique, puis vortexés. Ils sont ensuite plantés au quart dans un banc de sable à 200°C pendant 45 minutes avec une bille placée au-dessus. Ensuite, on retire les billes, puis sont rajoutés 2 mL d'une solution de molybdate d'ammonium à 2,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et 100 μL d'une solution de réactif de Fisk et Subbarow à 160 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Chaque tube est ensuite vortexé brièvement. Les tubes sont ensuite portés au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes, puis refroidis dans un bain de glace jusqu'à température ambiante. Le contenu des tubes est transféré dans des cuves, puis la lecture se fait au spectrophotomètre à 830 nm.

VI. Logiciels utilisés pour réaliser les ACP

Les ACP ont été réalisées avec le logiciel XLStats, et utilisent une matrice de corrélation de Pearson.

VII. Matériels et méthode pour l'évaluation de la capacité d'adsorption sous une monocouche lipidique

Les expériences d'adsorption sont réalisées sur une balance à film de Langmuir KSV Minitrough (Helsinki, Finland, $7.5 \times 20 \text{ cm}^2$). La sous-phase est constituée d'eau MilliQ ($\sim 80 \text{ mL}$) à une température constante de $22^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$. Cette sous-phase est sous agitation permanente. Le PE, PG ou CL pur est dissous dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1 v/v). Le solvant est dispersé à la surface de l'interface eau/air de manière à atteindre la pression de surface initiale désirée. Après 20 minutes d'attente, le temps que le solvant s'évapore et que le film se stabilise, une solution de **BuAzoTAI** ou d'**HexAzoTAI** est dissoute dans le DMSO et est injectée en dessous de la monocouche formée. La concentration finale en azobenzène dans la sous-phase est de $10\mu\text{M}$. Leur adsorption dans la monocouche lipidique est mesurée par l'augmentation de la tension superficielle. Une expérience témoin est réalisée avec le même volume de DMSO seul, et aucune variation de tension superficielle n'a été observée. La pression maximale d'insertion (MIP) correspond à la pression de surface au-delà de laquelle l'adsorption de molécules n'est plus possible. Cette valeur a été obtenue en faisant la régression linéaire de la courbe $\Delta\Pi=f(\Pi_i)$ et son intersection avec l'axe des abscisses. La différence de pression initiale $d\Pi_0$ correspond à la différence entre $\Delta\Pi_0$ qui correspond à l'intersection entre l'axe des ordonnées et la courbe $\Delta\Pi=f(\Pi_i)$, et Π_e qui correspond à l'augmentation de la tension superficielle à l'équilibre obtenue dans une expérience indépendante avec la même concentration en azobenzène mais sans monocouche lipidique à l'interface eau/air. Une valeur positive de $d\Pi_0$ signifie que le lipide exerce un effet attracteur sur la molécule testée. A l'inverse, une valeur négative de $d\Pi_0$ révèle que le lipide exerce un effet répulsif sur la molécule testée. Les barres d'erreur sur le MIP et le $\Delta\Pi_0$ sont calculées selon cette méthode²⁸⁹.

VIII. Modélisation

1. Insertion dans la bicouche (IMPALA)

L'insertion de la molécule dans une bicouche a été modélisée par la procédure IMPALA comme décrite par Ducarme et al⁶. Une membrane implicite dont les propriétés varient en fonction de la profondeur le long d'un axe z est simulée par le logiciel. Les propriétés de cette membrane sont représentées par les contraintes énergétiques totales. La molécule d'azobenzène est déplacée par le logiciel le long de l'axe z d'un ångström par un ångström d'un opposé à l'autre de la membrane. Les énergies de

réentions sont calculées pour chaque position. Un profil de contrainte énergétique en fonction de la position dans la membrane est obtenu.

2. Interaction avec les lipides bactériens (HyperMatrix)

Les modèles 3D des molécules d'azobenzènes et des lipides ont été obtenus en utilisant le logiciel HyperChem (Hypercube, Inc.). La géométrie des molécules a été optimisée en utilisant la méthode « steepest-descent » avec champ de force MM+ et une analyse systématique des angles de torsion en utilisant la méthode de structure d'arbres des configurations les plus probables, décrite précédemment ⁷. La structure de la molécule la plus probable correspond à la molécule ayant l'énergie de conformation la plus faible. Les énergies d'interaction avec chacun des lipides ont été calculées avec la méthode de docking Hypermatrix. La molécule d'azobenzène est placée dans une position fixe au centre du système et est orientée à l'interface hydrophile/hydrophobe pendant que le lipide (lui aussi orientée selon l'interface hydrophile/hydrophobe) est positionné autour de l'azobenzène par des rotations et des translations (plus de 10 millions de configurations sont testées). Pour chacune de ces positions, une énergie d'interaction est calculée suivant une formule de champ de force développée au laboratoire²⁹⁰. Les énergies d'interaction ainsi que toutes les coordonnées des assemblages sont dans une matrice et classés selon des valeurs décroissantes. La première correspondance stable entre ces deux valeurs est considérée comme le meilleur assemblage entre ces deux molécules.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Lucet, J.-C. Infections nosocomiales : Ces microbes qu'on « attrape » à l'hôpital <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales> (accessed Jun 18, 2019).
- (2) Dann, A. B.; Hontela, A. Triclosan: Environmental Exposure, Toxicity and Mechanisms of Action: Triclosan: Exposure, Toxicity and Mechanisms of Action. *J. Appl. Toxicol.* **2011**, *31* (4), 285–311. <https://doi.org/10.1002/jat.1660>.
- (3) Weatherly, L. M.; Gosse, J. A. Triclosan Exposure, Transformation, and Human Health Effects. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* **2017**, *20* (8), 447–469. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1399306>.
- (4) Billamboz, M.; Mangin, F.; Drillaud, N.; Chevrin-Villette, C.; Banaszak-Léonard, E.; Len, C. Micellar Catalysis Using a Photochromic Surfactant: Application to the Pd-Catalyzed Tsuji–Trost Reaction in Water. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 493–500. <https://doi.org/10.1021/jo401737t>.
- (5) Drillaud, N.; Banaszak-Léonard, E.; Pezron, I.; Len, C. Synthesis and Evaluation of a Photochromic Surfactant for Organic Reactions in Aqueous Media. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (21), 9553–9561. <https://doi.org/10.1021/jo301466w>.
- (6) Ducarme, Ph.; Rahman, M.; Brasseur, R. IMPALA: A Simple Restraint Field to Simulate the Biological Membrane in Molecular Structure Studies. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1998**, *30* (4), 357–371. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980301\)30:4<357::AID-PROT3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980301)30:4<357::AID-PROT3>3.0.CO;2-G).
- (7) Lins, L.; Brasseur, R.; Malaisse, W. J. Conformational Analysis of Non-Sulfonylurea Hypoglycemic Agents of the Meglitinide Family. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50* (11), 1879–1884. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)80003-3).
- (8) Daniau, C.; Lucie, L.; Blanchard, H.; Bernet, C.; Caillet-Vallet, E.; Glorion, S.; Buoconore, L.; Aupée, M.; Péfau, M.; Simon, L.; et al. *Enquête Nationale de Prévalence Des Infections Nosocomiales et Des Traitements Anti-Infectieux En Établissements de Santé, France, Mai-Juin 2017*; Santé Publique France, 2018; p 12.
- (9) Mainardi, J.-L. Résistance aux antibiotiques : Un phénomène massif et préoccupant <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/resistance-antibiotiques> (accessed Jun 18, 2019).
- (10) Munita, J. M.; Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*; Kudva, I. T., Cornick, N. A., Plummer, P. J., Zhang, Q., Nicholson, T. L., Bannantine, J. P., Bellaire, B. H., Eds.; American Society of Microbiology, 2016; pp 481–511. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- (11) Yayan, J.; Ghebremedhin, B.; Rasche, K. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. *PloS One* **2015**, *10* (10), e0139836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139836>.

- (12) Gross, M. Antibiotics in Crisis. *Curr. Biol.* **2013**, *23* (24), R1063–R1065. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.057>.
- (13) Sharma, C.; Kumar, N.; Pandey, R.; Meis, J. F.; Chowdhary, A. Whole Genome Sequencing of Emerging Multidrug Resistant *Candida Auris* Isolates in India Demonstrates Low Genetic Variation. *New Microbes New Infect.* **2016**, *13*, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.07.003>.
- (14) Zhang, J.; Snelders, E.; Zwaan, B. J.; Schoustra, S. E.; Meis, J. F.; van Dijk, K.; Hagen, F.; van der Beek, M. T.; Kampinga, G. A.; Zoll, J.; et al. A Novel Environmental Azole Resistance Mutation in *Aspergillus Fumigatus* and a Possible Role of Sexual Reproduction in Its Emergence. *mBio* **2017**, *8* (3), e00791-17, /mbio/8/3/e00791-17.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.00791-17>.
- (15) Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G.; Harbarth, S.; Hindler, J. F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18* (3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- (16) Chambers, H. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus Aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7* (2), 178–182. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010204>.
- (17) Sievert, D. M.; Rudrik, J. T.; Patel, J. B.; McDonald, L. C.; Wilkins, M. J.; Hageman, J. C. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in the United States, 2002–2006. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46* (5), 668–674. <https://doi.org/10.1086/527392>.
- (18) Vikram, H. R.; Havill, N. L.; Koeth, L. M.; Boyce, J. M. Clinical Progression of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Vertebral Osteomyelitis Associated with Reduced Susceptibility to Daptomycin. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43* (10), 5384–5387. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5384-5387.2005>.
- (19) Drug-resistant Tuberculosis <https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/en/> (accessed Jun 19, 2019).
- (20) Sheno, S.; Friedland, G. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A New Face to an Old Pathogen. *Annu. Rev. Med.* **2009**, *60* (1), 307–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.053107.103955>.
- (21) Bush, K.; Fisher, J. F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65* (1), 455–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>.
- (22) Yigit, H.; Queenan, A. M.; Anderson, G. J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J. W.; Steward, C. D.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F. C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella Pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.
- (23) Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F. Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *11* (3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>.

- (24) Davies, J. Where Have All the Antibiotics Gone? *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. J. Can. Mal. Infect. Microbiol. Medicale* **2006**, *17* (5), 287–290. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>.
- (25) Bassetti, M.; Merelli, M.; Temperoni, C.; Astilean, A. New Antibiotics for Bad Bugs: Where Are We? *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2013**, *12* (1), 22. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-22>.
- (26) Dias, C.; Rauter, A. P. Membrane-Targeting Antibiotics: Recent Developments Outside the Peptide Space. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (3), 211–228. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0254>.
- (27) Fjell, C. D.; Hiss, J. A.; Hancock, R. E. W.; Schneider, G. Designing Antimicrobial Peptides: Form Follows Function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *11*, 37.
- (28) Raveschot, C.; Cudenneq, B.; Coutte, F.; Flahaut, C.; Fremont, M.; Drider, D.; Dhulster, P. Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>.
- (29) Wang, G.; Li, Y.; Li, X. Correlation of Three-Dimensional Structures with the Antibacterial Activity of a Group of Peptides Designed Based on a Nontoxic Bacterial Membrane Anchor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (7), 5803–5811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410116200>.
- (30) Malanovic, N.; Lohner, K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals* **2016**, *9* (3), 59. <https://doi.org/10.3390/ph9030059>.
- (31) Maturana, P.; Martinez, M.; Noguera, M. E.; Santos, N. C.; Disalvo, E. A.; Semorile, L.; Maffia, P. C.; Hollmann, A. Lipid Selectivity in Novel Antimicrobial Peptides: Implication on Antimicrobial and Hemolytic Activity. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *153*, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.003>.
- (32) De Zotti, M.; Biondi, B.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Stella, L.; Park, Y.; Hahn, K.-S. Trichogin GA IV: An Antibacterial and Protease-Resistant Peptide. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15* (9), 615–619. <https://doi.org/10.1002/psc.1135>.
- (33) Makovitzki, A.; Avrahami, D.; Shai, Y. Ultrashort Antibacterial and Antifungal Lipopeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (43), 15997–16002. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606129103>.
- (34) Bandyopadhyay, S.; Ng, B. Y.; Chong, C.; Lim, M. Z.; Gill, S. K.; Lee, K. H.; Sivaraman, J.; Chatterjee, C. Micelle Bound Structure and DNA Interaction of Brevinin-2-Related Peptide, an Antimicrobial Peptide Derived from Frog Skin: MEMBRANE INTERACTION AND DNA BINDING OF ANTIMICROBIAL BREVININ-2-RELATED PEPTIDE. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20* (10), 811–821. <https://doi.org/10.1002/psc.2673>.
- (35) Pandey, B. K.; Ahmad, A.; Asthana, N.; Azmi, S.; Srivastava, R. M.; Srivastava, S.; Verma, R.; Vishwakarma, A. L.; Ghosh, J. K. Cell-Selective Lysis by Novel Analogues of Melittin against Human Red Blood Cells and *Escherichia Coli*. *Biochemistry* **2010**, *49* (36), 7920–7929. <https://doi.org/10.1021/bi100729m>.
- (36) Legrand, B.; Mathieu, L.; Lebrun, A.; Andriamanarivo, S.; Lisowski, V.; Masurier, N.; Zirah, S.; Kang, Y. K.; Martinez, J.; Maillard, L. T. Thiazole-

- Based γ -Building Blocks as Reverse-Turn Mimetic to Design a Gramicidin S Analogue: Conformational and Biological Evaluation. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (22), 6713–6720. <https://doi.org/10.1002/chem.201402190>.
- (37) Lau, Q. Y.; Li, J.; Sani, M.-A.; Sinha, S.; Li, Y.; Ng, F. M.; Kang, C.; Bhattacharjya, S.; Separovic, F.; Verma, C.; et al. Elucidating the Bactericidal Mechanism of Action of the Linear Antimicrobial Tetrapeptide BRBR-NH 2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2018**, *1860* (8), 1517–1527. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.004>.
- (38) Epand, R. F.; Savage, P. B.; Epand, R. M. Bacterial Lipid Composition and the Antimicrobial Efficacy of Cationic Steroid Compounds (Ceragenins). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2007**, *1768* (10), 2500–2509. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.023>.
- (39) Niemirowicz, K.; Surel, U.; Wilczewska, A. Z.; Mystkowska, J.; Piktel, E.; Gu, X.; Namiot, Z.; Kułakowska, A.; Savage, P. B.; Bucki, R. Bactericidal Activity and Biocompatibility of Ceragenin-Coated Magnetic Nanoparticles. *J. Nanobiotechnology* **2015**, *13* (1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0093-5>.
- (40) Leszczyńska, K.; Namiot, A.; Cruz, K.; Byfield, F. J.; Won, E.; Mendez, G.; Sokołowski, W.; Savage, P. B.; Bucki, R.; Janmey, P. A. Potential of Ceragenin CSA-13 and Its Mixture with Pluronic F-127 as Treatment of Topical Bacterial Infections: Antibacterial Activity of CSA-13/F-127 Mixture. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *110* (1), 229–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04874.x>.
- (41) Epand, R. F.; Pollard, J. E.; Wright, J. O.; Savage, P. B.; Epand, R. M. Depolarization, Bacterial Membrane Composition, and the Antimicrobial Action of Ceragenins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (9), 3708–3713. <https://doi.org/10.1128/AAC.00380-10>.
- (42) Jana, S.; Deb, J. K. Molecular Understanding of Aminoglycoside Action and Resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70* (2), 140–150. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0>.
- (43) Herzog, I. M.; Feldman, M.; Eldar-Boock, A.; Satchi-Fainaro, R.; Fridman, M. Design of Membrane Targeting Tobramycin-Based Cationic Amphiphiles with Reduced Hemolytic Activity. *Med Chem Commun* **2013**, *4* (1), 120–124. <https://doi.org/10.1039/C2MD20162C>.
- (44) Zimmermann, L.; Bussière, A.; Ouberai, M.; Baussanne, I.; Jolival, C.; Mingot-Leclercq, M.-P.; Décout, J.-L. Tuning the Antibacterial Activity of Amphiphilic Neamine Derivatives and Comparison to Paromamine Homologues. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (19), 7691–7705. <https://doi.org/10.1021/jm401148j>.
- (45) Swain, J.; El Khoury, M.; Flament, A.; Dezanet, C.; Briée, F.; Van Der Smissen, P.; Décout, J.-L.; Mingot-Leclercq, M.-P. Antimicrobial Activity of Amphiphilic Neamine Derivatives: Understanding the Mechanism of Action on Gram-Positive Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2019**, S0005273619301178. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.020>.
- (46) Udumula, V.; Ham, Y. W.; Fosso, M. Y.; Chan, K. Y.; Rai, R.; Zhang, J.; Li, J.; Chang, C.-W. T. Investigation of Antibacterial Mode of Action for Traditional and Amphiphilic Aminoglycosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (6), 1671–1675. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.073>.

- (47) Marquardt, U.; Schmid, D.; Jung, G. Racemic Synthesis of the New Antibiotic Tetramic Acid Reutericyclin. *Synlett* **2000**, 2000 (08), 1131–1132. <https://doi.org/10.1055/s-2000-6734>.
- (48) Gänzle, M. G. Reutericyclin: Biological Activity, Mode of Action, and Potential Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 64 (3), 326–332. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1536-8>.
- (49) Nicola, A. M.; Albuquerque, P.; Paes, H. C.; Fernandes, L.; Costa, F. F.; Kioshima, E. S.; Abadio, A. K. R.; Bocca, A. L.; Felipe, M. S. Antifungal Drugs: New Insights in Research & Development. *Pharmacol. Ther.* **2019**, 195, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.008>.
- (50) Listes modèles OMS des médicaments essentiels <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/fr/> (accessed Jul 3, 2019).
- (51) Brajtburg, J.; Powderly, W. G.; Kobayashi, G. S.; Medoff, G. Amphotericin B: Current Understanding of Mechanisms of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, 34 (2), 183–188. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.2.183>.
- (52) Palacios, D. S.; Dailey, I.; Siebert, D. M.; Wilcock, B. C.; Burke, M. D. Synthesis-Enabled Functional Group Deletions Reveal Key Underpinnings of Amphotericin B Ion Channel and Antifungal Activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108 (17), 6733–6738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015023108>.
- (53) Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Murata, M. Amphotericin B–Phospholipid Covalent Conjugates: Dependence of Membrane-Permeabilizing Activity on Acyl-Chain Length. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1 (22), 3882–3884. <https://doi.org/10.1039/B306801C>.
- (54) Cleary, J. D.; Weisdorf, D.; Fletcher, C. V. Effect of Infusion Rate on Amphotericin B-Associated Febrile Reactions. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **1988**, 22 (10), 769–772. <https://doi.org/10.1177/106002808802201005>.
- (55) dos Santos, A. G.; Marquês, J. T.; Carreira, A. C.; Castro, I. R.; Viana, A. S.; Mingeot-Leclercq, M.-P.; de Almeida, R. F. M.; Silva, L. C. The Molecular Mechanism of Nystatin Action Is Dependent on the Membrane Biophysical Properties and Lipid Composition. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19 (44), 30078–30088. <https://doi.org/10.1039/C7CP05353C>.
- (56) Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*; John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- (57) Rosen, M. J.; Kunjappu, J. T. *Surfactants and Interfacial Phenomena, 4th Edition*; Wiley, 2012.
- (58) Aniansson, E. A. G.; Wall, S. N. Kinetics of Step-Wise Micelle Association. *J. Phys. Chem.* **1974**, 78 (10), 1024–1030. <https://doi.org/10.1021/j100603a016>.
- (59) Aniansson, E. A. G.; Wall, S. N.; Almgren, M.; Hoffmann, H.; Kielmann, I.; Ulbricht, W.; Zana, R.; Lang, J.; Tondre, C. Theory of the Kinetics of Micellar Equilibria and Quantitative Interpretation of Chemical Relaxation Studies of Micellar Solutions of Ionic Surfactants. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80 (9), 905–922. <https://doi.org/10.1021/j100550a001>.
- (60) Bordes, R. Synthèse, Physicochimie et Polymérisation de Tensioactifs Paires d'ions Dérivés Du Norbornène, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2007.

- (61) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1976**, 72 (0), 1525–1568. <https://doi.org/10.1039/F29767201525>.
- (62) Rico-Lattes, I. En Route Vers de Nouveaux Médicaments Auto-Organisés Dans l'eau. *Actual. Chim.* **2007**, No. 305.
- (63) Noiret, N.; Benvegna, T.; Plusquellec, D. Tensioactifs à Base de Substances Renouvelables. *Actual. Chim.* **2002**, 258–259, 70–75.
- (64) Tadros, T. F. *Applied Surfactants: Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- (65) Princen, H. M.; Cazabat, A. M.; Cohen Stuart, M. A.; Heslot, F.; Nicolet, S. Instabilities during Wetting Processes: Wetting by Tensioactive Liquids. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, 126 (1), 84–92. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(88\)90102-6](https://doi.org/10.1016/0021-9797(88)90102-6).
- (66) Jin, J.; Wang, H.; Jing, Y.; Liu, M.; Wang, D.; Li, Y.; Bao, M. An Efficient and Environmental-Friendly Dispersant Based on the Synergy of Amphiphilic Surfactants for Oil Spill Remediation. *Chemosphere* **2019**, 215, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.159>.
- (67) Kekevi, B.; Berber, H.; Yıldırım, H. Synthesis and Characterization of Silicone-Based Surfactants as Anti-Foaming Agents. *J. Surfactants Deterg.* **2012**, 15 (1), 73–81. <https://doi.org/10.1007/s11743-011-1277-0>.
- (68) Boz, M.; Baştürk, S. S. Phase Transfer Catalysis with Quaternary Ammonium Type Gemini Surfactants: O-Alkylation of Isovannillin. *J. Surfactants Deterg.* **2016**, 19 (4), 663–671. <https://doi.org/10.1007/s11743-016-1821-z>.
- (69) Vashisth, C.; Whitby, C. P.; Fornasiero, D.; Ralston, J. Interfacial Displacement of Nanoparticles by Surfactant Molecules in Emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 349 (2), 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.05.089>.
- (70) Grbavčić, S.; Marković, D.; Rajilić-Stojanović, M.; Antov, M.; Šćiban, M.; Karadžić, I.; Knežević-Jugović, Z. Development of an Environmentally Acceptable Detergent Formulation for Fatty Soils Based on the Lipase from the Indigenous Extremophile *Pseudomonas Aeruginosa* Strain. *J. Surfactants Deterg.* **2015**, 18 (3), 383–395. <https://doi.org/10.1007/s11743-015-1674-x>.
- (71) Munyendo, W.; Kiprop, A. Design, Preparation and Evaluation of Germicidal *Toddalia Asiatica* Herbal Antiseptic Detergent. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2016**, 100–104. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.601116>.
- (72) Tran, G.; Huynh, T. N.; Bruins, F. M.; Ahmad, N.; Budris, W. A.; Posligua, A.; Hammel, J. A.; Nardone, B.; West, D. P. Evidence of Incompatibility for Topical Anionic Agents Used in Conjunction with Chlorhexidine Gluconate: A Systematic Review. *J. Surg. Dermatol.* **2016**, 1 (2). <https://doi.org/10.18282/jsd.v1.i2.21>.
- (73) Walton, J. T.; Hill, D. J.; Protheroe, R. G.; Nevill, A.; Gibson, H. Investigation into the Effect of Detergents on Disinfectant Susceptibility of Attached *Escherichia Coli* and *Listeria Monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, 105 (1), 309–315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03805.x>.
- (74) Glover, R. E.; Smith, R. R.; Jones, M. V.; Jackson, S. K.; Rowlands, C. C. An EPR Investigation of Surfactant Action on Bacterial Membranes. *FEMS*

- Microbiol. Lett.* **1999**, *177* (1), 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13713.x>.
- (75) Minbiole, K. P. C.; Jennings, M. C.; Ator, L. E.; Black, J. W.; Grenier, M. C.; LaDow, J. E.; Caran, K. L.; Seifert, K.; Wuest, W. M. From Antimicrobial Activity to Mechanism of Resistance: The Multifaceted Role of Simple Quaternary Ammonium Compounds in Bacterial Eradication. *Tetrahedron* **2016**, *72* (25), 3559–3566. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.01.014>.
- (76) Grenier, M. C.; Davis, R. W.; Wilson-Henjum, K. L.; LaDow, J. E.; Black, J. W.; Caran, K. L.; Seifert, K.; Minbiole, K. P. C. The Antibacterial Activity of 4,4'-Bipyridinium Amphiphiles with Conventional, Bicephalic and Gemini Architectures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (12), 4055–4058. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.079>.
- (77) Jennings, M. C.; Buttaro, B. A.; Minbiole, K. P. C.; Wuest, W. M. Bioorganic Investigation of Multicationic Antimicrobials to Combat QAC-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1* (7), 304–309. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00032>.
- (78) Jennings, M. C.; Ator, L. E.; Paniak, T. J.; Minbiole, K. P. C.; Wuest, W. M. Biofilm-Eradicating Properties of Quaternary Ammonium Amphiphiles: Simple Mimics of Antimicrobial Peptides. *ChemBioChem* **2014**, *15* (15), 2211–2215. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402254>.
- (79) Fraise, A.; Lambert, P.; Maillard, J.-Y. *Principle and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*, Wiley.; Russel, Hugo & Ayliffe's; 1992.
- (80) Brycki, B. E.; Kowalczyk, I. H.; Szulc, A.; Kaczerewska, O.; Pakiet, M. Multifunctional Gemini Surfactants: Structure, Synthesis, Properties and Applications. In *Application and Characterization of Surfactants*; Najjar, R., Ed.; InTech, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68755>.
- (81) Wiczorek, D.; Dobrowolski, A.; Staszak, K.; Kwaśniewska, D.; Dubyk, P. Synthesis, Surface and Antimicrobial Activity of Piperidine-Based Sulfobetaines. *J. Surfactants Deterg.* **2017**, *20* (1), 151–158. <https://doi.org/10.1007/s11743-016-1906-8>.
- (82) Johnson, M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Mater. Methods* **2013**, *3*. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.163>.
- (83) Koley, D.; Bard, A. J. Triton X-100 Concentration Effects on Membrane Permeability of a Single HeLa Cell by Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (39), 16783–16787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011614107>.
- (84) Homann, M.; Sansjofre, P.; Van Zuilen, M.; Heubeck, C.; Gong, J.; Killingsworth, B.; Foster, I. S.; Airo, A.; Van Kranendonk, M. J.; Ader, M.; et al. Microbial Life and Biogeochemical Cycling on Land 3,220 Million Years Ago. *Nat. Geosci.* **2018**, *11* (9), 665–671. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0190-9>.
- (85) Cabeen, M. T.; Jacobs-Wagner, C. Bacterial Cell Shape. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (8), 601–610. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1205>.
- (86) The PLOS Pathogens Staff. Correction: A Nasal Epithelial Receptor for *Staphylococcus Aureus* WTA Governs Adhesion to Epithelial Cells and

- Modulates Nasal Colonization. *PLoS Pathog.* **2014**, *10* (6), e1004247. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004247>.
- (87) Misawa, Y.; Kelley, K. A.; Wang, X.; Wang, L.; Park, W. B.; Birtel, J.; Saslowsky, D.; Lee, J. C. Staphylococcus Aureus Colonization of the Mouse Gastrointestinal Tract Is Modulated by Wall Teichoic Acid, Capsule, and Surface Proteins. *PLOS Pathog.* **2015**, *11* (7), e1005061. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005061>.
- (88) Atilano, M. L.; Pereira, P. M.; Yates, J.; Reed, P.; Veiga, H.; Pinho, M. G.; Filipe, S. R. Teichoic Acids Are Temporal and Spatial Regulators of Peptidoglycan Cross-Linking in Staphylococcus Aureus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (44), 18991–18996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004304107>.
- (89) Park, K.-H.; Kurokawa, K.; Zheng, L.; Jung, D.-J.; Tateishi, K.; Jin, J.-O.; Ha, N.-C.; Kang, H. J.; Matsushita, M.; Kwak, J.-Y.; et al. Human Serum Mannose-Binding Lectin Senses Wall Teichoic Acid Glycopolymer of *Staphylococcus Aureus*, Which Is Restricted in Infancy. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (35), 27167–27175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141309>.
- (90) Sonntag, I.; Schwarz, H.; Hirota, Y.; Henning, U. Cell Envelope and Shape of Escherichia Coli: Multiple Mutants Missing the Outer Membrane Lipoprotein and Other Major Outer Membrane Proteins. *J. Bacteriol.* **1978**, *136* (1), 280–285.
- (91) Tsujimoto, H.; Gotoh, N.; Nishino, T. Diffusion of Macrolide Antibiotics through the Outer Membrane of Moraxella Catarrhalis. *J. Infect. Chemother.* **1999**, *5* (4), 196–200. <https://doi.org/10.1007/s101560050034>.
- (92) Novikova, O. D.; Solovyeva, T. F. Nonspecific Porins of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria: Structure and Functions. *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol.* **2009**, *3* (1), 3–15. <https://doi.org/10.1134/S1990747809010024>.
- (93) Liu, D. Escherichia Coli☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02291-1>.
- (94) Ribet, D.; Cossart, P. How Bacterial Pathogens Colonize Their Hosts and Invade Deeper Tissues. *Microbes Infect.* **2015**, *17* (3), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>.
- (95) Shaw, N. Lipid Composition as a Guide to the Classification of Bacteria. In *Advances in Applied Microbiology*; Elsevier, 1974; Vol. 17, pp 63–108. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70555-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70555-0).
- (96) Stillwell, W. Membrane Polar Lipids. In *An Introduction to Biological Membranes*; Elsevier, 2016; pp 63–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00005-1>.
- (97) Loron, C. C.; François, C.; Rainbird, R. H.; Turner, E. C.; Borensztajn, S.; Javaux, E. J. Early Fungi from the Proterozoic Era in Arctic Canada. *Nature* **2019**, *570* (7760), 232–235. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1217-0>.
- (98) Boudih, S. Identification Des Moisissures et de Leurs Métabolites Secondaires Colonisant Des Supports Papiers : Évaluation de La Toxicité Sur Des Cellules Épithéliales Respiratoires In Vitro, Université Paris-Est, 2013.
- (99) Gow, N. A. R.; Latge, J.-P.; Munro, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5* (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.

- (100) Klis, F. M.; Groot, P. D.; Hellingwerf, K. Molecular Organization of the Cell Wall of *Candida Albicans*. *Med. Mycol.* **2001**, *39* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.1.1.8-0>.
- (101) Alvarez, F. J.; Douglas, L. M.; Konopka, J. B. Sterol-Rich Plasma Membrane Domains in Fungi. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6* (5), 755–763. <https://doi.org/10.1128/EC.00008-07>.
- (102) d'Enfert, C.; Bougnoux, M.-E. Human Fungal Infections. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00139-2>.
- (103) Deleu, M.; Crowet, J.-M.; Nasir, M. N.; Lins, L. Complementary Biophysical Tools to Investigate Lipid Specificity in the Interaction between Bioactive Molecules and the Plasma Membrane: A Review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2014**, *1838* (12), 3171–3190. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.023>.
- (104) Lew, R. R. Mapping Fungal Ion Channel Locations. *Fungal Genet. Biol.* **1998**, *24* (1–2), 69–76. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1047>.
- (105) Czyzewski, B. K.; Wang, D.-N. Identification and Characterization of a Bacterial Hydrosulphide Ion Channel. *Nature* **2012**, *483* (7390), 494–497. <https://doi.org/10.1038/nature10881>.
- (106) Kulkarni, R. D.; Thon, M. R.; Pan, H.; Dean, R. A. Novel G-Protein-Coupled Receptor-like Proteins in the Plant Pathogenic Fungus Magnaporthe Grisea. *Genome Biol.* **2005**, *6* (3), R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-3-r24>.
- (107) Schulz, G. E. The Structure of Bacterial Outer Membrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2002**, *1565* (2), 308–317. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00577-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00577-1).
- (108) Mehrotra, J.; Mittal, A.; Rastogi, A. K.; Jaiswal, A. K.; Bhandari, N. K.; Sinha, S. Antigenic Definition of Plasma Membrane Proteins of Bacillus Calmette-Guerin: Predominant Activation of Human T Cells by Low-Molecular-Mass Integral Proteins. *Scand. J. Immunol.* **1999**, *50* (4), 411–419. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00616.x>.
- (109) Baumgartner, B.; Lambillotte, M.; Mühlethaler, K. Immunochemical Analysis of the Plasma Membrane from Baker's Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur. J. Cell Biol.* **1980**, *23* (1), 6–15.
- (110) Sunshine, H.; Iruela-Arispe, M. L. Membrane Lipids and Cell Signaling: *Curr. Opin. Lipidol.* **2017**, *28* (5), 408–413. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000443>.
- (111) Sohlenkamp, C.; Geiger, O. Bacterial Membrane Lipids: Diversity in Structures and Pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40* (1), 133–159. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>.
- (112) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- (113) Powers, M. J.; Trent, M. S. Phospholipid Retention in the Absence of Asymmetry Strengthens the Outer Membrane Permeability Barrier to Last-Resort Antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (36), E8518–E8527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806714115>.

- (114) Meng, J.; Schroeder, C. M. Escherichia Coli. In *Foodborne Diseases*; Simjee, S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2007; pp 1–25. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-501-5_1.
- (115) Gomes, T. A. T.; Elias, W. P.; Scaletsky, I. C. A.; Guth, B. E. C.; Rodrigues, J. F.; Piazza, R. M. F.; Ferreira, L. C. S.; Martinez, M. B. Diarrheagenic Escherichia Coli. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.
- (116) Nataro, J. Enteroaggregative Escherichia Coli. *Emerg. Infect. Dis.* **1998**, *4* (2), 251–261. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980212>.
- (117) Dautzenberg, M. J. D.; Haverkate, M. R.; Bonten, M. J. M.; Bootsma, M. C. J. Epidemic Potential of *Escherichia Coli* ST131 and *Klebsiella Pneumoniae* ST258: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ Open* **2016**, *6* (3), e009971. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009971>.
- (118) Poole, K. Outer Membranes and Efflux: The Path to Multidrug Resistance in Gram- Negative Bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2002**, *3* (2), 77–98. <https://doi.org/10.2174/1389201023378454>.
- (119) Poole, K. Efflux Pumps as Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Ann. Med.* **2007**, *39* (3), 162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>.
- (120) Alonso, A.; Campanario, E.; Martínez, J. L. Emergence of Multidrug-Resistant Mutants Is Increased under Antibiotic Selective Pressure in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiology* **1999**, *145* (10), 2857–2862. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2857>.
- (121) Olaru, I. D.; Popoiu, M.; Breuil, J.; Aramă, V.; Hristea, A. Urinary Tract Infection Caused by Carbapenem-Resistant *K. Pneumoniae* and *P. Aeruginosa*. *Romanian J. Intern. Med. Rev. Roum. Med. Interne* **2011**, *49* (4), 289–294.
- (122) Epand, R. M.; Epand, R. F. Lipid Domains in Bacterial Membranes and the Action of Antimicrobial Agents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788* (1), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.023>.
- (123) Kocur, M.; Kloos, W. E.; SCHLEIFER, K.-H. The Genus *Micrococcus*. In *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2006; pp 961–971. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_37.
- (124) Papadopoulos, P.; Papadopoulos, T.; Angelidis, A. S.; Boukouvala, E.; Zdragas, A.; Papa, A.; Hadjichristodoulou, C.; Sergelidis, D. Prevalence of *Staphylococcus Aureus* and of Methicillin-Resistant *S. Aureus* (MRSA) along the Production Chain of Dairy Products in North-Western Greece. *Food Microbiol.* **2018**, *69*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.016>.
- (125) Hasan, R.; Acharjee, M.; Noor, R. Prevalence of Vancomycin Resistant *Staphylococcus Aureus* (VRSA) in Methicillin Resistant *S. Aureus* (MRSA) Strains Isolated from Burn Wound Infections. *Tzu Chi Med. J.* **2016**, *28* (2), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2016.03.002>.
- (126) Crowe-McAuliffe, C.; Graf, M.; Huter, P.; Takada, H.; Abdelshahid, M.; Nováček, J.; Murina, V.; Atkinson, G. C.; Haurlyuk, V.; Wilson, D. N. Structural Basis for Antibiotic Resistance Mediated by the *Bacillus Subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (36), 8978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808535115>.

- (127) Behzadi, P.; Behzadi, E.; Ranjbar, R. Urinary Tract Infections and Candida Albicans. *Cent. Eur. J. Urol.* **2015**, *68*.
<https://doi.org/10.5173/cej.2015.01.474>.
- (128) Defever, K. S.; Whelan, W. L.; Rogers, A. L.; Beneke, E. S.; Veselenak, J. M.; Soll, D. R. Candida Albicans Resistance to 5-Fluorocytosine: Frequency of Partially Resistant Strains among Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *22* (5), 810–815. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.5.810>.
- (129) Dufresne, S. F.; Marr, K. A.; Sydnor, E.; Staab, J. F.; Karp, J. E.; Lu, K.; Zhang, S. X.; Lavallee, C.; Perl, T. M.; Neofytos, D. Epidemiology of Candida Kefyr in Patients with Hematologic Malignancies. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52* (6), 1830–1837. <https://doi.org/10.1128/JCM.00131-14>.
- (130) Dalle, F.; Lafon, I.; L'Ollivier, C.; Ferrant, E.; Sicard, P.; Labruere, C.; Jebrane, A.; Laubriet, A.; Vagner, O.; Caillot, D.; et al. A Prospective Analysis of the Genotypic Diversity and Dynamics of the Candida Albicans Colonizing Flora in Neutropenic Patients with de Novo Acute Leukemia. *Haematologica* **2008**, *93* (4), 581–587.
<https://doi.org/10.3324/haematol.11882>.
- (131) Yamamoto, M.; Hori, T.; Hatakeyama, N.; Igarashi, K.; Tsutsumi, H.; Suzuki, N. Candida Krusei Arthritis in a Boy with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Pediatr. Infect. Dis.* **2015**, *08* (01), 043–047.
<https://doi.org/10.3233/JPI-130374>.
- (132) Samaranayake, Y. H.; Samaranayake, L. P. Candida Krusei: Biology, Epidemiology, Pathogenicity and Clinical Manifestations of an Emerging Pathogen. *J. Med. Microbiol.* **1994**, *41* (5), 295–310.
<https://doi.org/10.1099/00222615-41-5-295>.
- (133) Eggimann, P.; Garbino, J.; Pittet, D. Epidemiology of Candida Species Infections in Critically Ill Non-Immunosuppressed Patients. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3* (11), 685–702. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00801-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00801-6).
- (134) Castón, J. J.; Linares, M. J.; Gallego, C.; Rivero, A.; Font, P.; Solís, F.; Casal, M.; Torre-Cisneros, J. Risk Factors for Pulmonary Aspergillus Terreus Infection in Patients With Positive Culture for Filamentous Fungi. *Chest* **2007**, *131* (1), 230–236. <https://doi.org/10.1378/chest.06-0767>.
- (135) Wiest, P. M.; Wiese, K.; Jacobs, M. R.; Morrissey, A. B.; Abelson, T. I.; Witt, W.; Lederman, M. M. Alternaria Infection in a Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome: Case Report and Review of Invasive Alternaria Infections. *Rev. Infect. Dis.* **1987**, *9* (4), 799–803.
- (136) Bonatti, H.; Lass-Flörl, C.; Zelger, B.; Lottersberger, C.; Singh, N.; Pruett, T. L.; Margreiter, R.; Schneeberger, S. Alternaria Alternata Soft Tissue Infection in a Forearm Transplant Recipient. *Surg. Infect.* **2007**, *8* (5), 539–544. <https://doi.org/10.1089/sur.2006.095>.
- (137) Luque, P.; García-Gil, F. A.; Larraga, J.; Jiménez, B.; Tomé-Zelaya, E.; Serrano, M. T.; Barrao, M. E. Treatment of Cutaneous Infection by Alternaria Alternata With Voriconazole in a Liver Transplant Patient. *Transplant. Proc.* **2006**, *38* (8), 2514–2515.
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.08.031>.

- (138) Castro, A. S.; Oliveira, A.; Lopes, V. Pulmonary Phaeohyphomycosis: A Challenge to the Clinician. *Eur. Respir. Rev.* **2013**, *22* (128), 187–188. <https://doi.org/10.1183/09059180.00007512>.
- (139) Annessi, G.; Cimitan, A.; Zambruno, G.; Silverio, A. D. Cutaneous Phaeohyphomycosis Due to *Cladosporium Cladosporioides*: *Cladosporium Cladosporioides* Als Erreger Einer Kutanen Phaeohyphomykose. *Mycoses* **2009**, *35* (9–10), 243–246. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1992.tb00855.x>.
- (140) Nelson, P. E.; Dignani, M. C.; Anaissie, E. J. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7* (4), 479–504. <https://doi.org/10.1128/cmr.7.4.479>.
- (141) Nucci, M.; Anaissie, E. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20* (4), 695–704. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-07>.
- (142) Noble, A. III. Zur Geschichte Des Azobenzols Und Des Benzidins. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1856**, *98* (2), 253–256. <https://doi.org/10.1002/jlac.18560980211>.
- (143) Merino, E.; Ribagorda, M. Control over Molecular Motion Using the Cis–Trans Photoisomerization of the Azo Group. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1071–1090. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.119>.
- (144) Kurita, N.; Ikegami, T.; Ishikawa, Y. Ab Initio Study of the Minimum-Energy Structure of Trans-Azobenzene. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *360* (3–4), 349–354. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(02\)00854-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(02)00854-0).
- (145) Hamon, F.; Djedaini-Pilard, F.; Barbot, F.; Len, C. Azobenzenes—Synthesis and Carbohydrate Applications. *Tetrahedron* **2009**, *65* (49), 10105–10123. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.08.063>.
- (146) Curtin, D. Y.; Grubbs, E. J.; McCarty, C. G. Uncatalyzed Syn–Anti Isomerization of Imines, Oxime Ethers, and Haloimines I. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (12), 2775–2786. <https://doi.org/10.1021/ja00964a029>.
- (147) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825. <https://doi.org/10.1039/C1CS15179G>.
- (148) Crecca, C. R.; Roitberg, A. E. Theoretical Study of the Isomerization Mechanism of Azobenzene and Disubstituted Azobenzene Derivatives. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (26), 8188–8203. <https://doi.org/10.1021/jp057413c>.
- (149) Rau, H.; Lueddecke, E. On the Rotation–Inversion Controversy on Photoisomerization of Azobenzenes. Experimental Proof of Inversion. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (6), 1616–1620. <https://doi.org/10.1021/ja00370a028>.
- (150) Magee, J. L.; Shand, W.; Eyring, H. Non-Adiabatic Reactions. Rotation about the Double Bond*. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63* (3), 677–688. <https://doi.org/10.1021/ja01848a012>.
- (151) Álvarez Micó, X.; Ziegler, T.; Subramanian, L. R. A Versatile Direct Approach To ortho-Substituted Azobenzenes from Benzotriazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (11), 1400–1403. <https://doi.org/10.1002/anie.200352782>.

- (152) Samanta, S.; McCormick, T. M.; Schmidt, S.; Seferos, D. S.; Woolley, A. Robust Visible Light Photoswitching with Ortho-Thiol Substituted Azobenzenes. *Chem. Commun.* **2013**. <https://doi.org/10.1039/c3cc46045b>.
- (153) Bléger, D.; Schwarz, J.; Brouwer, A. M.; Hecht, S. O-Fluoroazobenzenes as Readily Synthesized Photoswitches Offering Nearly Quantitative Two-Way Isomerization with Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (51), 20597–20600. <https://doi.org/10.1021/ja310323y>.
- (154) Gilbert, A. M.; Failli, A.; Shumsky, J.; Yang, Y.; Severin, A.; Singh, G.; Hu, W.; Keeney, D.; Petersen, P. J.; Katz, A. H. Pyrazolidine-3,5-Diones and 5-Hydroxy-1H-Pyrazol-3(2H)-Ones, Inhibitors of UDP-N-Acetylenolpyruvyl Glucosamine Reductase. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 6027–6036. <https://doi.org/10.1021/jm060499t>.
- (155) Haberhauer, G.; Kallweit, C.; Wölper, C.; Bläser, D. An Azobenzene Unit Embedded in a Cyclopeptide as a Type-Specific and Spatially Directed Switch. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 7879–7882. <https://doi.org/10.1002/anie.201301516>.
- (156) Cannazza, G.; Perrone, S.; Rosato, F.; D'Accolti, L.; Parenti, C.; Troisi, L. One-Pot Synthesis of Azobenzene Derivatives by Oxidation of 2,3-Dihydrobenzothiadiazines. *Synthesis* **2014**, *46* (07), 962–966. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338587>.
- (157) Fetizon, M.; Golfier, M.; Milcent, R.; Papadakis, I. Oxydations Par Le Carbonate d'argent—XII : Groupes Fonctionnels Azotes. *Tetrahedron* **1975**, *31* (2), 165–170. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(75\)85012-5](https://doi.org/10.1016/0040-4020(75)85012-5).
- (158) Hedayatullah, M.; Pierre Dechatre, J.; Denivelle, L. Oxydation Des Amines Aromatiques Primaires. VII. Sur l'oxydation d'anilines Substituees Par Le Carbonate d'argent Sur Celite. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16* (25), 2039–2042. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)75288-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)75288-9).
- (159) Ortiz, Benjamin.; Villanueva, Pedro.; Walls, Fernando. Silver(II) Oxide as a Reagent. Reactions with Aromatic Amines and Miscellaneous Related Compounds. *J. Org. Chem.* **1972**, *37* (17), 2748–2750. <https://doi.org/10.1021/jo00982a028>.
- (160) Baer, E.; Tosoni, A. L. Formation of Symmetric Azo-Compounds from Primary Aromatic Amines by Lead Tetraacetate. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78* (12), 2857–2858. <https://doi.org/10.1021/ja01593a061>.
- (161) Pausacker, K. H.; Scroggie, J. G. Oxidations with Lead Tetra-Acetate. Part II. The Oxidation of Primary Aromatic Amines. *J. Chem. Soc.* **1954**, 4003–4006. <https://doi.org/10.1039/JR9540004003>.
- (162) Farhadi, S.; Zaringhadam, P.; Sahamieh, R. Z. Photo-Assisted Oxidation of Anilines and Other Primary Aromatic Amines to Azo Compounds Using Mercury(II) Oxide as a Photo-Oxidant. *Acta Chim. Slov.* **2007**, *54* (3), 647–653.
- (163) Orito, K.; Hatakeyama, T.; Takeo, M.; Uchiito, S.; Tokuda, M.; Suginome, H. Dimerization of Anilines and Benzylamines with Mercury(II) Oxide-Iodine Reagent. *Tetrahedron* **1998**, *54* (29), 8403–8410. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00461-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00461-X).
- (164) Firouzabadi, H.; Iranpoor, N. Ceric Trihydroxy Hydroperoxide Ce(OH)3O2H, A Regenerable, Mild, and A Versatile Reagent for the

- Oxidation of Organic Compounds. *Synth. Commun.* **1984**, *14* (9), 875–882. <https://doi.org/10.1080/00397918408075731>.
- (165) Bandara, H. M. D.; Friss, T. R.; Enriquez, M. M.; Isley, W.; Incarvito, C.; Frank, H. A.; Gascon, J.; Burdette, S. C. Proof for the Concerted Inversion Mechanism in the Trans→cis Isomerization of Azobenzene Using Hydrogen Bonding To Induce Isomer Locking. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (14), 4817–4827. <https://doi.org/10.1021/jo100866m>.
- (166) Basheer, M. C.; Oka, Y.; Mathews, M.; Tamaoki, N. A Light-Controlled Molecular Brake with Complete ON–OFF Rotation. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (11), 3489–3496. <https://doi.org/10.1002/chem.200902123>.
- (167) Gerstel, P.; Klumpp, S.; Hennrich, F.; Poschlad, A.; Meded, V.; Blasco, E.; Wenzel, W.; Kappes, M. M.; Barner-Kowollik, C. Highly Selective Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes via Polymer Wrapping: A Combinatorial Study via Modular Conjugation. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3* (1), 10–15. <https://doi.org/10.1021/mz400472q>.
- (168) Narwal, J. K.; Malik, R. K.; Garg, S.; Verma, K. K. Study on the Reducing Properties of Some Diaryl Ditellurides. *Int. J. Chem. Sci.* **2013**, *11* (3), 1256–1260.
- (169) Zhao, J.; Liu, Y.; Yu, Y. Dual-Responsive Inverse Opal Films Based on a Crosslinked Liquid Crystal Polymer Containing Azobenzene. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (48), 10262–10267. <https://doi.org/10.1039/C4TC01825G>.
- (170) Chisholm, M. H.; D’Acchioli, J. S.; Hadad, C. M.; Patmore, N. J. Concerning the Electronic Coupling of MoMo Quadruple Bonds Linked by 4,4’-Azodibenzoate and Comparison with T2g6-Ru(II) Centers by 4,4’-Azodiphenylcyanamido Ligands. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (26), 11035–11042. <https://doi.org/10.1021/ic060956w>.
- (171) Ak, M.; Yildiz, H. B.; Toppare, L. Enzyme Immobilization in a Photosensitive Conducting Polymer Bearing Azobenzene in the Main Chain. *Polym. Bull.* **2014**, *71* (7), 1827–1841. <https://doi.org/10.1007/s00289-014-1157-7>.
- (172) Pamar, M. G.; Govender, P.; Muthusamy, K.; Krause, R. W. M.; Nanjundaswamy, H. M. Mg/Triethylammonium Formate: A Useful System for Reductive Dimerization of Aldehydes into Pinacols; Nitroarenes into Azoarenes and Azoarenes into Hydrazoarenes. *Orient. J. Chem.* **2013**, *29* (03), 969–974. <https://doi.org/10.13005/ojc/290316>.
- (173) Gund, S. H.; Shelkar, R. S.; Nagarkar, J. M. An Efficient Catalyst-Free and Chemoselective Synthesis of Azobenzenes from Nitrobenzenes. *RSC Adv* **2014**, *4* (81), 42947–42951. <https://doi.org/10.1039/C4RA06027J>.
- (174) Hu, L.; Cao, X.; Shi, L.; Qi, F.; Guo, Z.; Lu, J.; Gu, H. A Highly Active Nano-Palladium Catalyst for the Preparation of Aromatic Azos under Mild Conditions. *Org. Lett.* **2011**, *13* (20), 5640–5643. <https://doi.org/10.1021/ol202362f>.
- (175) Liu, J.; Liu, Q.; Yi, H.; Qin, C.; Bai, R.; Qi, X.; Lan, Y.; Lei, A. Visible-Light-Mediated Decarboxylation/Oxidative Amidation of α -Keto Acids with Amines under Mild Reaction Conditions Using O₂. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (2), 502–506. <https://doi.org/10.1002/anie.201308614>.
- (176) Kim, J. H.; Park, J. H.; Chung, Y. K.; Park, K. H. Ruthenium Nanoparticle-Catalyzed, Controlled and Chemoselective Hydrogenation of Nitroarenes

- Using Ethanol as a Hydrogen Source. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354* (13), 2412–2418. <https://doi.org/10.1002/adsc.201200356>.
- (177) Hu, L.; Cao, X.; Chen, L.; Zheng, J.; Lu, J.; Sun, X.; Gu, H. Highly Efficient Synthesis of Aromatic Azos Catalyzed by Unsupported Ultra-Thin Pt Nanowires. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (28), 3445–3447. <https://doi.org/10.1039/C2CC30281K>.
- (178) Saminathan, M.; Pillai, C. K. S. Synthesis of Novel Liquid Crystalline Polymers with Cross-Linked Network Structures. *Polymer* **2000**, *41* (8), 3103–3108.
- (179) Menati, S.; Azadbakht, A.; Azadbakht, R.; Taeb, A.; Kakanejadifard, A. Synthesis, Characterization, and Electrochemical Study of Some Novel, Azo-Containing Schiff Bases and Their Ni(II) Complexes. *Dyes Pigm* **2013**, *98* (3), 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.04.009>.
- (180) Xu, H.; Gao, J.; Wang, J.; Qian, X.; Song, R.; Cui, Y.; Yang, Y.; Qian, G. Surfactant-Thermal Method to Synthesize a New Zn(II)-Trimesic MOF with Confined Ru(Bpy)₃²⁺ Complex. *J. Solid State Chem.* **2015**, *226*, 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2015.03.012>.
- (181) Merino, E. Synthesis of Azobenzenes: The Coloured Pieces of Molecular Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (7), 3835. <https://doi.org/10.1039/c0cs00183j>.
- (182) Chermahini, A. N.; Doukkeh, M.; Hassan, H. Z.; Bostanian, M. Application of Modified Clays in Diazotization and Azo Coupling Reactions in Water. *J. Ind. Eng. Chem.* **2012**, *18* (2), 826–833. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.11.146>.
- (183) Merrington, J.; James, M.; Bradley, M. Supported Diazonium Salts—Convenient Reagents for the Combinatorial Synthesis of Azo Dye. *Chem. Commun.* **2002**, No. 2, 140–141. <https://doi.org/10.1039/B109799G>.
- (184) Safari, J.; Zarnegar, Zohre. An Environmentally Friendly Approach to the Green Synthesis of Azo Dyes in the Presence of Magnetic Solid Acid Catalysts. *RSC Adv.* **2015**, *5* (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 17738–17745. <https://doi.org/10.1039/C4RA13562H>.
- (185) Bamoniri, A.; Moshtael-Arani, Naimeh. Nano-Fe₃O₄ Encapsulated-Silica Supported Boron Trifluoride as a Novel Heterogeneous Solid Acid for Solvent-Free Synthesis of Arylazo-1-Naphthol Derivatives. *RSC Adv.* **2015**, *5* (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 16911–16920. <https://doi.org/10.1039/C4RA12604A>.
- (186) Mills, C. XCIII.—Some New Azo-Compounds. *J. Chem. Soc. Trans.* **1895**, *67* (0), 925–933. <https://doi.org/10.1039/CT8956700925>.
- (187) Yu, B.-C.; Shirai, Y.; Tour, J. M. Syntheses of New Functionalized Azobenzenes for Potential Molecular Electronic Devices. *Tetrahedron* **2006**, *62* (44), 10303–10310.
- (188) Viehmann, P.; Hecht, S. Design and Synthesis of a Photoswitchable Guanidine Catalyst. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1825–1830. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.209>.
- (189) Schönberger, M.; Trauner, D. A Photochromic Agonist for μ -Opioid Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (12), 3264–3267. <https://doi.org/10.1002/anie.201309633>.

- (190) Rosales, A. M.; Mabry, K. M.; Nehls, E. M.; Anseth, K. S. Photoresponsive Elastic Properties of Azobenzene-Containing Poly(Ethylene-Glycol)-Based Hydrogels. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (3), 798–806. <https://doi.org/10.1021/bm501710e>.
- (191) Holmes, R. R.; Bayer, R. P. A Simple Method for the Direct Oxidation of Aromatic Amines to Nitroso Compounds I. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (13), 3454–3456. <https://doi.org/10.1021/ja01498a054>.
- (192) Wratten, S. J.; Fujiwara, H.; Solsten, R. T. Properties and Decomposition of 2,6-Diethylnitrosobenzene. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35* (4), 484–491. <https://doi.org/10.1021/jf00076a011>.
- (193) Reuter, R.; Wegner, H. A. Meta-Oligoazobiphenyls – Synthesis via Site-Selective Mills Reaction and Photochemical Properties. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 877–883. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.99>.
- (194) Wang, S.; Advincula, R. C. Design and Synthesis of Photoresponsive Poly(Benzyl Ester) Dendrimers with All-Azobenzene Repeating Units. *Org Lett* **2001**, *3* (24), 3831–3834.
- (195) Nakayama, K.; Endo, M.; Majima, T. A Hydrophilic Azobenzene-Bearing Amino Acid for Photochemical Control of a Restriction Enzyme BamHI. *Bioconjugate Chem* **2005**, *16* (6), 1360–1366.
- (196) Chawla, H. M.; Sahu, S. N. Synthesis of Novel Chromogenic Azocalix[4]Arenemonoquinones and Their Binding with Alkali Metal Cations. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, *63* (1–2), 141–149. <https://doi.org/10.1007/s10847-008-9498-1>.
- (197) Hirano, M.; Yakabe, S.; Chikamori, H.; Clark, J. H.; Morimoto, T. Oxidation by Chemical Manganese Dioxide. Part 3.1 Oxidation of Benzylic and Allylic Alcohols, Hydroxyarenes and Aminoarenes. *J. Chem. Res. Synop.* **1998**, No. 12, 770–771. <https://doi.org/10.1039/A805342A>.
- (198) Zarwell, S.; Rück-Braun, K. Synthesis of an Azobenzene-Linker-Conjugate with Tetrahedral Shape. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (25), 4020–4025. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.04.086>.
- (199) Drug, E.; Gozin, M. Catalytic Oxidation of Hydrazo Derivatives Promoted by a TiCl₃/HBr System. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13784–13785. <https://doi.org/10.1021/ja074413c>.
- (200) Gao, W.; He, Z.; Qian, Y.; Zhao, J.; Huang, Y. General Palladium-Catalyzed Aerobic Dehydrogenation to Generate Double Bonds. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (3), 883–886. <https://doi.org/10.1039/C1SC00661D>.
- (201) Chen, Y.-K.; Jin, C.-X.; Wang, Y.-L.; Wang, J.-Y. Dehydrogenation of Unsymmetric Hydrazo Compounds in Ionic Liquid: Novel Green Synthesis of Azo Compounds. *J. Chin. Chem. Soc.* **2006**, *53* (3), 677–681. <https://doi.org/10.1002/jccs.200600089>.
- (202) Lim, Y.-K.; Lee, K.-S.; Cho, C.-G. Novel Route to Azobenzenes via Pd-Catalyzed Coupling Reactions of Aryl Hydrazides with Aryl Halides, Followed by Direct Oxidations. *Org Lett* **2003**, *5*, 979–982.
- (203) Bléger, D.; Dokic, J.; Peters, M. V.; Grubert, L.; Saalfrank, P.; Hecht, S. Electronic Decoupling Approach to Quantitative Photoswitching in Linear Multiazobenzene Architectures. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (33), 9930–9940.

- (204) Sabater, S.; Mata, J. A.; Peris, E. Dual Catalysis with an IrIII–AuI Heterodimetallic Complex: Reduction of Nitroarenes by Transfer Hydrogenation Using Primary Alcohols. *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18* (20), 6380–6385. <https://doi.org/10.1002/chem.201103657>.
- (205) Kumar, S.; Saini, A.; Sandhu, J. S. A General Method for the Deoxygenation of Aromatic N-Oxides Using RuCl₃·xH₂O. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (50), 8737–8739. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.10.047>.
- (206) Aly, A. A. Photochemical Synthesis of [2.2](3,8)-Pyridazinophane and Quinolinophane-2(1H)-One as Well as Synthesis of [2](5,8)-Quinolinophanes and Fused Spiro-Pyranoindanoparacyclophanes. *Tetrahedron* **2003**, *59* (10), 1739–1747. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00112-1).
- (207) Baik, W.; Kim, D. I.; Koo, S.; Rhee, J. U.; Shin, S. H.; Kim, B. H. Microbial Deoxygenation of N-Oxides with Baker's Yeast-NaOH. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (5), 845–848. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(96\)02464-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(96)02464-1).
- (208) Szarmach, M.; Wagner-Wysiecka, E.; Luboch, E. Rearrangement of Azoxybenzocrowns into Chromophoric Hydroxyazobenzocrowns and the Use of Hydroxyazobenzocrowns for the Synthesis of Ionophoric Biscrown Compounds. *Tetrahedron* **2013**, *69* (51), 10893–10905. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.10.074>.
- (209) Kelly, R. P.; Penton, J. R.; Zollinger, H. Mechanisms of Diazo Coupling Reactions. Part XXXII. The Diazoamino Rearrangement in 20% Acetonitrile/Aqueous Buffers. *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65* (1), 122–132. <https://doi.org/10.1002/hlca.19820650112>.
- (210) Rajaganesh, R.; Gopal, A.; Mohan Das, T.; Ajayaghosh, A. Synthesis and Properties of Amphiphilic Photoresponsive Gelators for Aromatic Solvents. *Org. Lett.* **2012**, *14* (3), 748–751. <https://doi.org/10.1021/ol203294v>.
- (211) Boz, S.; Stöhr, M.; Soydaner, U.; Mayor, M. Protecting-Group-Controlled Surface Chemistry—Organization and Heat-Induced Coupling of 4,4'-Di(Tert-Butoxycarbonylamino)Biphenyl on Metal Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (17), 3179–3183. <https://doi.org/10.1002/anie.200804845>.
- (212) Bregestovski, P. D.; Maleeva, G. V. Photopharmacology: A Brief Review Using the Control of Potassium Channels as an Example. *Neurosci. Behav. Physiol.* **2019**, *49* (2), 184–191. <https://doi.org/10.1007/s11055-019-00713-3>.
- (213) Leippe, P.; Frank, J. A. Designing Azobenzene-Based Tools for Controlling Neurotransmission. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *57*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.01.022>.
- (214) Sheldon, J. E.; Dcona, M. M.; Lyons, C. E.; Hackett, J. C.; Hartman, M. C. T. Photoswitchable Anticancer Activity via Trans–Cis Isomerization of a Combretastatin A-4 Analog. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (1), 40–49. <https://doi.org/10.1039/C5OB02005K>.
- (215) Kaloyanov, N.; Stoyanova, R. Synthesis and Antibacterial Activity of New Arylamido Derivatives of 6 Beta-Aminopenicillanic, 7 Beta-Aminocephalosporanic and 7 Beta-Aminodesacetoxycephalosporanic Acids. *Arzneimittelforschung.* **2000**, *50* (Copyright (C) 2017 U.S. National Library of Medicine.), 652–655.

- (216) Sharma, P. K.; Bandyopadhyay, P.; Sharma, P.; Kumar, Ashok. Antibacterial and Free Radical Scavenging Potential of Synthesized 7-Hydroxy-2-Aryl-6-Aryldiazenyl-4H-Chromen-4-Ones. *Med. Chem. Res.* **2014**, 23 (Copyright (C) 2017 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 3569–3584. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-0938-8>.
- (217) Sie, C. Z. W.; Ngaini, Z.; Suhaili, N.; Madihlagan, E. Synthesis of Kojic Ester Derivatives as Potential Antibacterial Agent. *J. Chem.* **2018**, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/1245712>.
- (218) Aggarwal, R.; Kumar, V.; Gupta, G. K.; Kumar, V. Synthesis of Some New 3,5-Diamino-4-(4'-Fluorophenylazo)-1-Aryl/Heteroarylpyrazoles as Antimicrobial Agents. *Med. Chem. Res.* **2013**, 22 (8), 3566–3573. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0343-0>.
- (219) Salunke, D. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Bhat, M. K.; Nahar, P. B.; Deshpande, M. V. New Steroidal Dimers with Antifungal and Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (6), 1591–1594. <https://doi.org/10.1021/jm030376y>.
- (220) Li, W.; Li, Y.; Yin, X.; Liang, Y.; Li, J.; Wang, C.; Lan, Y.; Wang, H.; Ju, Y.; Li, Guangtao. Azobenzene-Bridged Bile Acid Dimers: An Interesting Class of Conjugates with Conformation-Controlled Bioactivity. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57 (Copyright (C) 2017 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 2539–2543. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.04.107>.
- (221) Velema, W. A.; van der Berg, J. P.; Hansen, M. J.; Szymanski, W.; Driessen, A. J. M.; Feringa, B. L. Optical Control of Antibacterial Activity. *Nat. Chem.* **2013**, 5 (11), 924–928. <https://doi.org/10.1038/nchem.1750>.
- (222) Wegener, M.; Hansen, M. J.; Driessen, A. J. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Photocontrol of Antibacterial Activity: Shifting from UV to Red Light Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139 (49), 17979–17986. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09281>.
- (223) Badawi, A. M.; Azzam, E. M. S.; Morsy, S. M. I. Surface and Biocidal Activity of Some Synthesized Metallo Azobenzene Isothiuronium Salts. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14 (24), 8661–8665. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.021>.
- (224) Hoorens, M. W. H.; Szymanski, W. Reversible, Spatial and Temporal Control over Protein Activity Using Light. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, 43 (8), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.05.004>.
- (225) Hu, Y.; Marlow, J. B.; Ramanathan, R.; Zou, W.; Tiew, H. G.; Pottage, M. J.; Bansal, V.; Tabor, R. F.; Wilkinson, B. L. Synthesis and Properties of Photoswitchable Carbohydrate Fluorosurfactants. *Aust. J. Chem.* **2015**, 68 (12), 1880. <https://doi.org/10.1071/CH15434>.
- (226) Salta, J.; Benhamou, R. I.; Herzog, I. M.; Fridman, M. Tuning the Effects of Bacterial Membrane Permeability through Photo-Isomerization of Antimicrobial Cationic Amphiphiles. *Chem. - Eur. J.* **2017**, 23 (52), 12724–12728. <https://doi.org/10.1002/chem.201703010>.
- (227) Hu, Y.; Zou, W.; Julita, V.; Ramanathan, R.; Tabor, R. F.; Nixon-Luke, R.; Bryant, G.; Bansal, V.; Wilkinson, B. L. Photomodulation of Bacterial Growth and Biofilm Formation Using Carbohydrate-Based Surfactants. *Chem. Sci.* **2016**, 7 (11), 6628–6634. <https://doi.org/10.1039/C6SC03020C>.

- (228) Piotto, S.; Concilio, S.; Sessa, L.; Porta, A.; Calabrese, E. C.; Zanfardino, A.; Varcamonti, M.; Iannelli, P. Small Azobenzene Derivatives Active against Bacteria and Fungi. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.07.030>.
- (229) Piotto, S.; Concilio, S.; Sessa, L.; Diana, R.; Torrens, G.; Juan, C.; Caruso, U.; Iannelli, P. Synthesis and Antimicrobial Studies of New Antibacterial Azo-Compounds Active against *Staphylococcus Aureus* and *Listeria Monocytogenes*. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules22081372>.
- (230) Piotto, S.; Concilio, S.; Sessa, L.; Iannelli, P.; Porta, A.; Calabrese, E. C.; Galdi, M. R.; Incarnato, L. Novel Antimicrobial Polymer Films Active against Bacteria and Fungi. *Polym. Compos.* **2013**, *34* (9), 1489–1492. <https://doi.org/10.1002/pc.22410>.
- (231) Singh, G.; Saroa, A.; Girdhar, S.; Rani, S.; Choquesillo-Lazarte, D.; Sahoo, S. C. Incorporation of Azo Group at Axial Position of Silatranes: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity: Synthesis of Silatranes Possessing Azo Group at Axial Position. *Appl. Organomet. Chem.* **2015**, *29* (8), 549–555. <https://doi.org/10.1002/aoc.3330>.
- (232) Wobbe, R.; Lexington, J.; Zhe, L. Antifungal Agents. 6195998.
- (233) Haidaris, C. G. Patents on Antifungal Compounds Effective against *Candida* Species: **1999**, 18.
- (234) Xu, H.; Zeng, X. Synthesis of Diaryl-Azo Derivatives as Potential Antifungal Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (14), 4193–4195. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.048>.
- (235) Slassi, S.; Fix-Tailler, A.; Larcher, G.; Amine, A.; El-Ghayoury, A. Imidazole and Azo-Based Schiff Bases Ligands as Highly Active Antifungal and Antioxidant Components. *Heteroat. Chem.* **2019**, *2019*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/6862170>.
- (236) Yoshino, J.; Furuta, A.; Kambe, T.; Itoi, H.; Kano, N.; Kawashima, T.; Ito, Y.; Asashima, M. Intensely Fluorescent Azobenzenes: Synthesis, Crystal Structures, Effects of Substituents, and Application to Fluorescent Vital Stain. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (17), 5026–5035. <https://doi.org/10.1002/chem.201000258>.
- (237) Bartsch, H. Metabolic Activation of Aromatic Amines and Azo Dyes. *IARC Sci. Publ.* **1981**, No. 40, 13–30.
- (238) Peng, W.; Ding, F.; Peng, Y.-K.; Jiang, Y.-T.; Zhang, L. Binding Patterns and Structure-Affinity Relationships of Food Azo Dyes with Lysozyme: A Multitechnique Approach. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (Copyright (C) 2019 U.S. National Library of Medicine.), 12415–12428.
- (239) Bus, J. S.; Popp, J. A. Perspectives on the Mechanism of Action of the Splenic Toxicity of Aniline and Structurally-Related Compounds. *Food Chem. Toxicol.* **1987**, *25* (8), 619–626. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(87\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0278-6915(87)90024-X).
- (240) Lis Arias, M. J.; Girardi, E.; Navarro, J. A.; Savarino, P.; Valldeperas, J.; Viscardi, G. Novel Azobenzene Derivatives Containing a Glucopyranoside Moiety. Part II: Dyeing Properties. *Dyes Pigments* **2000**, *46*, 37–42.

- (241) Ito, R.; Koshimura, S.; Fujita, S. ON THE HEMOLYTIC ACTION OF α -AMINOPHENOL AZO-PROTEIN DERIVATIVES. *Jpn. Med. J.* **1949**, 2 (3), 130–136. <https://doi.org/10.7883/yoken1948.2.130>.
- (242) McInnes, C.; Kondejewski, L. H.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D. Development of the Structural Basis for Antimicrobial and Hemolytic Activities of Peptides Based on Gramicidin S and Design of Novel Analogs Using NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (19), 14287–14294. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14287>.
- (243) Lee, D. L.; Hodges, R. S. Structure-Activity Relationships of de Novo Designed Cyclic Antimicrobial Peptides Based on Gramicidin S. *Biopolymers* **2003**, 71 (1), 28–48. <https://doi.org/10.1002/bip.10374>.
- (244) Solvent yellow 7
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s4016?lang=fr®ion=FR>.
- (245) Trzaska, J.; Galewski, Z. Liquid-Crystalline Properties of 4-Alkyl-, 4-Alkyloxy and 4-Halogeno-4'-Hydroxyazobenzene Alkylates. *Opto-Electron. Rev.* **2009**, 17 (2). <https://doi.org/10.2478/s11772-008-0071-7>.
- (246) Mangin, F. Synthèses de Nouveaux Tensioactifs Écocompatibles : Étude de Synthèses Catalytiques et Radicalaires En Milieu Micellaire, Université de Technologie de Compiègne, 2015.
- (247) Xu, L.; Feng, L.; Hao, J.; Dong, S. Controlling the Capture and Release of DNA with a Dual-Responsive Cationic Surfactant. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7 (16), 8876–8885. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01514>.
- (248) Poirel, L.; Jayol, A.; Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, 30 (2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
- (249) Velkov, T.; Roberts, K. D.; Nation, R. L.; Thompson, P. E.; Li, J. Pharmacology of Polymyxins: New Insights into an ‘Old’ Class of Antibiotics. *Future Microbiol.* **2013**, 8 (6), 711–724. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>.
- (250) Silverman, J. A.; Perlmutter, N. G.; Shapiro, H. M. Correlation of Daptomycin Bactericidal Activity and Membrane Depolarization in *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47 (8), 2538–2544. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2538-2544.2003>.
- (251) Robertson, O. H.; Appel, E. M.; Puck, T. T.; Lemon, H. M.; Ritter, M. H. A Study of the Bactericidal Activity in Vitro of Certain Glycols and Closely Related Compounds. *J. Infect. Dis.* **1948**, 83 (2), 124–137. <https://doi.org/10.1093/infdis/83.2.124>.
- (252) Wang, J.; Li, S.; Liang, R.; Wu, B.; He, Y. Synthesis and Characterization of Water-Soluble PEGylated Lignin-Based Polymers by Macromolecular Azo Coupling Reaction. *Chin. Chem. Lett.* **2018**, 29 (1), 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.07.008>.
- (253) Jeong, Y.-I.; Kim, D.-G.; Jang, M.-K.; Nah, J.-W. Preparation and Spectroscopic Characterization of Methoxy Poly(Ethylene Glycol)-Grafted Water-Soluble Chitosan. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343 (2), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.025>.

- (254) Ren, L.; He, L.; Sun, T.; Dong, X.; Chen, Y.; Huang, J.; Wang, C. Dual-Responsive Supramolecular Hydrogels from Water-Soluble PEG-Grafted Copolymers and Cyclodextrin. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (9), 902–910. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900021>.
- (255) Chen, X.; Zhang, G.; Zhang, Q.; Zhan, X.; Chen, F. Preparation and Performance of Amphiphilic Polyurethane Copolymers with Capsaicin-Mimic and PEG Moieties for Protein Resistance and Antibacteria. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2015**, *54* (15), 3813–3820. <https://doi.org/10.1021/ie505062a>.
- (256) Uslan, C.; İşleyen, N. D.; Öztürk, Y.; Yıldız, B. T.; Çakar, Z. P.; Göksel, M.; Durmuş, M.; Gürsel, Y. H.; Sesalan, B. Ş. A Novel of PEG-Conjugated Phthalocyanine and Evaluation of Its Photocytotoxicity and Antibacterial Properties for Photodynamic Therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2018**, *22* (01n03), 10–24. <https://doi.org/10.1142/S1088424617500729>.
- (257) Nehls, E. M.; Rosales, A. M.; Anseth, K. S. Enhanced User-Control of Small Molecule Drug Release from a Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel via Azobenzene/Cyclodextrin Complex Tethers. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (6), 1035–1039. <https://doi.org/10.1039/C5TB02004B>.
- (258) Chirife, J.; Herszage, L.; Joseph, A.; Bozzini, J. P.; Leardini, N.; Kohn, E. S. In Vitro Antibacterial Activity of Concentrated Polyethylene Glycol 400 Solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24* (3), 409–412. <https://doi.org/10.1128/aac.24.3.409>.
- (259) Peng, L.; Chang, L.; Liu, X.; Lin, J.; Liu, H.; Han, B.; Wang, S. Antibacterial Property of a Polyethylene Glycol-Grafted Dental Material. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (21), 17688–17692. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05284>.
- (260) Azagarsamy, M. A.; Alge, D. L.; Radhakrishnan, S. J.; Tibbitt, M. W.; Anseth, K. S. Photocontrolled Nanoparticles for On-Demand Release of Proteins. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (8), 2219–2224. <https://doi.org/10.1021/bm300646q>.
- (261) Hu, Y.; Marlow, J. B.; Ramanathan, R.; Zou, W.; Tiew, H. G.; Pottage, M. J.; Bansal, V.; Tabor, R. F.; Wilkinson, B. L. Synthesis and Properties of Photoswitchable Carbohydrate Fluorosurfactants. *Aust. J. Chem.* **2015**, *68* (Copyright (C) 2017 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 1880–1884. <https://doi.org/10.1071/CH15434>.
- (262) Kazemi, F.; Massah, A. R.; Javaherian, M. Chemoselective and Scalable Preparation of Alkyl Tosylates under Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron* **2007**, *63* (23), 5083–5087. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.03.083>.
- (263) Sharma, N. K.; Singh, M.; Bhattarai, A. Hydrophobic Study of Increasing Alkyl Chain Length of Platinum Surfactant Complexes: Synthesis, Characterization, Micellization, Thermodynamics, Thermogravimetrics and Surface Morphology. *RSC Adv.* **2016**, *6* (93), 90607–90623. <https://doi.org/10.1039/C6RA20330B>.
- (264) Lundin, J. G.; Coneski, P. N.; Fulmer, P. A.; Wynne, J. H. Relationship between Surface Concentration of Amphiphilic Quaternary Ammonium Biocides in Electrospun Polymer Fibers and Biocidal Activity. *React. Funct. Polym.* **2014**, *77* (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.02.004>.

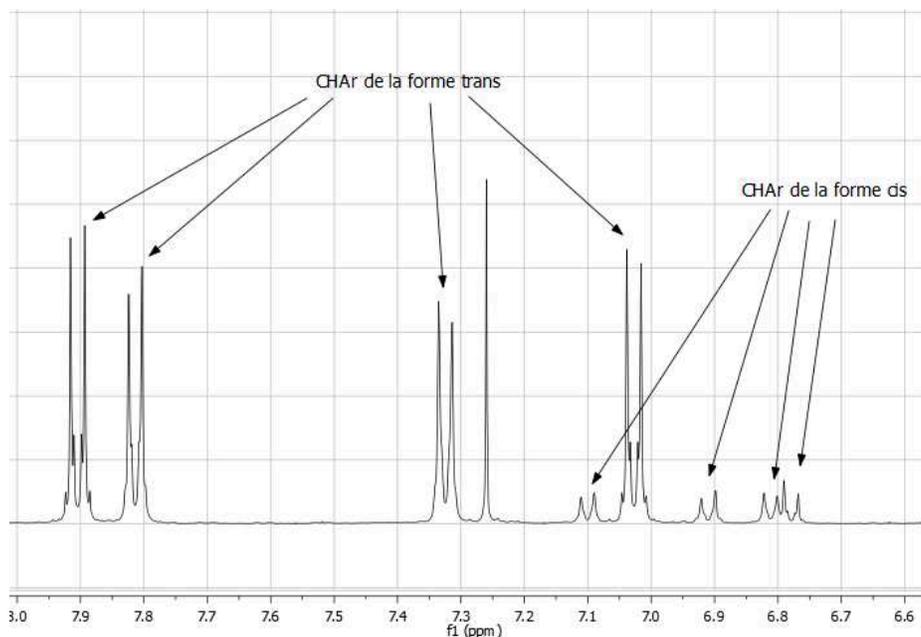
- (265) Damijonaitis, A.; Broichhagen, J.; Urushima, T.; Hüll, K.; Nagpal, J.; Laprell, L.; Schönberger, M.; Woodmansee, D. H.; Rafiq, A.; Sumser, M. P.; et al. AzoCholine Enables Optical Control of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Neural Networks. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (5), 701–707. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00030>.
- (266) Pané, S.; Gómez, E.; Vallés, E. Influence of a Magnetic Field during the CoNi Electrodeposition in the Presence of Magnetic Nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *615* (2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.12.002>.
- (267) Pané, S.; Gómez, E.; Garcia-Amorós, J.; Velasco, D.; Vallés, E. Modulation of the Magnetic Properties of CoNi Coatings by Electrodeposition in the Presence of a Redox Cationic Surfactant. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *253* (5), 2964–2968. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.06.040>.
- (268) Selvaggi, G.; Monstrey, S.; Landuyt, K. V.; Hamdi, M.; Blondeel, Ph. The Role of Iodine in Antisepsis and Wound Management: A Reappraisal. *Acta Chir. Belg.* **2003**, *103* (3), 241–247. <https://doi.org/10.1080/00015458.2003.11679417>.
- (269) Patwardhan, N.; Kelkar, U. Disinfection, Sterilization and Operation Theater Guidelines for Dermatological Practitioners in India. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **2011**, *77* (1), 83. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.74965>.
- (270) Grare, M. De La Genèse d'une Nouvelle Classe d'antibactériens à Base de Polyphénols Cycliques de Type Calixarène. Etudes Moléculaires(s), Cellulaire(s), et Structurale(s) En Vue de l'identification Des Cibles d'action : Le Cas Du Para-Guanidioéthylcalix[4]Arène, Université Henry poincaré, Nancy-1, 2009.
- (271) Denis, F.; Ploy, M.-C.; Martin, C.; Cattoir, V. *Bactériologie médicale: techniques usuelles*; 2016.
- (272) Yang, C. J.; Lin, H.; Tan, W. Molecular Assembly of Superquenchers in Signaling Molecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (37), 12772–12773. <https://doi.org/10.1021/ja053482t>.
- (273) Kovaliov, M.; Wachtel, C.; Yavin, E.; Fischer, B. Synthesis and Evaluation of a Photoresponsive Quencher for Fluorescent Hybridization Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (39), 7844–7858. <https://doi.org/10.1039/C4OB01185F>.
- (274) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **1996**, *1286* (3), 183–223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3).
- (275) Petra, Š.; Věra, K.; Iva, H.; Petr, H.; Zdeňka, K.; Leona, B. Formulation, Antibacterial Activity, and Cytotoxicity of 1-Monoacylglycerol Microemulsions: Antibacterial Activity of 1-Monoacylglycerol Microemulsions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116* (4), 448–457. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300171>.
- (276) Kondejewski, L. H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Farmer, S. W.; Lix, B.; Kay, C. M.; Sykes, B. D.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. Dissociation of Antimicrobial and Hemolytic Activities in Cyclic Peptide Diastereomers by Systematic Alterations in Amphipathicity. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (19), 13181–13192. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13181>.

- (277) Rodríguez, A.; Villegas, E.; Montoya-Rosales, A.; Rivas-Santiago, B.; Corzo, G. Characterization of Antibacterial and Hemolytic Activity of Synthetic Pandinin 2 Variants and Their Inhibition against Mycobacterium Tuberculosis. *PLoS ONE* **2014**, *9* (7), e101742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101742>.
- (278) Andra, J.; Koch, M. H. J.; Bartels, R.; Brandenburg, K. Biophysical Characterization of Endotoxin Inactivation by NK-2, an Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (5), 1593–1599. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1593-1599.2004>.
- (279) Ebbensgaard, A.; Mordhorst, H.; Aarestrup, F. M.; Hansen, E. B. The Role of Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides for the Sensitivity of Escherichia Coli to Antimicrobial Peptides. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02153>.
- (280) Kanazawa, A.; Ikeda, T.; Endo, T. Synthesis and Antimicrobial Activity of Dimethyl- and Trimethyl-Substituted Phosphonium Salts with Alkyl Chains of Various Lengths. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (5), 945–952. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.5.945>.
- (281) Laprell, L.; Tochitsky, I.; Kaur, K.; Manookin, M. B.; Stein, M.; Barber, D. M.; Schön, C.; Michalakakis, S.; Biel, M.; Kramer, R. H.; et al. Photopharmacological Control of Bipolar Cells Restores Visual Function in Blind Mice. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127* (7), 2598–2611. <https://doi.org/10.1172/JCI92156>.
- (282) Chen, C.-Y.; Li, K.-H.; Chu, Y.-H. Reaction-Based Detection of Chemical Warfare Agent Mimics with Affinity Ionic Liquids. *Anal. Chem. Wash. DC U. S.* **2018**, *90* (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 8320–8325. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01763>.
- (283) Johnson, L.; Ringstrand, B.; Kaszynski, P. A Convenient Preparation of Long Chain 4-(4-*n*-Alkylphenylazo)Phenols and Their 4-Pentylbenzoate Esters. *Liq. Cryst.* **2009**, *36* (2), 179–185. <https://doi.org/10.1080/02678290902759210>.
- (284) Jia, K.; Zhang, X.; Zhang, L.; Yu, L.; Wu, Y.; Li, L.; Mai, Y.; Liao, B. Photoinduced Reconfiguration of Complex Emulsions Using a Photoresponsive Surfactant. *Langmuir* **2018**, *34* (38), 11544–11552. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02456>.
- (285) Liu, J.; Tan, C. S. Y.; Scherman, O. A. Dynamic Interfacial Adhesion through Cucurbit[*n*]Urils Molecular Recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (29), 8854–8858. <https://doi.org/10.1002/anie.201800775>.
- (286) Okumura, Y.; Ito, K. The Polyrotaxane Gel: A Topological Gel by Figure-of-Eight Cross-Links. *Adv. Mater.* **2001**, *13* (7), 485–487. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200104\)13:7<485::AID-ADMA485>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200104)13:7<485::AID-ADMA485>3.0.CO;2-T).
- (287) Xiong, C.; Xie, M.; Sun, R. Responsiveness and Morphology Study of Dual Stimuli-Controlled Supramolecular Polymer. *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38* (19), 1700358–1700366. <https://doi.org/10.1002/marc.201700358>.

- (288) Yoshino, N.; Nagasaki, A.; Kondo, Y.; Abe, M. Syntheses of Amphiphiles Containing Two Azobenzene Units in a Molecule. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **1995**, *44* (12), 1075–1085. <https://doi.org/10.5650/jos1956.44.1075>.
- (289) Deleu, M.; Deboever, E.; Nasir, M. N.; Crowet, J.-M.; Dauchez, M.; Ongena, M.; Jijakli, H.; Fauconnier, M.-L.; Lins, L. Linoleic and Linolenic Acid Hydroperoxides Interact Differentially with Biomimetic Plant Membranes in a Lipid Specific Manner. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.014>.
- (290) Lins, L.; Brasseur, R. The Hydrophobic Effect in Protein Folding. *FASEB J.* **1995**, *9* (7), 535–540. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737462>.

ANNEXE

Zoom sur les protons aromatiques de 4-éthyl-4'-(2 hydroxyéthoxy)azobenzène



Liste des publications et des communications :

Antoine Franche, Antoine Fayeulle, Laurence Lins, Muriel Billamboz, Isabelle Pezron, Magali Deleu et Estelle Léonard. Amphiphilic azobenzenes: Antibacterial activities and biophysical investigation of their interaction with bacterial membrane lipids *Bioorganic Chemistry*, **2019**, pp.103399

Antoine Franche, Claire Imbs, Antoine Fayeulle, Franck Merlier, Muriel Billamboz et Estelle Léonard. Zinc-mediated reactions on salicylaldehyde for *Botrytis cinerea* control. *Chinese Chemical Letters*, **2019**

Antoine Franche, Antoine Fayeulle, Isabelle Pezron, Magali Deleu, Estelle Léonard. Antibacterial intelligent amphiphiles. *ISGC 2019 International Conference*, **Mai 2019**, La Rochelle, France



Contents lists available at ScienceDirect

Chinese Chemical Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cclet



Original article

Zinc-mediated reactions on salicylaldehyde for *Botrytis cinerea* control

Antoine Franche^a, Claire Imbs^b, Antoine Fayeulle^a, Franck Merlier^c, Muriel Billamboz^d,
Estelle Léonard^{b,*}

^aSorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA TIMR 4297, Centre de recherche de Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne cedex, France

^bESCOM, UTC, EA TIMR 4297, 1 allée du Réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France

^cSorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Génie Enzymatique et Cellulaire (GEC), UMR-CNRS 7025, CS 60319, 60203 Compiègne Cedex, France

^dLaboratoire de chimie durable et santé, Yncrea Hauts-de-France, HEI, 13 rue de Toul, 59046 Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2019

Received in revised form 9 August 2019

Accepted 28 August 2019

Available online xxx

Keywords:

Salicylaldehyde

Zinc-mediated reactions

Green solvents

Alkoxyphenol

PEG-cresol

Botrytis cinerea control

ABSTRACT

Botrytis cinerea is a necrotrophic fungus that affects various plant species. Chemical control is a necessity and as much as possible, eco-friendly conditions and bioresources to obtain these chemicals should be used. In this context, a series of products was obtained from salicylaldehyde using zinc as a powerful reagent and tested for antifungal activity against *Botrytis cinerea*

© 2019 Chinese Chemical Society and Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences.
Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Botrytis cinerea is mainly responsible for the so-called grey rot on various plants. Principal targets are onions [1], beans [2], tomatoes [3], but also grapevines [4,5] and over 230 plant species over the world [6]. Unfortunately, resistance phenomena were observed towards various treatments. *Botrytis cinerea* tolerates chlorinated nitrobenzene antifungals [7] as well as benzimidazoles [8], and dicarboximides [5,9]. However, molecules containing phenol and/or alkoxybenzenes are commercialized for their antifungal activity against *Botrytis cinerea* (Fig. 1).

New chemicals based on these phenols and/or alkoxybenzenes cores can be synthesized, using as much as possible eco-friendly conditions and bioresources to obtain these chemicals. In this context, salicylaldehyde was first discovered in 1838, from *Filipendula vulgaris* [11] and possessed simultaneously a phenol group that might be interesting against *Botrytis cinerea* and an aldehyde moiety, which is a useful group for functionalization especially into ether group. For this ether formation from carbonyl moiety can be cited for example, the use of functionalized silanes and catalysts [12–14], of frustrated Lewis pair catalysts hydrogenation with alkyl orthoformate [15], or of tin reagents [16]. The

reductants can be also either complex hydrides [17] or dihydrogen on Pd/Ru [18,19]. But to the best of our knowledge, no zinc reaction in polar solvents was used to achieve this reaction. Moreover, reduction of carbonyl compounds thanks to zinc-mercury amalgam is well-known as Clemmensen reaction [20]. But Clemmensen-like reactions in the absence of mercury remain discreet [21,22]. Other reactions leading to hydrocarbons from carbonyls can be used [23], as for example Huang-Minlon modification of Wolff-Kishner reduction under microwave irradiation [24,25]. However zinc, by its low cost, its good performances in reduction or coupling and its compatibility with many solvents is a prime reagent to obtain biocides from *o*-salicylaldehyde.

First, zinc-mediated Clemmensen reduction was performed on *o*-salicylaldehyde (1) by using green solvents as ethanol, water, glycerol or without solvent. These reactions were performed under microwave irradiation, and reaction temperature was modulated from 150 °C to 190 °C.

From Table 1 can be deduced that amongst the green solvent used (EtOH, water, glycerol, entries 1–3) or without solvent (entry 4), ethanol is the best solvent for the reaction leading to 44% isolated yield at 150 °C. Indeed, when water was used as solvent (entry 2) or if no solvent was added (entry 4), miscibility problem between acetic acid and salicylaldehyde was observed. To investigate whether the content of AcOEt at the end of reaction

* Corresponding author.

E-mail address: e.leonard@escom.fr (E. Léonard).

<https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.08.053>

1001-8417/© 2019 Chinese Chemical Society and Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

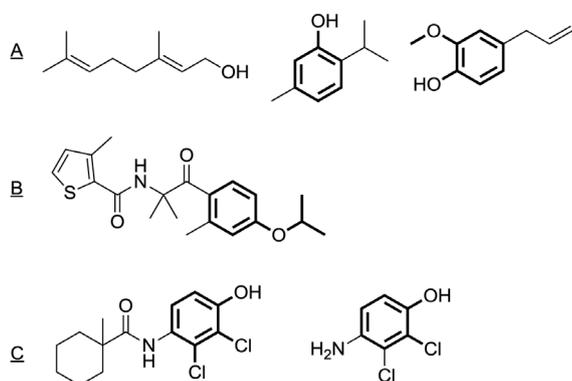


Fig. 1. Active ingredients of A: Mevalone (SUMIAGRO); B: Kenja (SUMMIT AGRO); C: Teldor® (BAYER) [10].

Table 1
Optimization of the reaction conditions.^a

| Entry | Solvent | Temperature (°C) | Yield (%) ^b |
|-------|----------------|------------------|------------------------|
| 1 | EtOH | 150 | 44 |
| 2 | Water | 150 | 19 |
| 3 | Glycerol | 150 | 23 |
| 4 | - ^c | 150 | 2 |
| 5 | AcOEt | 150 | 11 |
| 6 | EtOH | 30 | 5 |
| 7 | EtOH | 160 | 45 |
| 8 | EtOH | 170 | 48 |
| 9 | EtOH | 180 | 56 |
| 10 | EtOH | 190 | 38 |

^a Reaction conditions: salicylaldehyde (3 mmol), zinc (15 mmol, 5 equiv.) in 6 mL mixture of solvent/AcOH(5/1, v/v), MW 15 min.

^b Gas chromatography yield using naphthalene as internal standard.

^c In this case, as no solvent was used, only 1 mL AcOH was added.

was responsible for the good yield with EtOH, a reaction with AcOEt as solvent was performed (entry 5) and led only to a yield of 11% in compound **2** leading to the conclusion that AcOEt was not

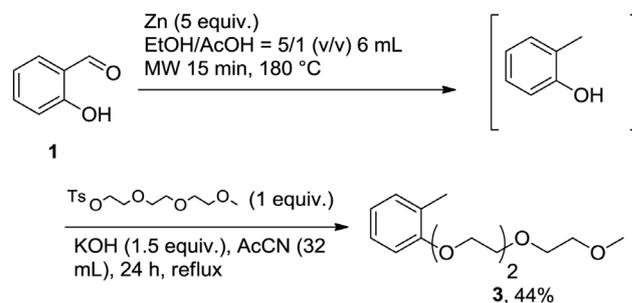
Table 2
Conversion and selectivity of the reaction using various metal source.^a

| Entry | M (equiv.) | EtOH/H ₂ O/AcOH (v/v/v) | Conversion (%) ^b | Selectivity 4/5 (%) ^b |
|-------|------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 1 | Zn (5) | 9/0/1 | 77 | 95/5 |
| 2 | Mg (5) | 9/0/1 | 4 | ND ^c |
| 3 | Al (5) | 9/0/1 | 58 | 0/100 |
| 4 | Fe (5) | 9/0/1 | 74 | 2/98 |
| 5 | Cu (5) | 9/0/1 | 0 | ND ^c |
| 6 | Zn (5) | 6/3/0 | 5 | ND ^c |
| 7 | Zn (5) | 4.5/4.5/1 | 58 | 72/28 |
| 8 | Zn (1) | 9/0/1 | 48 | 69/31 |
| 9 | Zn (3) | 9/0/1 | 55 | 87/13 |
| 10 | Zn (6) | 9/0/1 | 67 | 95/5 |

^a Reaction conditions: salicylaldehyde (3 mmol), M (n equiv.) in a 6 mL mixture of EtOH/H₂O/AcOH (v/v/v), MW 15 min, 150 °C.

^b Gas chromatography conversion and selectivity using naphthalene as internal standard.

^c ND = Not determined.



Scheme 1. Synthesis of compound **3**.

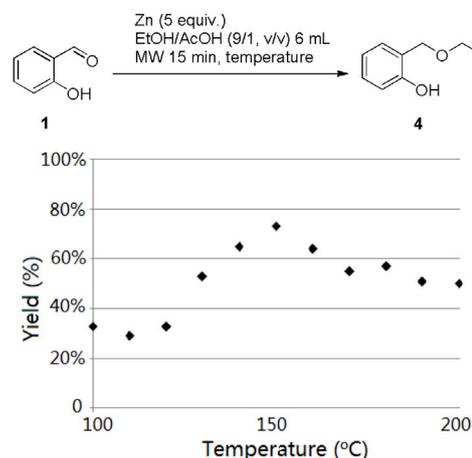
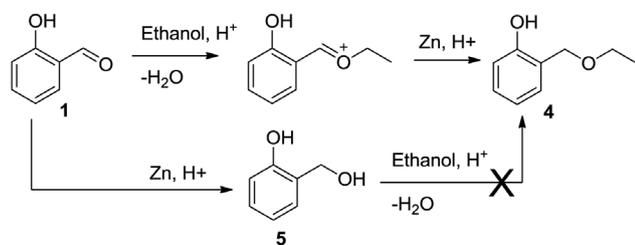


Fig. 2. Synthesis of compound **4**. Gas chromatography yield using naphthalene as internal standard.

responsible for the yields obtained with EtOH. Then the reaction performed at 30 °C (entry 6) only led to 5% yield, whereas at 160 °C (entry 7) and 170 °C (entry 8) the yields obtained were just below 50%. Increasing the temperature to 180 °C (entry 9) seemed to be the best one leading to 56% yield, whereas at 190 °C (entry 10), the molecule **2** was only obtained in 38% yield.

Then, under microwave irradiation at 180 °C for 15 min, *o*-salicylaldehyde (**1**) was reduced to *o*-cresol and was used



Scheme 2. Proposed mechanism of the formation of **4**.

without purification for a nucleophilic substitution with triethylene glycol monomethyl ether [26] leading to compound **3**, with an overall isolated yield of 44% (Scheme 1). This one-pot/two-step procedure is in accordance with some of the principles of green chemistry [27].

Indeed, if the yield of reaction remains modest, these two steps are in accordance with eco-friendly chemistry. Indeed, solvents are

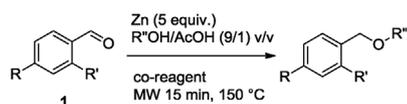
green-light (green, step 1) and orange-light (usable, step 2) according to Pfizer “traffic light” of environmental solvent impact [28].

In a second time, as alkoxyphenols could have a real importance against *Botrytis cinerea*, zinc-mediated reductive coupling reaction between *o*-salicylaldehyde (**1**) and ethanol was performed for the reaction optimization. As seen on Fig. 2, from 100 °C to 150 °C, the yields of **4** increased from 33% to 73%, and then from 150 °C to 200 °C, they decreased to 50%. Indeed, because of the zinc ability to heat up to 500 °C under microwave irradiation, it can be supposed that above 150 °C in reaction media, some degradation may occur.

Then, various metals such as magnesium, aluminum, iron, and copper powders were tested and compared to zinc. The results (Table 2) suggest that only zinc is reactive for the alcohol-carbonyl reductive coupling (entry 1).

Indeed, we had to take into account that some metals can perform homo-pinacol coupling (Zn, Mg), or reduction to compound **5** (Al, Fe) in addition to product **4**. Mg, Al, Fe and Cu (entries 2–5) gave poor yields of product **4** (Table 2). In our case, the

Table 3
Scope of the reaction.



| Entry | R | R' | Alcohol | Product | Yield (%) ^a |
|-------|----|----|-----------------------------------|------------------|------------------------|
| 1 | H | OH | C ₂ H ₅ OH | 4 [32] | 73 |
| 2 | H | OH | C ₄ H ₉ OH | 6 [33,34] | 59 |
| 3 | H | OH | C ₆ H ₁₃ OH | 7 | 26 |
| 4 | H | OH | | 8 | - ^b |
| 5 | H | OH | | 9 | - ^b |
| 6 | H | OH | | 10 | 24 |
| 7 | Br | H | C ₂ H ₅ OH | 11 | - ^c |
| supp8 | H | OH | C ₂ H ₅ OH | 12 | 61 ^d |

^a Isolated yields.

^b Only neopentyl acetate (entry 4) or *tert*-butyl acetate (entry 5) were obtained.

^c Only 4-bromobenzylalcohol was obtained.

^d The volume ratio of EtOH/AcOH was 1/1 (v/v) and (*E*)-hex-2-enal was added as co-reagent.

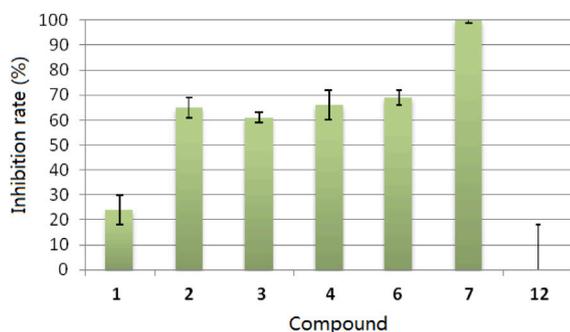


Fig. 3. Inhibitory rates of *Botrytis cinerea* by compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **7** and **12** at a concentration of 50 µg/mL.

reaction with Mg gave homo-pinacol coupling in 24% yield, where no Pinacol coupling was observed when zinc was used. As mentioned above, one of the most known side-reaction of the envisioned one is called Bouveault-Blanc reaction, and consists in reduction of carbonyl into alcohol moiety usually using sodium as reductant. Under our best conditions (using zinc, under microwave irradiation, at 150 °C for 15 min.), the selectivity of compound **4** over hydroxybenzyl alcohol **5** was depending on the presence or absence of acetic acid and water. Indeed, in the presence of water but not acetic acid (entry 6), only 5% of conversion was observed, whereas in the presence of acetic acid and water (entry 7), 58% conversion was obtained, but with a lower selectivity than without water (entry 1). Moreover, as the reaction took place in the surface of the zinc powder, 5 equiv. of zinc were necessary to obtain the best yield of compound **4** (entries 1, 8–10).

For the formation of compound **4**, two mechanistic pathways could be envisioned (Scheme 2): the upper one uses first ethanol in acidic conditions to obtain the oxonium ion [29]. Then zinc in acetic acid leads to the reached ether. The other pathway is the two-electron reduction of the aldehyde [30], followed by the ethanol addition. As the reaction directly performed from the benzylic alcohol **5** [31] did not succeed, that led us to suggest the upper pathway as a mechanism for the reaction (Scheme 2).

To evaluate the scope of the reaction, the reaction was performed on butyl alcohol and hexyl alcohol, and hexenyl alcohol (Table 3, entries 2, 3 and 6).

It is noticeable that, due to the microwave ability to act on polar molecules, the bigger is the aliphatic chain length of alkyl alcohols, the worse is the reaction yield. So in our conditions, products **4**, **6**, **7** and **10** were obtained in 73%, 59%, 26% and 24%, respectively (entries 1, 2, 3 and 6). When more hindered alcohols were chosen as neopentyl alcohol (entry 4) and *tert*-butyl alcohol (entry 5) no attended product was obtained. Reaction on bromobenzaldehyde did not give the attended product (entry 7). Finally, as salicylaldehyde was not able in our conditions to give any homo-pinacol coupling, we tested the reaction with a ratio EtOH/AcOH (1:1, v/v) to minimize the ether formation and added hexenal (entry 8) which gave product **12** of hetero-pinacol coupling in 61% yield (entry 8). For more details about the syntheses, please see the Supporting information.

Some of the synthesized compounds were evaluated for their *in vitro* antifungal potential against *Botrytis cinerea* (MUCL000399). First the compounds were tested on the mycelium of *Botrytis cinerea* at a concentration of 50 µg/mL and gave the inhibition rates shown in Fig. 3. From Fig. 3 one can clearly conclude that all the compounds synthesized had a significantly better effect on *Botrytis cinerea* than the starting material salicylaldehyde **1**. Cresol **2** had an effect just above 60%, which can be compared to ethyloxymethylphenol **4**. Compound **3** seems to be less efficient than cresol **2** and butyloxymethylphenol **6** had inhibition rates of

Table 4
MIC measurements (µg/mL)

| Compound | Inhibitory rate (%) | | |
|----------------|---------------------|-----|-----|
| | 50 | 70 | 90 |
| Ketoconazole | 2 | 15 | >30 |
| Amphotericin B | 7.5 | >30 | >30 |
| 3 | 30 | 50 | ND |
| 6 | 40 | 50 | ND |
| 7 | 10 | 20 | 20 |

69%. Pinacol **12** did not give any inhibitory rate, but the most active compound was clearly and significantly hexyloxymethylphenol **7** with an inhibition rate of 100%.

So MIC (minimum inhibitory concentration) was chosen to be performed on compounds **3**, **6** and **7**. As molecules having antifungal activities on plant pathogens usually act on respiration (thiram, mancozeb, captan, dichlofluanid, tolylfluanid); Cytochrome *b* (strobilurins); β -tubulin (MBC-generating pesticides); Osmoregulation (dicarboximides); Sterol biosynthesis (Fenhexamide) or Hydrolytic enzymes secretion (anilopyrimidines) [35], our molecules **3**, **6** and **7** were compared to positive control standards Ketoconazole [36] and Amphotericin B [37] which were chosen due to their capability to interact with membrane ergosterol. Table 4 confirms the interest of compound **7**, which enables to reach 50 and 70% of inhibition with lower concentrations than the two other tested compounds. The compound **7** even enables to reach 90% of inhibition, which was not possible with the two other molecules for the tested concentration range. Compared to positive controls, results of compound **7** remain interesting. Indeed even if Ketoconazole and Amphotericin B trigger 50% of inhibition with lower concentrations, they do not enable to reach 90% for 20 µg/mL as the compound **7** does for this fungal strain.

To conclude a series of biocides from *o*-salicylaldehyde by using zinc was obtained, which possesses good performances in reductive ether formation, Clemmensen-like reaction, or hetero-pinacol coupling. Alkoxyphenol compounds proved to be particularly interesting for *Botrytis cinerea* control. In this context, studies are ongoing within the team to design new antifungal agents from other bioresources.

Acknowledgments

Authors would like to thank ESCOM for funding, as well as Wallonie-Bruxelles International et le Fonds National de la Recherche Scientifique pour la communauté française de Belgique, Ministère des Affaires Étrangères et du Développement International (MAEDI) et Ambassade de France en Belgique pour la France and by the Region of Picardie, France (cofunding of equipment under CPER 2007–2020 project). Authors would also like to thank Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie for Research fellowships.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.08.053>.

References

- [1] M.I. Chilvers, L.J. du Tiot, *Plant Health Prog.* **7** (2006), doi:<http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2006-1127-01-DG>.
- [2] Y. Li, S. Sun, C. Du, et al., *Crop Prot.* **85** (2016) 52–56.
- [3] A. Wakeham, A. Langton, S. Adams, R. Kennedy, *Crop Prot.* **90** (2016) 27–33.
- [4] A. Panebianco, I. Castello, G. Cirvillieri, et al., *Crop Prot.* **77** (2015) 65–73.
- [5] P. Leroux, M. Clerjeau, *Crop Prot.* **4** (1985) 137–160.

- [6] Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Springer, Dordrecht, 2007, pp. 1–8.
- [7] M.J. Reavill, *Ann. Appl. Biol.* 41 (1954) 448–460.
- [8] G.J. Bollen, G. Scholten, *Neth. J. Plant Pathol.* 77 (1971) 83–90.
- [9] T. Katan, *Plant Pathol.* 31 (1982) 133–141.
- [10] "Fongicides Teldor® : Bayer-Agri, traitement phytopharmaceutique pour la protection des cultures – Teldor®," <https://www.bayer-agri.fr/produits/fiche/fongicides-teldor>.
- [11] N. Radulović, M. Mišić, J. Aleksić, et al., *Fitoterapia* 78 (2007) 565–570.
- [12] M.S. Yang, L.W. Xu, H.Y. Qiu, G.Q. Lai, J.X. Jiang, *Tetrahedron Lett.* 49 (2008) 253–256.
- [13] B.A. Gellert, N. Kahlcke, M. Feurer, S. Roth, *Chem. – Eur. J.* 17 (2011) 12203–12209.
- [14] G.L. Larson, J.L. Fry, *Org. React.* 71 (2008) 1–737.
- [15] M. Bakos, Á. Gyömöre, A. Domján, T. Soós, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (2017) 5217–5221.
- [16] J.P. Quintard, B. Elissondo, D. Mouko-Mpegna, *J. Organomet. Chem* 251 (1983) 175–187.
- [17] P.H.J. Carlsen, M. Ystenes, U. Ragnarsson, T. Anthonsen, R. Kivekäs, *Acta Chem. Scand.* 40b (1986) 757–759.
- [18] R.M. Mironenko, O.B. Belskaya, T.I. Gulyaeva, et al., *Catal. Today* 279 (2017) 2–9.
- [19] R.M. Mironenko, O.B. Belskaya, V.I. Zaikovskii, V.A. Likholobov, *Monatshefte Für Chem. – Chem. Mon.* 146 (2015) 923–930.
- [20] E. Clemmensen, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* 46 (1913) 1837–1843.
- [21] S. Yamamura, S. Ueda, Y. Hirata, *Chem. Commun.* (1967) 1049–1050.
- [22] S. Yamamura, Y. Hirata, *J. Chem. Soc. C* (1968) 2887–2889.
- [23] B.P. Bandgar, S.N. Kshirsagar, P.P. Wadgaonkar, *Synth. Commun.* 25 (1995) 941–945.
- [24] P. Jaisankar, B. Pal, V.S. Giri, *Synth. Commun.* 32 (2002) 2569–2573.
- [25] S. Chattopadhyay, S.K. Banerjee, A.K. Mitra, *J. Indian Chem. Soc.* 79 (2002) 906–907.
- [26] M. Yoshimoto, K. Honda, S. Kurosawa, M. Tanaka, *J. Phys. Chem. C* 118 (2014) 16067–16073.
- [27] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, 1998.
- [28] C. Reichardt, T. Welton, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 4th Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2010.
- [29] C. Zhao, C.A. Sojda, W. Myint, D. Seidel, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 10224–10227.
- [30] T. Hirao, S. Santhitukul, H. Takeuchi, A. Ogawa, H. Sakurai, *Tetrahedron* 59 (2003) 10147–10152.
- [31] A.R. Surrey, *Name Reactions in Organic Chemistry*, 2nd Ed., Academic Press, 1961, pp. 27–28.
- [32] Y. Herzig, L. Lerman, W. Goldenberg, et al., *J. Org. Chem.* 71 (2006) 4130–4140.
- [33] A.R. Katritzky, Z. Zhang, X. Lan, H. Lang, *J. Org. Chem.* 59 (1994) 1900–1903.
- [34] M.T. Richers, M. Breugst, A.Y. Platonova, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 6123–6135.
- [35] B. Williamson, B. Tudzynski, P. Tudzynski, J.a.L.V. Kan, *Mol. Plant Pathol.* 8 (2007) 561–580.
- [36] M. Borgers, H. Van den Bossche, M. De Brabander, *Am. J. Med.* 74 (1983) 2–8.
- [37] I. Fournier, J. Barwicz, P. Tancrede, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* 1373 (1998) 76–86.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioorg

Amphiphilic azobenzenes: Antibacterial activities and biophysical investigation of their interaction with bacterial membrane lipids

A. Franche^a, A. Fayeulle^a, L. Lins^b, M. Billamboz^c, I. Pezron^a, M. Deleu^{b,*}, E. Léonard^{d,*}^a Sorbonne University, Université de technologie de Compiègne, ESCOM, EA TIMR 4297, Centre de recherche de Royallieu, CS 60319, 60203 Compiègne Cedex, France^b TERRA Research Center, Laboratory of Molecular Biophysics at Interfaces, SFR Condorcet, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés, 2, 5030 Gembloux, Belgium^c Laboratoire de chimie durable et santé, Yncrea Hauts-de-France, HEI, 13 rue de Toul, 59046 Lille Cedex, France^d ESCOM, UTC, EA TIMR 4297, 1 allée du Réseau Jean-Marie Buckmaster, 60200 Compiègne, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Azo amphiphile compounds
Organic synthesis
Antibacterial activity
Membrane interaction

ABSTRACT

With the emergence of multi-drug resistant bacteria and hospital-acquired infections, there is an urgent need to develop new antibiotics. Here, we report the synthesis, physico-chemical characterizations, and antimicrobial activity assays of four Azo compounds that differ in their alkyl chain length. The molecular mechanism of their antibacterial activity was investigated by complementary *in vitro* and *in silico* biophysical studies. The compounds with alkyl chain lengths of four or six carbons showed a low MIC₅₀ against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Our investigations into the mechanism of their action revealed that phosphatidylethanolamine in the bacterial plasma membrane plays an important role in their antibacterial activity.

1. Introduction

The emergence of nosocomial multi-drug resistant (MDR) bacterial strains is a growing concern in hospitals and underlines the urgent need for the development of novel antibacterial agents [1,2]. The azo compounds are used in a wide range of applications such as surfactants [3–5], catalysts [6], gelators [7], and liquid crystals [8,9]. Recently, azo-amphiphiles have been shown to exhibit a high biocide potential, especially if they contain a cationic head group such as quaternary ammonium salt. Although azobenzene derived compounds can exist either as *cis* or *trans* isomer, in the case of the quaternary ammonium derivative azobenzene derivative, the *trans*-isomer displayed more potent antimicrobial activity than the *cis*-isomer [10]. Azo compounds are well known to interact with the bacterial cell membrane [11–13] and the membrane permeabilizing effect of the quaternary ammonium *trans* derivatives was shown to be greater than the *cis* one [10]. However, the molecular details of the mechanism are not well documented. In this context, our strategy was to synthesize novel amphiphilic bioactive azobenzenes, to evaluate their potential as antibacterial agents and to investigate their interaction with model membranes that mimic the plasma membrane of bacteria, to elucidate the mechanism of their antibacterial activities.

Two rod-shaped bacteria, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, were considered for antibacterial tests because of their different cell wall

structures (*E. coli* as a gram-negative model and *B. subtilis* as gram-positive) and because they belong to species encompassing pathogenic MDR strains [14,15].

2. Results and discussion

2.1. Synthesis

Starting from 4-alkyl-azobenzene-4'-alcohols (1a–1d) [4,16–18], we performed Williamson reaction with 2-chloroethanol in the presence of potassium iodide and potassium carbonate to get azobenzenes (2a–2d) with yields of 34–79%. Tosylation of the primary alcohol gave derivatives 3a–3d, but the products were found to be highly unstable. Therefore, they were used in the next step without purification to prevent any degradation during the purification steps. Finally, nucleophilic substitution followed by amine quaternarization led to the target products, *trans*-H-AZOTAI 4a, *trans*-Et-AZOTAI 4b, *trans*-Bu-AZOTAI 4c, and *trans*-Hex-AZOTAI 4d with yields of 10% to 98% (see Scheme 1).

The overall yields of the products were 8% (*trans*-H-AZOTAI 4a, R = H), 16% (*trans*-Et-AZOTAI 4b, R = C₂H₅), 33% (*trans*-Bu-AZOTAI 4c, R = C₄H₉), and 10% (*trans*-Hex-AZOTAI 4d, R = C₆H₁₃). The yield of product 4c was higher than other compounds because of ease of purification.

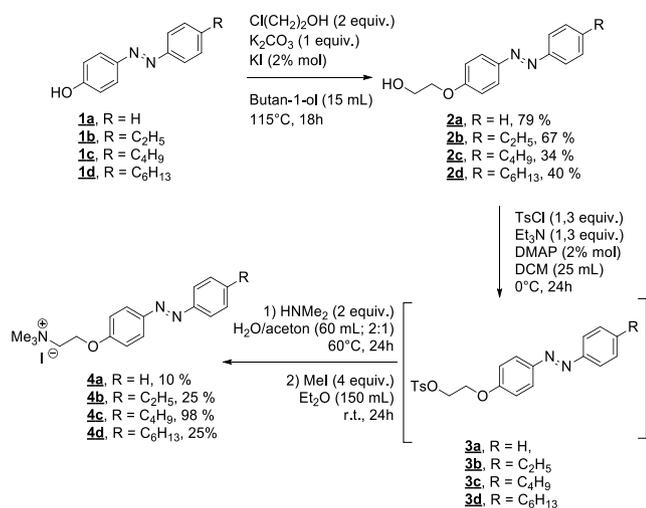
* Corresponding authors.

E-mail addresses: magali.deleu@uliege.be (M. Deleu), e.leonard@escom.fr (E. Léonard).<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103399>

Received 9 August 2019; Received in revised form 23 October 2019; Accepted 24 October 2019

Available online 28 October 2019

0045-2068/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.



Scheme 1. Synthesis of AZOTAI family.

2.2. Properties in solution

The amphiphilic property of all native *trans* isomers **4a–4d** was studied by monitoring the decrease in the equilibrium surface tension of water with increasing concentrations of the compound. The *trans*-isomer composition in the compounds were 76%, *trans*-H-AZOTAI **4a**; 88%, *trans*-Et-AZOTAI **4b**; 90%, *trans*-Bu-AZOTAI **4c**; and 80%, *trans*-Hex-AZOTAI **4d**. As shown in Fig. 1, when the equilibrium surface tension was plotted against the concentration for **4a–4d** compounds characteristic break points were observed suggesting that these compounds were able to form micelles in water.

Table 1 gives the critical micellar concentration (CMC) values and the corresponding surface tension for each compound.

As it was commonly observed with surface-active molecules [19] including alkyl derivatives of quaternary ammonium compounds [20,21], an increase in the length of the nonpolar alkyl chain reduces the value of the CMC. The γ_{CMC} observed for the **4b–4d** compounds are similar and much lower than that observed for **4a**. Thus, the adsorption of **4b–4d** compounds at the air-water interface was found to be energetically favourable. This suggested that their adsorption onto a hydrophilic/hydrophobic interface like a bacterial membrane would also be energetically favourable.

2.3. Antibacterial activities

We tested the compounds **4a–4d** for their capacity to inhibit the

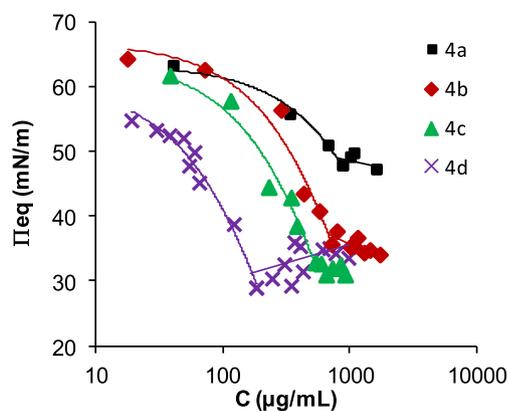


Fig. 1. Change in the equilibrium surface tension (Π_{eq}) as a function of the concentration (C) of **4a–4d** in water. **4a**: *trans*-H-AZOTAI; **4b**: *trans*-Et-AZOTAI; **4c**: *trans*-Bu-AZOTAI; **4d**: *trans*-Hex-AZOTAI.

Table 1
Critical Micelle Concentration (CMC) values in $\mu\text{g/mL}$ and surface tension at the CMC (γ_{CMC}) in mN/m.

| | <i>Trans</i> -H-AZOTAI 4a | <i>Trans</i> -Et-AZOTAI 4b | <i>Trans</i> -Bu-AZOTAI 4c | <i>Trans</i> -Hex-AZOTAI 4d |
|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| CMC ($\mu\text{g/mL}$) | 746 \pm 4 | 682 \pm 7 | 563 \pm 5 | 171 \pm 4 |
| γ_{CMC} (mN/m) | 49.2 \pm 4.6 | 36.7 \pm 6.9 | 32.4 \pm 5.1 | 31.1 \pm 4.1 |

Table 2

Values in $\mu\text{g/mL}$ of the minimum inhibitory concentration triggering at least 50% of growth inhibition (MIC_{50}) and of minimum inhibitory concentration (MIC) for the azobenzene compounds, daptomycin and polymyxin B against *E. coli* and *B. subtilis*.

| | MIC_{50} | Daptomycin | Polymyxin B | 4a | 4b | 4c | 4d |
|--------------------|-------------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>E. coli</i> | – | – | 3.75 | > 30 | > 30 | > 30 | 7.5 |
| <i>B. subtilis</i> | 30 | – | – | > 30 | 7.5 | 2 | 2 |
| MIC | Daptomycin | Polymyxin B | 4a | 4b | 4c | 4d | |
| <i>E. coli</i> | – | < 1 | > 30 | 3.75 | 7.5 | 2 | |
| <i>B. subtilis</i> | 15 | – | > 30 | 7.5 | 2 | 2 | |

bacterial growth on two model bacteria, *E. coli* and *B. subtilis*. Polymyxin B, a commercial antibacterial compound used to target gram-negative outer membrane [22] was used as positive control to evaluate the activity of **4a–4d** against the gram-negative model *E. coli*. Daptomycin, a commercial antibacterial compound that dissipates the cytoplasmic membrane potential of gram-positive bacteria [23] was used as positive control to evaluate the activity of compounds **4a–4d** against *B. subtilis*.

Table 2 shows minimum inhibitory concentration (MIC) and MIC_{50} , the concentration at which 50% of growth inhibition occurred, for the four compounds **4a–4d** and the controls.

Compound *trans*-H-AZOTAI **4a** triggered no inhibition of the two bacteria within the concentration range tested. However, *trans*-Et-AZOTAI **4b** and *trans*-Bu-AZOTAI **4c** showed low MIC_{50} towards *B. subtilis* but no activity against *E. coli*. On the other hand, *trans*-Hex-AZOTAI **4d** showed a very low MIC_{50} against both *E. coli* and *B. subtilis*. In the literature, other quaternary ammonium compounds have shown a high MIC_{50} towards *E. coli*. For example, the MIC_{50} of didecyltrimethylammonium chloride is 16 $\mu\text{g/mL}$ and the MIC_{50} of cetyltrimethylammonium bromide is 256 $\mu\text{g/mL}$ [24]. Thus, in comparison to these other quaternary ammonium compounds, our compounds, *trans*-Et-AZOTAI **4b**, *trans*-Bu-AZOTAI **4c**, and, in particular, *trans*-Hex-AZOTAI **4d** appear to display comparatively low MIC_{50} towards *E. coli*. This result is promising even though MIC results from different studies must be compared with caution due to variations in susceptibility between strains. Moreover against the spores of *B. subtilis*, chlorhexidine digluconate, a quaternary ammonium compound, has been shown to have a MIC_{50} of 1 $\mu\text{g/mL}$ [25], which is in the same concentration range as *trans*-Bu-AZOTAI **4c** and *trans*-Hex-AZOTAI **4d** in our work.

It is evident from our results that an increase in the nonpolar alkyl chain length enhances the biological activities of the Azo compounds, in accordance with other studies on mannosylerythritol [26] or aminoacridine [24]. The compounds **4b–4d** showed better antibacterial activity than the positive control daptomycin against *B. subtilis*. However, compared to polymyxin B, the antibacterial activity of *trans*-Bu-AZOTAI **4c** and *trans*-Hex-AZOTAI **4d** was lower against *E. coli*. This could be explained by the different mechanisms of action of the drugs. It is known that polymyxin B acts on the outer membrane of gram negative bacteria [22] by binding to the lipopolysaccharide, which explains its higher activity on this type of bacteria. For the azobenzene derivatives, we hypothesize that they act on the inner plasma membrane rather than on the outer plasma membrane. In particular, results obtained for the

compound *trans*-Hex-AZOTAI **4d** seemed to be interesting. Admittedly, the obtained MIC and MIC₅₀ values for the latter compound was slightly higher than those of polymyxin B for *E. coli*, but the compound *trans*-Hex-AZOTAI **4d** also displayed a significant activity against *B. subtilis*, even better than daptomycin. Thus, this compound could have the advantage of a broad spectrum antimicrobial activity compared to the positive controls.

2.4. Biophysical investigation of the mechanism

As they showed the best antibacterial activities among the synthesized compounds, the mechanism of only *trans*-Bu-AZOTAI **4c** and *trans*-Hex-AZOTAI **4d** was investigated.

The IMPALA procedure [27] was applied to predict the capacity of insertion of *trans*-Bu-AZOTAI **4c** and *trans*-Hex-AZOTAI **4d** into an implicit model membrane. Briefly, the implicit membrane is described as a continuous medium where the properties vary only along the z-axis perpendicular to the bilayer plane. The membrane properties are represented by energy restraints (Epho and Elip, see Experimental section). The *trans*-Bu-AZOTAI **4c** or *trans*-Hex-AZOTAI **4d** molecule was systematically moved along the z axis from one side of the membrane to the other and the total restraint (Epho + Elip) was calculated for each position. A profile of the energy restraints as a function of the mass centre penetration into the implicit bilayer was then obtained (Fig. 2). For both molecules, the total restraint energy was much higher outside the bilayer than inside, suggesting that the insertion of both molecules within the membrane was energetically favourable. No sharp minimum was observed between -18 and 18 Å indicating that the molecules are probably able to move within the bilayer.

Experimentally, we analysed the permeabilizing effect of azobenzene compounds on experimental membrane models. Large unilamellar vesicles (LUVs) were formed with a lipid composition mimicking the plasma membrane of the two bacteria, *E. coli* and *B. subtilis* [28,29]. The permeabilization of the model membranes was quantified by measuring the increase in the fluorescence emission of calcein, resulting from the azo-compound induced release of the dye from the internal compartment of the vesicle, where it exists in a self-quenched state, into the external environment following interaction between the Azo compounds and the membrane.

As shown in Fig. 3, *trans*-Hex-AZOTAI **4d** has a significantly higher permeabilizing effect than *trans*-Bu-AZOTAI **4c**. Thus, longer chain length increased the destabilizing effect of the azobenzene derivatives,

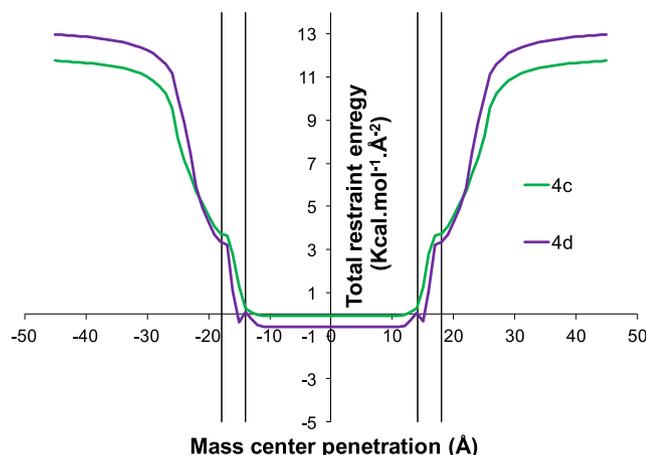


Fig. 2. Change in the total restraint energy as a function of the molecule mass centre penetration in an implicit bilayer obtained by IMPALA procedure. The vertical lines correspond (from left to right) to the interface between the bilayer and the aqueous phase ($z = 18$ Å), the interface between the hydrocarbon core and the lipid hydrophilic head ($z = 13.5$ Å), and the centre of the bilayer ($z = 0$ Å). **4c**: *trans*-Bu-AZOTAI; **4d**: *trans*-Hex-AZOTAI.

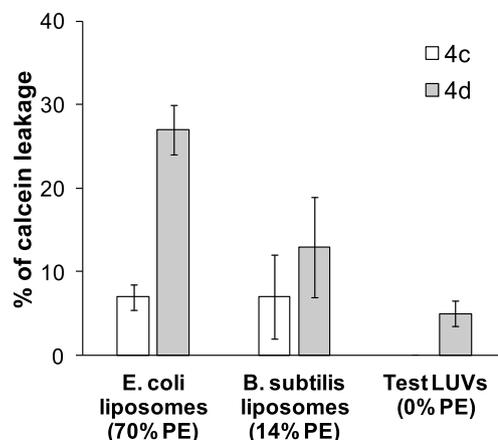


Fig. 3. Calcein leakage from LUVs containing phosphatidylethanolamine (PE) and mimicking *E. coli* (*E. coli*-like) or *B. subtilis* (*B. subtilis*-like) or lacking PE (Test-LUVs) in the presence of Azo compounds, **4c** (*trans*-Bu-AZOTAI) or **4d** (*trans*-Hex-AZOTAI). The $C_{\text{azobenzene}}/C_{\text{lipids}}$ ratio was 0.25. The ordinate shows the amount of calcein released after 15 min in the presence of the azobenzene derivative as a percentage of the total amount released by Triton X-100. At least two independent experiments were performed. The percentage of calcein leakage from Test-LUVs in the presence of **4c** was zero.

which can be correlated with the CMC values (Table 1) and the antibacterial activity (Table 2). Nevertheless, a total release of calcein was not observed even at higher *trans*-Hex-AZOTAI **4d** concentrations suggesting that the mechanism of destabilization is related to a gradual release of the dye by all the vesicles following the annealing process that prevents further leakage [30] as already observed with D-xylose-based bolaamphiphiles [31].

Another important observation was the dependence between the calcein leakage and the percentage of phosphatidylethanolamine (PE) in the lipid composition of LUVs, from 70% to 0% PE. A higher PE content leads to an increase in the extent of permeabilization. This observation suggested that azobenzene derivatives have a specific interaction with PE.

To further analyse the specific interaction between the molecules *trans*-Bu-AZOTAI **4c** or *trans*-Hex-AZOTAI **4d** and the individual lipids composing the model membranes, adsorption experiments into a pure lipid monolayer composed of phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) or cardiolipin (CL) were performed using the Langmuir monolayer technique.

The adsorption was monitored by the increase of the surface pressure at a constant trough area for different initial surface pressures of the lipid monolayer in order to plot the maximal surface pressure variation ($\Delta\Pi$) versus the initial surface pressure (Π_i) (see an example with PE monolayer in supplementary information).

From these curves, two different parameters can be determined (Fig. 4): the maximal insertion pressure (MIP) which reflects the penetration power of the molecule into a lipid monolayer, and the differential Π_0 ($d\Pi_0$) which indicates the (non-)attracting effect of the lipid towards the molecule.

All the MIP values were higher than 30–35 mN/m, the lateral pressure within biological membranes [32], suggesting that both azobenzene derivatives can insert into natural plasma membranes. The positive values of $d\Pi_0$ values confirm the affinity of the azobenzene derivatives for the individual lipid monolayers. This effect was higher for **4d** than **4c**, and in the case of **4d** the affinity was significantly higher towards PE monolayer than PG or CL monolayer.

Data from Langmuir monolayer experiments and calcein leakage assay strongly suggest that PE plays a key role in the interaction between azobenzene, and the membranes, especially for **4d**.

In parallel to the experimental approach, an *in silico* approach called Hypermatrix was used to study the lipid specificity and to obtain an

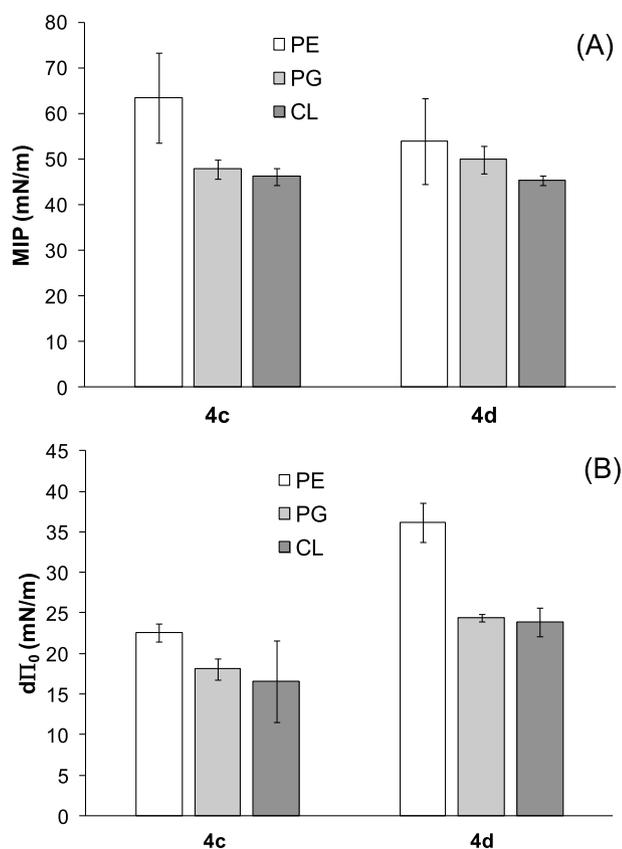


Fig. 4. Adsorption of azobenzene derivatives **4c** (*trans*-Bu-AZOTAI) or **4d** (*trans*-Hex-AZOTAI) into lipid monolayers: PE: phosphatidylethanolamine, PG: phosphatidylglycerol, CL: cardiolipin. (A) Maximal insertion pressure (MIP) and (B) differential Π_0 ($d\Pi_0$) values. These parameters are described in the Material and Methods section.

atomistic description of the interaction between azobenzene derivatives and the lipids.

For all the lipids, the interaction energy was negative, confirming a favourable interaction between the azobenzene derivatives and the lipids mimicking the plasma membranes of bacteria (Fig. 5). The energy of interaction is significantly lower for *trans*-Hex-AZOTAI **4d** in presence of PE, confirming once again the specificity of this lipid for the compound.

The visualization of the molecular assemblies of each lipid with both azobenzene derivatives (Fig. 6) clearly showed a distinct positioning of *trans*-Hex-AZOTAI **4d** towards PE, compared to that seen with other lipids towards PE and that between *trans*-Bu-AZOTAI **4c** with

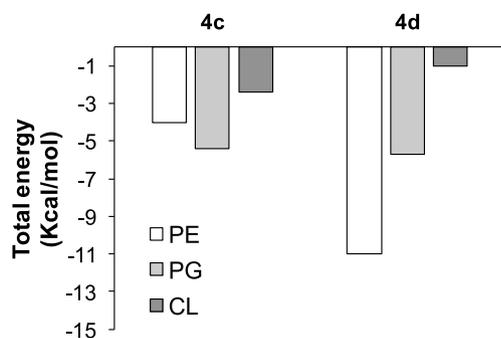


Fig. 5. Total energy of interaction of **4c** (*trans*-Bu-AZOTAI) or **4d** (*trans*-Hex-AZOTAI) with PE (phosphatidylethanolamine), PG (phosphatidylglycerol), and CL (cardiolipin) in a multimolecular monolayer assembly, calculated by Hypermatrix docking method.

all the lipids. The hydrophilic/hydrophobic repartition of **4d** perfectly matched with that of PE (Fig. 6D), i.e. the Azo group was facing the C=O group of PE while this is not the case for the other systems. This preferential positioning led to reduced distances between **4d** and PE as shown in Table 3.

3. General discussion

Antibacterial experiments showed that *trans*-Hex-AZOTAI **4d**, with six carbon atoms in the alkyl chain, exhibited a relatively high antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria and that *trans*-Bu-AZOTAI **4c**, with four carbon atoms in the alkyl chain, also showed significant antibacterial activity against a gram-positive bacterium. We also showed that **4c** and **4d** can insert into a lipid membrane. This can lead to the destabilization of bacterial membrane, as observed with permeability assays. Although compounds **4c** and **4d** showed an energetically favourable interaction with all the tested lipids, interactions with PE was the most favourable, especially for *trans*-Hex-AZOTAI **4d**. It suggests that the inner plasma membrane of the bacteria can be the target of our compounds.

Although the calcein leakage experiments showed a clear dependence between the destabilization effect of *trans*-Hex-AZOTAI **4d** compounds and the PE content, we cannot implicate only PE as the lipid involved in the process of permeabilization of the bacterial membrane by the azobenzene molecules. Indeed, a higher MIC₅₀ value of *trans*-Hex-AZOTAI **4d** compound was observed for *E. coli*, which displays the higher PE content in its plasma membrane composition compared to *B. subtilis* plasma membrane. A possible explanation for this phenomenon can be the presence of an outer membrane in the gram-negative bacteria. The latter is composed of lipopolysaccharides that could partially prevent the azobenzene molecule from reaching the inner plasma membrane and lower antibacterial activity of our compounds on the gram-negative strain compared to the gram-positive bacteria.

4. Conclusion

We synthesized four amphiphilic cationic azobenzenes differing in their alkyl chain length and evaluated their antibacterial activities against a gram-negative and a gram-positive bacterium. Among them, *trans*-Hex-AZOTAI **4d**, with six carbon atoms in the alkyl chain, displayed a high activity against the two bacterial models, whereas *trans*-Bu-AZOTAI **4c**, with four carbon atoms in the alkyl chain, displayed high activity against only the gram-positive bacterium *B. subtilis*. We investigated the membrane interaction of both molecules by experimental and *in-silico* biophysical approaches. Results suggest that the biological activity of **4c** and **4d** could be linked to their interaction with the bacterial membrane favoured by the presence of PE.

5. Experimental section

5.1. Synthesis

All commercially available products and solvents were used without further purification. Reactions were monitored by TLC (Kieselgel 60F254 aluminium sheet). Column chromatography was performed on silica gel 40–60 μ m. Flash column chromatography was performed on an automatic apparatus, using silica gel cartridges. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a 400 MHz/54 mm ultralong hold. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) and are referenced to TMS as an internal standard.

5.1.1. Synthesis of a 1a–1d

Syntheses following procedure in literature [3]. Analysis are consistent with the literature. **1a** [33] 3.31 g, 18% yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.88 (4H, m); 7.48 (3H, m); 6.95 (2H, d, *J* = 8.6 Hz). ¹³C: δ 158.4; 152.8; 147.3; 130.6; 129.2; 125.2; 122.7;

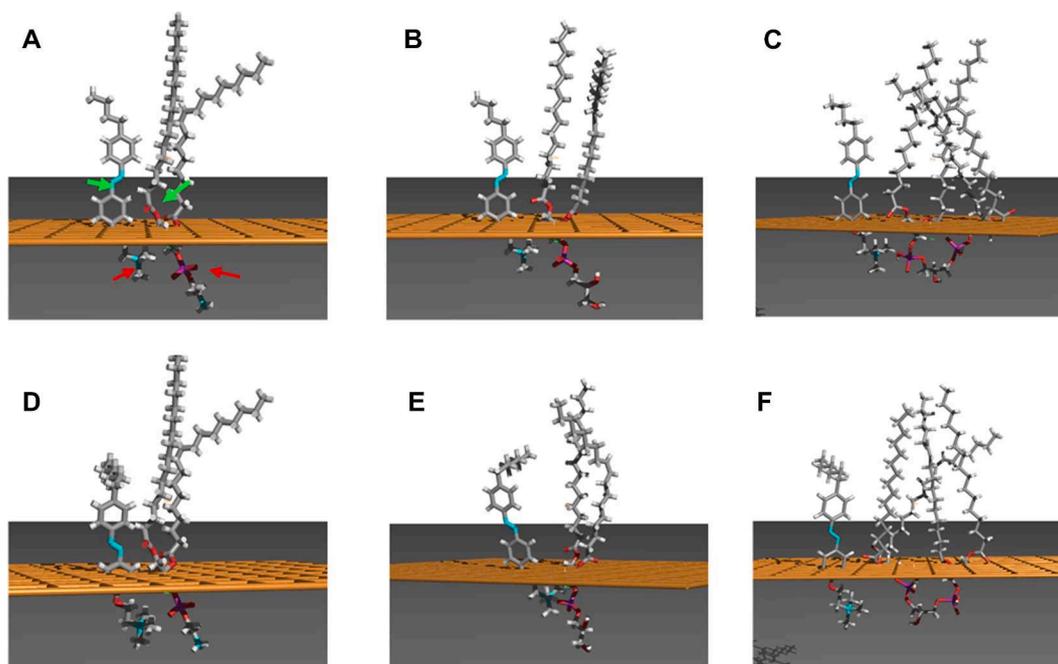


Fig. 6. Interaction between *trans*-Bu-AZOTAI **4c** (A, B, C-upper panel) or *trans*-Hex-AZOTAI **4d** (D, E, F-lower panel) and PE (phosphatidylethanolamine) (A and D), PG (phosphatidylglycerol) (B and E) and CL (cardiolipin) (C and F) calculated using the hypermatrix docking method. The orange plane represents the hydrophobic (above the plane)/hydrophilic (below the plane) interface. The green arrows in Fig. 6A point to the atoms taken as references for the N–O distance calculations and the red arrows, to the atoms taken as references for the N–P distance.

Table 3

Distance (in Å) between the N atom from the amine group of the Azo molecules and the phosphorus atom from the phospholipid considered (first column) and between the N atom from the azo group (Azo molecules) and the oxygen of the closest carbonyl group from the phospholipid considered (second column). PE: phosphatidylethanolamine, PG: phosphatidylglycerol and CL: cardiolipin.

| | Distance N–P (Å) | Distance N–O (Å) |
|---------------|------------------|------------------|
| 4c -PE | 5.1 | 6.1 |
| 4d -PE | 4.7 | 2.9 |
| 4c -PG | 5.1 | 4.6 |
| 4d -PG | 4.8 | 11.3 |
| 4c -CL | 4.8 | 6.2 |
| 4d -CL | 9.1 | 9.2 |

115.9 **1b** [34] 17.07 g, 75% yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.86 (2H, d, $J = 7.4$ Hz); 7.81 (2H, d, $J = 8.1$ Hz); 7.32 (2H, d, $J = 8.1$ Hz); 6.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz); 2.72 (2H, q, $J = 7.6$ Hz); 1.28 (3H, t, $J = 7.6$ Hz) ^{13}C : δ 158.3; 150.9; 147.4; 147.2; 126.7 ($\times 2$); 125 ($\times 2$); 122.8 ($\times 2$); 116 ($\times 2$); 28.9; 15.6 **1c** [35] 16.71 g, 79% yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.85 (2H, d, $J = 8.8$ Hz); 7.79 (2H, d, $J = 8.3$ Hz); 7.30 (2H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.92 (2H, d, $J = 8.8$ Hz); 2.68 (2H, t, $J = 7.7$ Hz); 1.75 (1H, s); 1.64 (2H, q, $J = 7.6$ Hz); 1.37 (2H, m); 0.94 (3H, t, $J = 7.3$ Hz) ^{13}C : δ 158.0; 150.8; 147.1; 145.9; 129.0 ($\times 2$); 124.7 ($\times 2$); 122.5 ($\times 2$); 115.7 ($\times 2$); 35.5; 33.4; 22.3; 13.9 **1d** [18] 14.82 g, 51% yield ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.86 (2H, d, $J = 8.6$ Hz); 7.8 (2H, d, $J = 8.1$ Hz); 7.3 (2H, d, $J = 8.6$ Hz); 6.94 (2H, m); 2.67 (2H, t, $J = 7.6$ Hz); 1.65 (2H, m); 1.32 (6H, m); 0.89 (3H, t, $J = 7.3$ Hz) ^{13}C : δ 158.3; 150.3; 147.2; 146.2; 129.2 ($\times 2$); 125 ($\times 2$); 122.7 ($\times 2$); 115.9 ($\times 2$); 36; 31.9; 31.4; 29.1; 22.7; 14.2.

5.1.2. Synthesis of a **2a–2d**

To a solution of 4-alkyl-4'-hydroxyazobenzene (**1a–1d**, 19.7 mmol) in butan-1-ol (15 mL) K_2CO_3 (2.72 g, 19.7 mmol) and KI (116 mg, 0.7 mmol) were dissolved. Then, 2-chloroethanol (2.8 mL, 39.4 mmol) was added dropwise and the mixture was refluxed for 24 h. After filtration under vacuum, the solvent was evaporated. The residue was

purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 7:3) to obtain compounds **2a–2d**. **2a** [36] (orange solid, 2.21 g, 79% yield) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.91 (4H, dd, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 12.7$ Hz); 7.48 (3H, m); 7.01 (2H, d, $J = 8.9$ Hz); 4.14 (m, 2H); 3.99 (m, 2H). ^{13}C : δ 161.1; 152.8; 147.3; 130.3; 129.1 ($\times 2$); 124.9 ($\times 2$); 122.7 ($\times 2$); 114.9 ($\times 2$); 69.6; 61.3. **2b** (orange solid, 3.58 g, 67% yield) mp = 126 °C, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.83 (2H, d, $J = 9.2$ Hz); 7.74 (2H, d, $J = 8.4$ Hz); 7.21 (2H, d, $J = 8.4$ Hz); 6.95 (2H, d, $J = 8.8$ Hz); 4.10 (m, 2H); 3.93 (m, 2H); 2.65 (q, 2H, $J = 7.6$ Hz); 1.21 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz). ^{13}C : δ 160.9; 151.1; 147.5; 147.4; 128.6 ($\times 2$); 124.7 ($\times 2$); 122.8 ($\times 2$); 114.9 ($\times 2$); 69.6; 61.5; 29.0; 15.6. FTIR: 3334 cm^{-1} (w), 2931 cm^{-1} (w), 1597 cm^{-1} (s), 1500 cm^{-1} (s), 1252 cm^{-1} (s), 1079 cm^{-1} (s), 1045 cm^{-1} (s), 848 cm^{-1} (s), 841 cm^{-1} (w) HRMS (ESI+) m/z calculated for $[(\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2)\text{H}]^+$ 368.2696.1227 found 368.2709 **2c** [37] (orange solid, 1.98 g, 34% yield) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.88 (2H, d, $J = 9.0$ Hz); 7.81 (2H, d, $J = 8.4$ Hz); 7.31 (2H, d, $J = 8.5$ Hz); 7.03 (2H, d, $J = 9.0$ Hz); 4.17 (2H, t, $J = 4.5$ Hz); 4.01 (2H, m); 2.68 (2H, t, $J = 7.7$ Hz); 1.64 (2H, m); 1.38 (2H, sex, $J = 7.4$ Hz); 0.95 (3H, t, $J = 7.3$ Hz) ^{13}C : δ 158.0; 150.8; 147.1; 145.9; 129.0 ($\times 2$); 124.7 ($\times 2$); 122.5 ($\times 2$); 115.7 ($\times 2$); 35.5; 33.4; 22.3; 13.9 **2d** [37] (orange solid, 2.61 g, 40% yield) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.90 (2H, d, $J = 8.4$ Hz); 7.80 (2H, d, $J = 7.8$ Hz); 7.30 (2H, d, $J = 7.7$ Hz); 7.03 (2H, d, $J = 8.4$ Hz); 4.16 (2H, m); 4.01 (2H, m); 2.67 (2H, t, $J = 7.6$ Hz); 1.65 (2H, m); 1.31 (6H, m); 0.89 (3H, m) ^{13}C : δ 160.9; 151.1; 147.5; 146.2; 129.2 ($\times 2$); 124.7 ($\times 2$); 122.7 ($\times 2$); 114.9 ($\times 2$); 69.6; 61.5; 36.0; 31.4; 29.1; 22.7; 19.1; 14.2

5.1.3. Synthesis of a **3a–3d**

To a solution of **2a–2d** (4 mmol) dichloromethane (25 mL), trimethylamine (1 mL, 6.2 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (15 mg, 2 mol%) were added. Tosyl chloride (1.2 g, 6.2 mmol) was added slowly to the mixture at 0 °C. The mixture was then stirred at ambient temperature for 24 h. The residue was extracted with a saturated solution of NH_4Cl (2×20 mL), then with a saturated solution of NaHCO_3 (2×20 mL) and then with H_2O (2×20 mL). These compounds were used without any purification in the next step.

5.1.4. Synthesis of a 4a–4d

Compounds **3a–3d** was dissolved in a H₂O/acetone mixture (2:1). To this, a solution of dimethylamine (1.4 mL, 8.2 mmol, 40%wt in water) was added. The mixture was refluxed for 24 h. The acetone was then evaporated, and mixture was extracted with EtOAc (3x40mL). The collected organic phase was washed with a saturated solution of K₂CO₃ (2x40mL) and by H₂O (2x40mL). The organic layer was dried with MgSO₄. After evaporation, the residue was dissolved in 150 mL of diethyl ether. Then, methyl iodide (1 mL, 16 mmol) was added. The mixture was stirred at ambient temperature for 24 h. The product was then filtered under vacuum.

Trans-H-AZOTAI **4a** [38] orange solid, 164 mg, 10% yield. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.95 (2H, d, *J* = 8.2 Hz); 7.86 (2H, d, *J* = 7.3 Hz); 7.58 (2H, d, *J* = 6.9 Hz); 7.22 (2H, d, *J* = 8.5 Hz); 4.59 (2H, s); 3.83 (2H, s); 3.2 (9H, s). ¹³C: δ 160.1; 151.9; 146.6; 143.4; 129.4 (×2); 124.6 (×2); 122.3 (×2); 115.4 (×2); 64; 62.1; 53.1 (×3).

Trans-Et-AZOTAI **4b** [39] orange solid, 439 mg, 25% yield. ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.92 (2H, d, *J* = 8.8 Hz); 7.80 (2H, d, *J* = 8.1 Hz); 7.36 (2H, d, *J* = 8.1 Hz); 7.12 (2H, d, *J* = 8.8 Hz); 4.6 (2H, s); 3.93 (2H, s); 3.26 (9H, s); 2.72 (2H, q, *J* = 7.2 Hz); 1.27 (3H, t, *J* = 7.6 Hz). ¹³C: δ 161.1; 149.1; 149.0; 129.5 (×2); 125.6 (×2); 124.1 (×2); 115.8 (×2); 66.5; 63.5; 54.9 (×3); 38.4; 29.8; 16.0.

Trans-Bu-AZOTAI **4c** [40] orange solid, 1.83 g, 98% yield. ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.92 (2H, d, *J* = 9.0 Hz); 7.79 (2H, d, *J* = 8.3 Hz); 7.33 (2H, d, *J* = 8.3 Hz); 7.18 (2H, d, *J* = 9.0 Hz); 4.60 (2H, s); 3.92 (2H, s); 3.31 (9H, s); 2.69 (2H, t, *J* = 7.7 Hz); 1.64 (2H, m); 1.39 (2H, m); 0.95 (3H, t, *J* = 7.4 Hz). ¹³C: δ 161.1; 152.2; 149.0; 147.6; 130.3 (2×); 125.7 (2×); 123.7 (2×); 116.2 (2×); 66.5; 63.5; 3 × 54.9; 36.5; 34.8; 23.4; 14.3.

Trans-Hex-AZOTAI **4d** orange solid, 495 mg, 25% yield. mp = 196 °C ¹H NMR (400 MHz, MeOD) 7.92 (2H, d, *J* = 8.7 Hz); 7.79 (2H, d, *J* = 8.0 Hz); 7.34 (2H, d, *J* = 8.0 Hz); 7.18 (2H, d, *J* = 8.7 Hz); 4.6 (2H, s); 3.92 (2H, s); 3.31 (9H, s); 2.70 (2H, t, *J* = 7.6 Hz); 1.66 (2H, m); 1.34 (6H, m); 0.90 (3H, m). ¹³C: δ 161.1; 152.3; 149.1; 147.1; 130.2 (×2); 125.7 (×2); 123.7 (×2); 116.2 (×2); 66.5; 63.5; 49 (×3); 36.8; 32.9; 32.6; 30.0; 23.7; 14.4. FTIR: 2928 cm⁻¹ (w), 1737 cm⁻¹ (w), 1600 cm⁻¹ (w), 1500 cm⁻¹ (w), 1243 cm⁻¹ (s), 1155 cm⁻¹ (w), 1059 cm⁻¹ (w), 953 cm⁻¹ (s), 843 cm⁻¹ (s) HRMS (ESI+) *m/z* calculated for [(C₄₆H₃₈I₂N₆O₂)H]⁺ 863.4443.1227 found 863.4522.

5.2. Surface tension measurements at air-water interface

Adsorption at the air-water interface was analysed at room temperature with an automated Langmuir Balance system equipped with a wire probe (MicroTrough X, Kibron Helsinki, 15.9 cm²). Compounds **4a–4d** were solubilised in DMSO and dispersed (20 μL) into the subphase (MilliQ water) to a range of final concentrations (C from 15 μg/mL to 1750 μg/mL). The subphase was stirred, during the whole experimentation. The surface pressure was recorded until its value reached the equilibrium (Π_{eq}). CMC was determined from the plot Π_{eq} = f (C) at the intersection between the linear regression of the ascendant and plateau parts.

5.3. In vitro antibacterial activity

5.3.1. Bacterial strains

E. coli strain ATCC 25922 and *B. subtilis* strain ATCC 6051 were used. Both bacteria were grown on solid trypticase-soy-agar medium on Petri dish. Bacteria were reserved at 4 °C and replicated at least every week.

5.3.2. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs)

Assays were carried out in 96-well clear flat-bottom plates in triplicates using a method based on CLSI broth microdilution method [41]. Briefly, 100 μL of bacterial suspension from a culture inoculated with a 24 h aged colony on TSA and grown overnight at 30 °C in a

mineral medium (KCl 0.250 g/L, NaH₂PO₄ 1.544 g/L, Na₂HPO₄·2H₂O 0.008 g/L, MgSO₄ 0.244 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L, MgCl₂ 0.05 g/L; pH = 5,) was added to each well. A 2 μL aliquot of the solution of test compound in 1–2% DMSO was added and the volume was made up to 200 μL with mineral medium. A source of glucose was added to the mineral medium to maintain a final glucose concentration of 10 g/L. Mother solutions of compounds were replaced by the DMSO based solvent without compound in controls. Bacterial growth was monitored by measuring absorbance at 600 nm every 15 min over 24 h. The growth inhibition of the bacteria in the test wells was calculated using the following equation:

$$\%Inhibition = \left(1 - \frac{OD_{var\ test}}{OD_{var\ control}} \right) \times 100$$

where OD_{var test} is the difference of optical density between the highest point and the lowest point of the growth curve of the bacterium for a test. OD_{var control} is the difference of optical density between the highest point and the lowest point of the growth curve of the bacterium in the control without antimicrobial compound. A range of concentrations was tested for each single compound (30 μg/mL, 15 μg/mL, 7.5 μg/mL, 3.75 μg/mL, 2 μg/mL, 1 μg/mL). The weaker tested concentration triggering at least 50% of growth inhibition was defined as MIC₅₀.

5.4. Interaction to bacterial membrane models

5.4.1. Leakage experiments

The leakage of entrapped self-quenched calcein from LUVs induced by a permeabilizing agent can be monitored by the increase of fluorescence caused by its dequenching further to dilution [42]. LUVs of *E. coli*-like, *B. subtilis*-like, and Test-LUVs were prepared in a saline-Tris-HCl buffer (150 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7.5) with a self-quenching concentration of calcein (10 mM). *E. coli*-like LUVs were composed of 70% of phosphatidylethanolamine (PE), 25% of phosphatidylglycerol (PG), and 5% of cardiolipin (CL). *B. subtilis*-like LUVs were composed of 14% PE, 81% PG, and 5% CL. The last type of LUVs were PE-free LUVs that were composed of 95% PG and 5% CL. For all LUVs, the un-encapsulated dye was removed on a gel column of Sephadex G75. The purified calcein-filled LUVs were put in contact with either a 0.5% solution of Triton-X as a “maximal” permeabilizing agent, with DMSO as a “minimal” permeabilizing, and with a solution of *trans*-Bu-AZOTAI **4c** and *trans*-Hex-AZOTAI **4d** at *C*_{azobenzene}/*C*_{lipids} molar ratio of 0.25 dissolved in DMSO. The total concentration of lipids was between 9 μM and 16 μM. The excitation and emission wavelengths were 472 and 512 nm, respectively, and the fluorescence was measured over a period of 900 sec. The percentage of released calcein (% leakage) was calculated using the formula:

$$\%Leakage = \left| \frac{F_{exp} - F_{DMSO}}{F_{Triton} - F_{DMSO}} \right| \times 100$$

where F_{exp} is the fluorescence signal for a given concentration of azobenzene, F_{DMSO} is the fluorescence signal for LUVs with DMSO, and F_{Triton} is the fluorescence signal of LUVs incubated with 0.5% Triton X-100. The azobenzene solution concentrations used during the *in vitro* techniques were optimized so that measurements would fall between the lower limit of measurement and the limit of saturation. Two independent repetitions were performed.

5.4.2. Adsorption experiments into a lipid monolayer

Adsorption experiments were performed in a KSV Minitrough (Helsinki, Finland, 7.5 × 20 cm²). The subphase was milliQ water (~80 mL) with a constant temperature at 22.0 ± 1.0 °C. The subphase was continuously stirred with a magnetic stirrer. Pure PE, pure PG or pure CL molecules in chloroform/methanol (2/1 v/v) solvent, was spread at the air-water interface to reach the desired initial surface pressure. After 20 min of waiting for solvent evaporation and film

stabilization, *trans*-Bu-AZOTAI **4c** or *trans*-Hex-AZOTAI **4d** in DMSO solution was injected underneath the preformed lipid monolayer. The final subphase concentration was 10 μM for both **4c** and **4d**. Their adsorption to the lipid monolayers was followed by the increase in surface pressure. As a control experiment, the same volume of pure DMSO was injected underneath the lipid monolayer, and no change in the surface pressure was observed. Maximal insertion pressure (MIP) corresponds to the surface pressure beyond which no adsorption occurs. It was obtained by linear regression of the plot $\Delta\Pi$ vs Π at the intersection with the x axis. The “differential Π_0 ($d\Pi_0$)” corresponds to the difference between $\Delta\Pi_0$ which is the y-intercept of the linear regression of the $\Delta\Pi$ vs Π plot, and Π_e which is the surface pressure increase at the equilibrium obtained in an independent experiment performed at the same **4c** or **4d** concentration but without lipids spread at the interface.

While a positive $d\Pi_0$ indicates affinity of the compound for the tested lipid monolayer, a negative value of $d\Pi_0$ points to an unfavourable impact of lipid on the molecule insertion. The uncertainties in MIP and the $\Delta\Pi_0$ were calculated as described previously [41].

5.4.3. Simulation of azobenzene-model membrane interaction

The interactions of **4c** or **4d** with model membranes were analysed by molecular modelling. The 3D structures of **4c**, **4d**, PE, PG, and CL were constructed using HyperChem software (Hypercube, Inc.). The molecular geometry was optimized with the steepest-descent method using the MM + force field, and a systematic analysis of the torsion angles using the structure tree method was performed as described previously [43]. The most probable structure corresponding to the lowest conformational energy was used for further calculations.

The insertion of the molecule within an implicit bilayer was computed by the IMPALA procedure as described in Ducarme et al. [27] and the interaction energies in a lipid monolayer (PE, PG or CL) were calculated using the simple docking method called Hypermatrix.

Briefly, the IMPALA method is based on a Monte Carlo approach using an implicit description of membrane. The latter is modelled with an implicit membrane and described as a continuous medium whose properties vary along the axis perpendicular to the bilayer plane (z axis). The forcefield was parameterized to mimic a membrane in aqueous environment by considering (1) the hydrophobic effect between the membrane and a solute (Epho) and (2) the perturbation effect of the solute on the lipid acyl chain organization (Elip). The two restraints were calculated and summed at each position of the Azo molecule into the implicit membrane; the molecule was systematically moved along the z axis by 1 Å steps, from one side of the membrane to the other. A profile of the total energy restraint (Epho + Elip) as a function of the mass centre penetration into the implicit bilayer was then obtained.

The Hypermatrix method is described in detail elsewhere [43]. Briefly, the synthetic Azo molecule was put in a fixed position at the centre of the system and oriented at the hydrophobic/ hydrophilic interface, while the lipid molecule, also oriented at the lipid/water interface, was positioned around the molecule by rotations and translations (more than 10 million positions were tested). For each position, an energy value was calculated, according to a home-designed force field [43]. The energy values together with the coordinates of all assemblies were stored in a matrix and classified, according to decreasing values. The first stable match was considered as the best assembly between the two molecules.

Declarations of Competing Interest

The authors declare to have no competing interest.

Acknowledgements

This work was financed by ‘Wallonie-Bruxelles International’, ‘Fonds National de la Recherche Scientifique pour la communauté française de Belgique’, ‘Ministère des Affaires Étrangères et du

Développement International (MAEDI)’, ‘Ambassade de France en Belgique pour la France’, A.F thanks the ‘Ministère de l’Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie’ for his research fellowship.M.D. and L.L. thank the F.R.S.-F.N.R.S. for their position as Senior Research Associate.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103399>.

References

- [1] WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed Oct 23, 2018).
- [2] V. Defraigne, M. Fauvar, J. Michiels, Fighting bacterial persistence: current and emerging anti-persister strategies and therapeutics, *Drug Resist. Updat.* 38 (2018) 12–26, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.03.002>.
- [3] N. Drillaud, E. Banaszak-Léonard, I. Pezron, C. Len, Synthesis and evaluation of a photochromic surfactant for organic reactions in aqueous media, *J. Org. Chem.* 77 (21) (2012) 9553–9561, <https://doi.org/10.1021/jo301466w>.
- [4] M. Billamboz, F. Mangin, N. Drillaud, C. Chevrin-Villette, E. Banaszak-Léonard, C. Len, Micellar catalysis using a photochromic surfactant: application to the Pd-catalyzed Tsuji-Trost reaction in water, *J. Org. Chem.* 79 (2) (2014) 493–500, <https://doi.org/10.1021/jo401737t>.
- [5] T.J. Sorensen, K. Kjaer, D.W. Breiby, B.W. Laursen, Synthesis of novel amphiphilic azobenzenes and X-ray scattering studies of their langmuir monolayers, *Langmuir* 24 (2008) 3223–3227.
- [6] E. Léonard, F. Mangin, C. Villette, M. Billamboz, C. Len, Azobenzenes and catalysis, *Catal. Sci. Technol.* 6 (2) (2016) 379–398, <https://doi.org/10.1039/C4CY01597E>.
- [7] R. Rajaganes, A. Gopal, T. Mohan Das, A. Ajayaghosh, Synthesis and properties of amphiphilic photoresponsive gelators for aromatic solvents, *Org. Lett.* 14 (3) (2012) 748–751, <https://doi.org/10.1021/ol203294v>.
- [8] G. Galli, E. Chiellini, Azobenzene containing polymers: what is yet viable with aged liquid crystals, *Liq. Cryst.* 33 (2006) 1297–1301.
- [9] S.S. Subala, B.S. Sundar, S.S. Sastry, Synthesis and characterization of nonsymmetric liquid crystal dimer containing biphenyl and azobenzene moiety, *J. Chem.* 2013 (2013) e939406, <https://doi.org/10.1155/2013/939406>.
- [10] J. Salta, R.I. Benhamou, I.M. Herzog, M. Fridman, Tuning the effects of bacterial membrane permeability through photo-isomerization of antimicrobial cationic amphiphiles, *Chem. – Eur. J.* 23 (52) (2017) 12724–12728, <https://doi.org/10.1002/chem.201703010>.
- [11] S.M. Tawfik, H.H. Hefni, Synthesis and antimicrobial activity of polysaccharide alginate derived cationic surfactant-metal(II) complexes, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 562–572, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.043>.
- [12] J.G. Lundin, P.N. Coneski, P.A. Fulmer, J.H. Wynne, Relationship between surface concentration of amphiphilic quaternary ammonium biocides in electrospun polymer fibers and biocidal activity, *React. Funct. Polym.* 77 (2014) 39–46, <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.02.004> (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.).
- [13] R. Kügler, O. Bouloussa, F. Rondelez, Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces, *Microbiology* 151 (5) (2005) 1341–1348.
- [14] A.A. Neyfakh, V.E. Bidnenko, L.B. Chen, Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (11) (1991) 4781–4785.
- [15] F. Alhashash, V. Weston, M. Diggie, A. McNally, Multidrug-resistant *Escherichia coli* bacteremia, *Emerg. Infect. Dis.* 19 (10) (2013), <https://doi.org/10.3201/eid1910.130309>.
- [16] J. Pérez-Miqueo, A. Altube, E. García-Lecina, A. Tron, N.D. McClenaghan, Z. Freixa, Photoswitchable azobenzene-appended iridium(III) complexes, *Dalton Trans.* 45 (35) (2016) 13726–13741, <https://doi.org/10.1039/C6DT01817C>.
- [17] K.-Z. Fan, M. Bradley, B. Vincent, C.F.J. Faul, Effect of chain length on the interaction between modified organic salts containing hydrocarbon chains and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgel particles, *Langmuir* 27 (2011) 4362–4370, <https://doi.org/10.1021/ja104411j> (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.).
- [18] C. Blayo, J.E. Houston, S.M. King, R.C. Evans, Unlocking structure-self-assembly relationships in cationic azobenzene photosurfactants, *Langmuir* 34 (2018) 10123–10134, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02109> (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.).
- [19] N.K. Sharma, M. Singh, A. Bhattarai, Hydrophobic study of increasing alkyl chain length of platinum surfactant complexes: synthesis, characterization, micellization, thermodynamics, thermogravimetrics and surface morphology, *RSC Adv.* 6 (93) (2016) 90607–90623, <https://doi.org/10.1039/C6RA20330B>.
- [20] J. Oremusová, Micellization of alkyl trimethyl ammonium bromides in aqueous solutions-Part 1: Critical micelle concentration (CMC) and ionization degree, *Tenside Surfactants Deterg.* 49 (3) (2012) 231–240, <https://doi.org/10.3139/113.110187>.
- [21] A. Petek, M. Krajnc, A. Petek, The role of intermolecular interactions in the micellization process of alkyltrimethyl ammonium bromides in water, *Tenside*

- Surfactants Deterg. 53 (1) (2016) 56–63, <https://doi.org/10.3139/113.110410>.
- [22] L. Poirer, A. Jayol, P. Nordmann, Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes, *Clin. Microbiol. Rev.* 30 (2) (2017) 557–596, <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
- [23] J.A. Silverman, N.G. Perlmutter, H.M. Shapiro, Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in staphylococcus aureus, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (8) (2003) 2538–2544, <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2538-2544.2003>.
- [24] L. Guo, M. Long, Y. Huang, G. Wu, W. Deng, X. Yang, B. Li, Y. Meng, L. Cheng, L. Fan, et al., Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas, *J. Appl. Microbiol.* 119 (1) (2015) 55–64, <https://doi.org/10.1111/jam.12820>.
- [25] A. Buxbaum, Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide akacid plus (R), *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (1) (2006) 193–197, <https://doi.org/10.1093/jac/dkl206>.
- [26] J. Nashida, N. Nishi, Y. Takahashi, C. Hayashi, M. Igarashi, D. Takahashi, K. Toshima, Systematic and stereoselective total synthesis of mannosylerythritol lipids and evaluation of their antibacterial activity, *J. Org. Chem.* 83 (13) (2018) 7281–7289, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00032>.
- [27] Ph. Ducarme, M. Rahman, R. Brasseur, IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 30 (4) (1998) 357–371, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980301\)30:4<357::AID-PROT3>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980301)30:4<357::AID-PROT3>3.0.CO;2-G).
- [28] R.M. Epand, R.F. Epand, Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* 1788 (1) (2009) 289–294, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.023>.
- [29] R.F. Epand, P.B. Savage, R.M. Epand, Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (ceragenins), *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* 1768 (10) (2007) 2500–2509, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.023>.
- [30] H. Heerklotz, J. Seelig, Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin, *Eur. Biophys. J.* 36 (4–5) (2007) 305–314, <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0091-5>.
- [31] M. Deleu, S. Gatard, E. Payen, L. Lins, K. Nott, C. Flore, R. Thomas, M. Paquot, S. Bouquillon, D-Xylose-based bolaamphiphiles: synthesis and influence of the spacer nature on their interfacial and membrane properties, *Comptes Rendus Chim.* 15 (1) (2012) 68–74, <https://doi.org/10.1016/j.crci.2011.10.006>.
- [32] D. Marsh, Lateral pressure in membranes, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Rev. Biomembr.* 1286 (3) (1996) 183–223, [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3).
- [33] C.-Y. Chen, K.-H. Li, Y.-H. Chu, Reaction-based detection of chemical warfare agent mimics with affinity ionic liquids, *Anal. Chem. Wash. DC U. S. 90* (2018) 8320–8325, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01763> (Copyright (C) 2019 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.).
- [34] L. Johnson, B. Ringstrand, P. Kaszynski, A convenient preparation of long chain 4-(4-*n*-alkylphenylazo)phenols and their 4-pentylbenzoate esters, *Liq. Cryst.* 36 (2) (2009) 179–185, <https://doi.org/10.1080/02678290902759210>.
- [35] K. Jia, X. Zhang, L. Zhang, L. Yu, Y. Wu, L. Li, Y. Mai, B. Liao, Photoinduced re-configuration of complex emulsions using a photoresponsive surfactant, *Langmuir* 34 (38) (2018) 11544–11552, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02456>.
- [36] C. Xiong, M. Xie, R. Sun, Responsiveness and morphology study of dual stimuli-controlled supramolecular polymer, *Macromol. Rapid Commun.* 38 (19) (2017) 1700358–1700366, <https://doi.org/10.1002/marc.201700358>.
- [37] N. Yoshino, A. Nagasaki, Y. Kondo, M. Abe, Syntheses of amphiphiles containing two azobenzene units in a molecule, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 44 (12) (1995) 1075–1085, <https://doi.org/10.5650/jos1956.44.1075>.
- [38] A. Damijonaitis, J. Broichhagen, T. Urushima, K. Hüll, J. Nagpal, L. Laprell, M. Schönberger, D.H. Woodmansee, A. Rafiq, M.P. Sumser, et al., AzoCholine enables optical control of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in neural networks, *ACS Chem. Neurosci.* 6 (5) (2015) 701–707, <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00030>.
- [39] S. Pané, E. Gómez, E. Vallés, Influence of a magnetic field during the CoNi electrodeposition in the presence of magnetic nanoparticles, *J. Electroanal. Chem.* 615 (2) (2008) 117–123, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.12.002>.
- [40] S. Pané, E. Gómez, J. Garcia-Amorós, D. Velasco, E. Vallés, Modulation of the magnetic properties of CoNi coatings by electrodeposition in the presence of a redox cationic surfactant, *Appl. Surf. Sci.* 253 (5) (2006) 2964–2968, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.06.040>.
- [41] M. Deleu, E. Deboever, M.N. Nasir, J.-M. Crowet, M. Dauchez, M. Ongena, H. Jijakli, M.-L. Fauconnier, L. Lins, Linoleic and linolenic acid hydroperoxides interact differentially with biomimetic plant membranes in a lipid specific manner, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 175 (2019) 384–391, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.014>.
- [42] J. Weinstein, S. Yoshikami, P. Henkart, R. Blumenthal, W. Hagins, Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker, *Science* 195 (4277) (1977) 489, <https://doi.org/10.1126/science.835007>.
- [43] L. Lins, R. Brasseur, W.J. Malaisse, Conformational analysis of non-sulfonylurea hypoglycemic agents of the meglitinide family, *Biochem. Pharmacol.* 50 (11) (1995) 1879–1884, [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)80003-3).