

INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**Étude de la relation structure-activité de l'anion  
tétraphénylborate pour l'identification d'un antibiotique  
efficace contre *Neisseria meningitidis* et *N. gonorrhoeae***

Par  
Robin Vidal

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Sciences expérimentales de la santé

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examineur interne

Pr. Charles Gauthier  
INRS - Centre Armand-Frappier  
Santé Biotechnologie

Examineur externe

Pr. André Pichette  
Département des sciences  
fondamentales  
UQAC – Université du Québec à  
Chicoutimi

Directrice de recherche

Pre Annie Castonguay  
INRS - Centre Armand-Frappier  
Santé Biotechnologie

## REMERCIEMENTS

Ce mémoire est l'aboutissement d'un parcours accompli en deux années que je n'aurais pas pu réaliser seul. De nombreuses personnes ont eu directement ou indirectement un impact sur le présent document.

Je tiens de ce fait à remercier, en premier lieu, le Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie et le programme de maîtrise en Sciences Expérimentales de la Santé, de m'avoir offert l'opportunité de joindre leur programme d'étude. L'ensemble des organismes financiers qui m'ont permis d'effectuer un projet avec un équipement récent et les meilleures conditions de travail qui soient. Je tiens également à remercier les personnes suivantes :

Ma directrice de recherche, la professeure **Annie Castonguay** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant ces deux années et pour le temps qu'elle a consacré à mon avancement.

Le professeur **Frédéric Veyrier** qui a été le principal collaborateur du projet et qui a su me donner de très bons conseils afin de me guider et m'informer sur le projet et la microbiologie associée.

Le professeur **Charles Gauthier** pour m'avoir prêté certains matériels nécessaires à la réalisation de mes expériences et avoir accepté de juger ces travaux.

Le professeur **André Pichette** de l'Université du Québec à Chicoutimi d'avoir accepté de juger ces travaux.

L'étudiante au doctorat **Eve Bernet** avec qui j'ai collaboré sur le projet. Elle m'a énormément aidé, conseillé et appris durant ces deux années de maîtrise sur son domaine d'expertise, ainsi que son collègue **Martin Chenal** qui a pu me venir en aide de temps en temps.

Je remercie nos collaborateurs, le professeur **Charles Dozois**, son assistant de recherche **Sébastien Houle** ainsi que le professeur **Kessen Patten** pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires respectifs et permis de réaliser des essais biologiques.

Tous les membres de mon laboratoire qui m'ont énormément soutenu tout au long de mon parcours, plus spécifiquement le Dr. **Mehdi Haghdoost** qui m'a formé à mon arrivée au laboratoire et m'a conseillé lors des premiers développements de mon projet, **Golara Golbaghi** pour m'avoir appris à effectuer les expériences de toxicité sur poissons zèbres et pris la relève de Mehdi à son départ, **Hoang-Van Tran** pour m'avoir souvent

aidé en laboratoire et la Dr. **Hala El Asmy** pour m'avoir beaucoup conseillé sur les synthèses et protocoles que je mettais en œuvre.

**Myriam Létourneau** qui m'a donné de très bons conseils durant ces deux années.

**Sylvain Milot** et **Marianne Piochon** pour l'aide qu'ils m'ont apportée avec l'utilisation des chromatographes.

**Daniel Boismenu** avec qui j'ai pu enregistrer une grande partie des spectres de masse à haute résolution et a pris le temps de m'enseigner le fonctionnement du spectromètre de masse de type *Orbitrap*.

**Dazhong Zeng, Maxime Balsells, Mariem Chalbi, Marine Guillot, Sabrina Delahais, Kevin Muru, Paul Gormand** et **Eve Bernet** pour leur soutien, les relectures de mon mémoire ou leur aide lors de la préparation de mon séminaire.

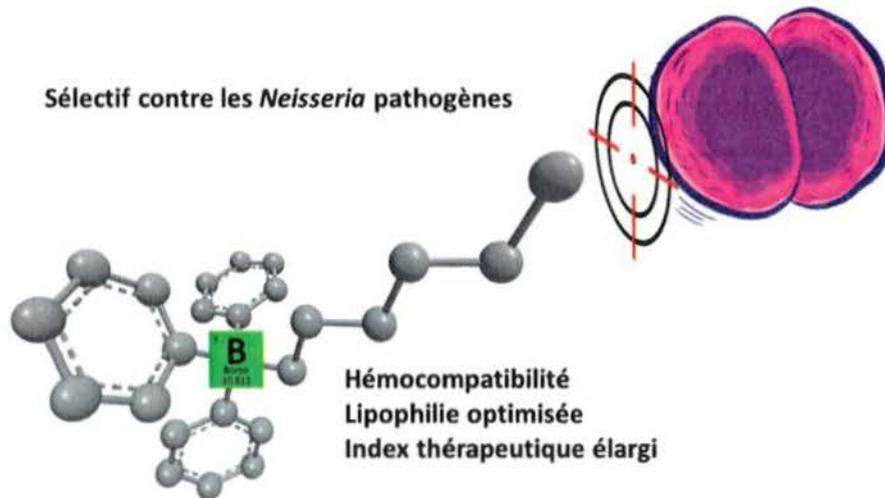
**Hymene Kouidmi, Jihen Ati** et le professeur **Charles Calmettes** pour leur aide et conseils qu'ils m'ont procurés sur une base régulière.

Les professeurs **Dominique Agustin, Sébastien Bernard** et **Geoffrey Dumonteil** dont l'enseignement et l'encadrement durant mes études de pré-maîtrise ont été essentiels à ma réussite.

Ma mère **Myriam Martens**, ma sœur **Gaelle Vidal** ainsi que mes grands-parents qui mon apporté leur soutien durant toute la période de mes études.

Finalement, je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées lors de mon cheminement à l'institut, en conférence ou bien lors de mes cours à l'Université de Montréal que je n'ai pas citées, mais qui m'ont tout de même aidé de manière sporadique.

## RÉSUMÉ



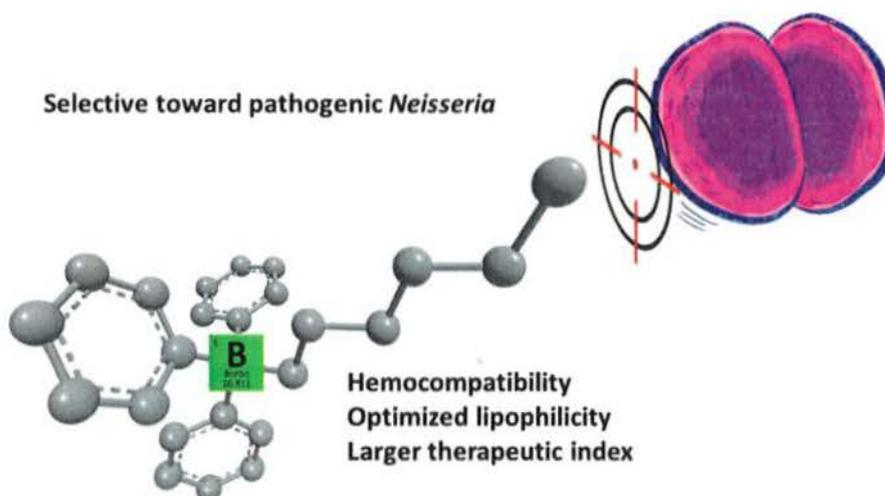
L'augmentation de la résistance des souches bactériennes infectieuses est un sérieux problème de santé publique. Il est donc nécessaire de mettre au point de nouveaux traitements pour les combattre efficacement. Pour le moment, il n'existe pas de vaccin opérationnel contre *Neisseria gonorrhoeae* et les antibiotiques ne font que contenir une pandémie globale. Nous avons récemment découvert que l'anion tétraphénylborate est un bactéricide exclusif des pathogènes *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis*.

L'objectif de notre étude est de développer une nouvelle gamme analogue de molécules plus efficaces, dont l'activité sélective ne serait pas affectée, afin de préserver le microbiote de l'individu.

De ce fait, de nouveaux organoborates sont rapportés avec leurs stratégies de synthèse respectives. Cette étude préliminaire de relations structure et activité a notamment permis d'identifier un moyen d'influencer la toxicité *ex vivo* et *in vivo* à notre avantage. Nous avons notamment pu obtenir plusieurs dérivés du tétraphénylborate de sodium ayant une activité intéressante. Les résultats de cette étude pourraient mener au développement d'une nouvelle stratégie de lutte contre *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Les molécules rapportées pourraient également mener à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques ciblant les facteurs de virulence.

**Mots-clés :** antibiotiques, gonorrhée, tétraphénylborate de sodium, virulence, maladies infectieuses

## ABSTRACT



Nowadays there is a need to develop novel treatments against bacteria that are becoming increasingly resistant to currently used antibiotics. For instance, *N. gonorrhoeae* vaccines are not yet operational and antibiotics are currently minimally preventing a devastating global pandemic. We have recently found that tetraphenylborate anion is highly effective at selectively inhibiting the growth and at killing *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*.

The aim of our study is then to develop a new family of antibiotics with a comparable or higher activity but also importantly, that does not alter the activity of other bacteria (including non pathogenic *Neisseria*) that constitute the normal flora in healthy individuals and contribute to prevent other potential infections.

Herein, the preparation of a variety of organoborates is reported. The results from their preliminary structure-activity study against the two pathogens of interest is discussed, including the influence of these modifications on their respective lipophilicity, their hemolytic innocuity and their *in vivo* toxicity on the development of zebrafish embryos. Results emerging from this study have allowed the identification of a few interesting structures with promising activities. Results from this study could lead to the development of novel strategies to fight this type of infectious disease by directly targeting the cause of their virulence.

**Keywords :** antibiotics, gonorrhoeae, sodium tetraphenylborate, virulence, infectious diseases

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES SCHÉMAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XV</b>
<b>LISTE DES ÉQUATIONS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>MISE EN CONTEXTE</b> .....	<b>3</b>
<b>1 INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>4</b>
1.1 ANTIBIORÉSISTANCE .....	4
1.1.1 <i>Apparition de résistance aux antibiotiques</i> .....	8
1.1.2 <i>Mécanisme de résistance aux antibiotiques</i> .....	8
1.2 SOLUTIONS ALTERNATIVES DANS LA LUTTE CONTRE LES BACTERIES MULTIRÉSISTANTES .....	10
1.2.1 <i>Antibiotiques à spectre très étroit</i> .....	10
1.2.2 <i>Cibler la virulence d'une bactérie</i> .....	13
1.3 LE GENRE <i>NEISSERIA</i> .....	15
1.3.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	15
1.3.2 <i>Neisseria meningitidis</i> .....	17
1.3.3 <i>Proximité entre les espèces pathogènes et commensales</i> .....	17
1.3.4 <i>Rôle de l'enveloppe bactérienne dans la virulence</i> .....	18
1.4 L'ANION TETRAPHENYLBORATE .....	21
1.4.1 <i>Intérêt thérapeutique suscité par les dérivés organoborés</i> .....	21
1.4.2 <i>Intérêts thérapeutiques de l'anion tétraphénylborate</i> .....	23
1.4.3 <i>Interactions du tétraphénylborate avec les membranes biologiques</i> .....	25
1.1.4 <i>Activité biologique : un composé bactéricide sélectif des espèces pathogènes du genre Neisseria</i> .....	26
1.5 SYNTHÈSE ET REACTIVITÉ DES BORATES .....	31
1.5.1 <i>Préparation de borate possédant des groupements hétérogènes</i> .....	31
1.5.2 <i>Introduction de fonction chimique sur un tétraarylborate</i> .....	33
1.6 MODÈLES DE CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET D'ÉVALUATION TOXICOLOGIQUE	
RETENUS POUR L'ÉTUDE .....	34
1.6.1 <i>Propriétés physico-chimiques</i> .....	34
1.6.2 <i>Détermination de la concentration minimum nécessaire pour inhiber le développement d'une bactérie</i> .....	35
1.6.3 <i>Essais de cytotoxicité ex vivo sur l'érythrocyte humain</i> .....	35

1.6.4	<i>Essais de toxicité in vivo</i> .....	36
<b>2</b>	<b>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</b> .....	<b>38</b>
2.1	HYPOTHESES .....	38
2.2	OBJECTIF SPÉCIFIQUE 1 : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE BORATISATION .....	38
2.3	OBJECTIF SPÉCIFIQUE 2 : MISE AU POINT D'UNE LIBRAIRIE DE NOUVEAUX ORGANOBORATES.....	38
2.4	OBJECTIF SPÉCIFIQUE 3 : DÉTERMINATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET DU POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DES ANALOGUES ET INTERMÉDIAIRES DE SYNTHÈSE.....	39
2.5	OBJECTIF SPÉCIFIQUE 4 : OBTENTION D'UNE FONCTIONNALISATION VERSATILE.....	39
<b>3</b>	<b>CHAPITRE 1 : ÉTUDE DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ D'ANALOGUES DU TETRAPHENYLBORATE POUR LE DESIGN D'ANTIMICROBIENS CONTRE LES SOUCHES PATHOGÈNES DE LA FAMILLE NEISSERIA</b> .....	<b>42</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	43
	<b>INTRODUCTION</b> .....	43
	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	45
	<b>ANTIMICROBIAL ACTIVITY</b> .....	48
	<b>HEMOLYTIC ACTIVITY ON HUMAN RED BLOOD CELLS</b> .....	50
	<b>IN VIVO TOXICITY ON THE DEVELOPMENT OF ZEBRAFISH EMBRYOS</b> .....	54
	<b>CONCLUSION</b> .....	56
	<b>EXPERIMENTAL SECTION</b> .....	57
	<b>REFERENCES</b> .....	63
<b>4</b>	<b>CHAPITRE 2 : AUTRES FONCTIONNALISATIONS DE L'ANION TÉTAPHENYLBORATE</b> .....	<b>72</b>
4.1	SYNTHÈSE D'UN LIGAND DE TYPE BASE DE SCHIFF COMPORTANT UN MOTIF TETRAPHENYLBORATE ET TENTATIVES DE COMPLEXATION AU RUTHENIUM .....	72
4.1.1	<i>Voie de synthèse #1 pour la formation du ligand de type base de Schiff</i> .....	73
4.1.2	<i>Voie de synthèse #2 pour la formation du ligand de type base de Schiff</i> .....	76
4.1.3	<i>Voie de synthèse #3 pour la formation du ligand de type base de Schiff</i> .....	79
4.1.4	<i>Tentatives de complexation du ligand de type base de Schiff au ruthénium</i> .....	81
4.2	SYNTHÈSE D'UN ANION TETRAPHENYLBORATE COMPORTANT UNE FONCTION AZOTURE.....	82
4.2.1	<i>Synthèse par substitution aromatique</i> .....	83
4.2.2	<i>Synthèse par substitution benzylique</i> .....	84
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERPECTIVES</b> .....	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>APPENDICE 1 : PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES DES COMPOSÉS RAPPORTÉS DANS LE CHAPITRE 2</b> .....	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>SUPPORTING INFORMATION CHAPTER 1</b> .....	<b>95</b>
7.1	1D AND 2D NMR SPECTRA .....	98
<b>8</b>	<b>SUPPORTING INFORMATION CHAPTER 2</b> .....	<b>131</b>
	<i>Characterization of B, Lithium (4-cyanophenyl) triphenyl borate</i> .....	131

Characterization of K, {4-[(E)-[(2-hydroxynaphthalen-1-yl)methylidene]amino]phenyle}triphenylborate.....	132
Characterization of L, Sodium {4-[(E)-[(2-hydroxynaphthalen -1-yl)methylidene]amino]phenyl} triphenyle borate.....	135
<b>9 BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>138</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. STRUCTURE SEMI DEVELOPEE DE (A) PRONTOSIL, (B) PENICILLINE, (C) ARSPHENAMINE ET (D) STREPTOMYCINE. ....	5
FIGURE 2. LISTE DES BACTERIES PATHOGENES PRIORITAIRES SELECTIONNEES PAR L'OMS.....	7
FIGURE 3. STRUCTURE SIMPLIFIEE DE LA MEMBRANE DE BACTERIE A GRAM POSITIF ET GRAM NEGATIF. FIGURE TIREE DE COMMONS.WIKIMEDIA.ORG CC BY-SA 4.0.....	9
FIGURE 4. <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> OBSERVEE PAR MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE. CREDIT : LABORATOIRE VEYRIER. ....	15
FIGURE 5. STRUCTURE CHIMIQUE DU ZOLIFLODACINE. ....	17
FIGURE 6. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA FAMILLE <i>NEISSERIA</i> . TIRE DES TRAVAUX DE VEYRIER & AL [47]. ....	18
FIGURE 7. STRUCTURE DE L'ENVELOPPE DE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> . TIRÉ DE STEPHEN ET AL [50]. ....	19
FIGURE 8. ILLUSTRATION DES INTERACTIONS PRINCIPALES DES COMPOSES ORGANOBORES. (A) LIAISON HYDROGENE, (B) ESTERIFICATION ET (C) COORDINATION. ....	22
FIGURE 9. STRUCTURE CHIMIQUE DU (A) BORTEZOMIB, (B) VABORBACTAM, (C) TAVABOROLE (C) ET DU (D) CRISABOROLE.....	23
FIGURE 10. FORMULE SEMI DEVELOPEE DU MPP <sup>+</sup> (GAUCHE) ET MPTP (DROITE).....	26
FIGURE 11. CRIBLAGE D'UNE LIBRAIRIE DE MOLECULES POUR L'IDENTIFICATION DE COMPOSES AYANT LA CAPACITE D'INHIBER LA CROISSANCE DE <i>N. MENINGITIDIS</i> PAR LUMINOMETRIE. CHAQUE POINT REPRESENTE UNE DES MOLECULES TESTEES ET RLU/S REPRESENTE L'UNITE RELATIVE DE LUMINESCENCE PAR SECONDE. ....	27
FIGURE 12. POURCENTAGE DE SURVIE D'UN PANEL D'ESPECES (DO600 = 0,01) EXPOSEES PENDANT TROIS HEURES A UNE CONCENTRATION DE 50 $\mu$ M DE NABPH <sub>4</sub> . CHAQUE BARRE REPRESENTE LA MOYENNE DE TROIS MESURES INDEPENDANTES.....	27
FIGURE 13. PRESENCE ACCRUE DE BORE CHEZ LES BACTERIES PATHOGENES TRAITEES AVEC LE NABPH <sub>4</sub> DETERMINE PAR ICP-MS.....	28
FIGURE 14. SOURIS INFECTEES PAR (A) <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> SEULEMENT ET (B) COINFECTEES AVEC LE VIRUS DE LA GRIPPE, PUIS TRAITEES AVEC UNE DOSE DE TETRAPHENYLBORATE DE SODIUM. ....	30
FIGURE 15. REPRESENTATION DU FONCTIONNEMENT DE L'EXPERIENCE DE LUMINOMETRIE. ....	35
FIGURE 16 SPECTRE RMN 1D <sup>1</sup> H DU BRUT REACTIONNEL DE M DANS LE CDCl <sub>3</sub> . ....	82

## LISTE DES SCHÉMAS

SCHEMA 1. ALTERNANCE FORME TRIGONAL PLAN (GAUCHE) ET TETRAEDRIQUE (DROITE).....	21
SCHEMA 2. VOIE DE SYNTHÈSE GÉNÉRALE DE L'ANION TETRAPHENYLBORATE. ....	31
SCHEMA 3. PRÉPARATION DU TOLYLTRIPHENYLBORATE PAR L'ADDITION D'UN REACTIF DE GRIGNARD SUR LE TRIPHENYLBORANE. ....	32
SCHEMA 4. PRÉPARATION DU TOLYLTRIPHENYLBORATE PAR L'ADDITION DE 3 EQ DE REACTIF DE GRIGNARD SUR LE TOLYLTRIFLUOROBORATE DE POTASSIUM. ....	32
SCHEMA 5. SYNTHÈSE PAR ADDITION SUCCESSIVE SUR LE BORATE DE TRIÉTHYLE. ....	33
SCHEMA 6. EXEMPLE DE LA FONCTIONNALISATION D'UN MOTIF TETRAARYLBORATE EN DEUX ÉTAPES : BROMATION RADICALE SUIVIE D'UNE SUBSTITUTION NUCLEOPHILE.....	33
SCHEMA 7. VOIE RETROSYNTHÉTIQUE #1 D'UN LIGAND DE TYPE BASE DE SCHIFF COMPORTANT UN MOTIF TETRAPHENYLBORATE. ....	73
SCHEMA 8. PRÉPARATION DU (4-CYANOPHENYL)TRIPHENYLBORATE B. ....	74
SCHEMA 9. VOIE RETROSYNTHÉTIQUE #2 D'UN LIGAND DE TYPE BASE DE SCHIFF COMPORTANT UN MOTIF TETRAPHENYLBORATE. ....	76
SCHEMA 10. VOIE RETROSYNTHÉTIQUE #3 D'UN LIGAND DE TYPE BASE DE SCHIFF COMPORTANT UN MOTIF TETRAPHENYLBORATE. ....	79
SCHEMA 11. PRÉPARATION DU 1-[(1E)-[(4-BROMOPHÉNYL)IMINO]MÉTHYL]NAPHTHALÈN-2-OL K. ....	79
SCHEMA 12. PRÉPARATION DU LIGAND DE TYPE BASE DE SCHIFF D COMPRENANT UN ANION TETRAPHENYLBORATE. ....	80
SCHEMA 13. VOIE RETROSYNTHÉTIQUE D'UN DÉRIVÉ TETRAPHENYLBORATE COMPRENANT UNE FONCTION AZOTURE PAR SUBSTITUTION AROMATIQUE. ....	83
SCHEMA 14. VOIE RETROSYNTHÉTIQUE DE LA PRÉPARATION D'UN DÉRIVÉ TETRAPHENYLBORATE COMPRENANT UNE FONCTION AZOTURE PAR SUBSTITUTION BENZYLIQUE.....	84
SCHEMA 15. PRÉPARATION DU (4-BROMURE DE BENZYLE)TRIPHENYLBORATE DE SODIUM. ....	84

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. ACTIVITE DE TROIS SELS DE RUTHENIUM SUR LES LIGNEES CELLULAIRES, MCF7 (ADENOCARCINOME DU SEIN METASTATIQUE), MDA-MB-231 (ADENOCARCINOME DU SEIN METASTATIQUE), MM96L (MELANOME LYMPHATIQUE) ET NFF (TISSU OSSEUX SAIN). ....	24
TABLEAU 2. ACTIVITE DE TROIS SELS DE RUTHENIUM SUR LES LIGNEES CELLULAIRES MCF7 (ADENOCARCINOME DU SEIN METASTATIQUE) ET T47D (CARCINOME CANALAIRE).....	25
TABLEAU 3. CONDITIONS UTILISEES POUR LA REDUCTION DU (4-CYANOPHENYL)TRIPHENYLBORATE DE LITHIUM. ....	75
TABLEAU 4. CONDITIONS REACTIONNELLES D'ACTIVATION DU (4-IODOPHENYL)TRIPHENYLBORATE.....	78
TABLEAU 5. CONDITIONS DE COMPLEXATION DU LIGAND DE TYPE BASE DE SCHIFF. ....	81
TABLEAU 6. SUBSTITUTION ELECTROPHILE AROMATIQUE DU (4-IODOPHENYL)TRIPHENYLBORATE.....	83
TABLEAU 7 BROMATION RADICALAIRE DU TOLYLTRIPHENYLBORATE DE SODIUM AVEC DIFFERENTS SOLVANTS. ADAPTE DE CONDITIONS PUBLIEES [97], [98]. ....	85
TABLEAU 8. BROMATION RADICALAIRE DE O AVEC DIFFERENT SOLVANTS ET VINGT FOIS PLUS D'INITIATION RADICALAIRE. ADAPTE DE CONDITIONS PUBLIEES [97], [98]. ....	86
TABLEAU 9. BROMATION RADICALAIRE DE O DE SODIUM PAR ACTIVATION MICRO-ONDE. ....	86
TABLEAU 10. BROMATION RADICALAIRE DE O DE SODIUM INITIEE PAR LE PEROXYDE DE BENZOYLE. ....	86

## LISTE DES ÉQUATIONS

ÉQUATION 1 CALCUL DE LA VALEUR LOG(P).....	34
--	----

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- ACN : acétonitrile
- AcOEt : Acétate d'éthyle
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AIBN: azobisisobutyronitrile
- ARN: acide ribonucléique
- ATP: adénosine triphosphate
- CC-BY-SA: creative commons attribution - partage dans les mêmes conditions
- CCl<sub>4</sub>: tétrachlorure de carbone
- CCM: Chromatographie sur couche mince
- CDC: Centres pour le contrôle et la prévention des maladies
- CDCl<sub>3</sub>: Chloroforme deutéré
- CHCl<sub>3</sub>: Chloroforme
- CMB: Concentration minimum bactéricide
- CMI: Concentration minimum inhibitrice
- COSY: COrrélation Spectroscopy
- DCM: dichlorométhane
- DMF: diméthylformamide
- DMSO: diméthylsulfoxyde
- EARS-net: Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens
- Et<sub>2</sub>O : éther diéthylique
- Et<sub>3</sub>N : triéthylamine
- HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy*
- HRMS: *High resolution mass spectrometry*
- HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy*
- HTS : *high throughput sequencing*
- ICP-MS: *inductive coupling plasma mass spectrometry*
- IP: intrapéritonéale
- IV: intraveineuse
- HPLC-MS : chromatographie en phase liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse
- LOS: lipoligosaccharide

- MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*
- MATE: *multi antimicrobial extrusion protein*
- MATH : *microbial adhesion to hydrocarbons*
- MeOH : méthanol
- MFS : *major facilitator superfamily*
- MPP<sup>+</sup> : 1-méthyl-4-phényl pyridinium
- MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
- MTT : 2,5-diphenyl tetrazolium bromide
- NBS : n-bromosuccinimide
- nBuLi : n-butyllithium
- qRT PCR: *quantitative real-time polymerase chain reaction*
- R&D : recherche et développement
- RMN : résonance magnétique nucléaire
- SMR : *small multidrug resistance family*
- THF : tétrahydrofurane
- UV : Ultraviolet

## **MISE EN CONTEXTE**

---

*Neisseria* est un genre de bactérie diplocoque à Gram négatif appartenant aux protéobactéries. Elles sont retrouvées sur les muqueuses génitales et les voies respiratoires supérieures. Onze *Neisseria* sont retrouvées chez l'homme dont deux étant pathogènes. Certaines d'entre elles sont des pathogènes opportunistes, notamment chez les personnes immunodéprimées.

*N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* sont deux pathogènes respectivement responsables de la méningite cérébrospinale et de la gonorrhée. Elles ont rapidement échappé aux traitements antibiotiques modernes. À ce jour, *N. gonorrhoeae* est responsable de soixante à cent millions de cas chaque année. Cette souche inclut un haut niveau de résistance à la bithérapie par ceftriaxone et azithromycine ainsi qu'une résistance aux sulfonamides, tétracyclines, fluoroquinolones et macrolides. Cette forte adaptabilité est explicable par deux propriétés que possèdent ces bactéries. La première est son absence de système de réparation d'ADN, lui conférant des taux de mutations spontanées élevés. La deuxième est sa capacité à prélever de l'ADN libre de l'environnement afin de l'intégrer dans son génome. De plus, un accès non contrôlé, abusif, inapproprié aux antibiotiques a permis d'accélérer l'apparition de résistance.

Les groupes de recherche du Pr Castonguay et Veyrier ont récemment découvert que le tétraphénylborate de sodium possède un potentiel bactéricide envers ces deux pathogènes. De plus, cette molécule démontre une activité sélective.

L'objectif de cette étude consiste donc en la préparation d'une nouvelle librairie d'analogues du tétraphénylborate dont les modifications structurales s'intègrent à une étude de relations structure-activité.

Le premier chapitre de ce mémoire présente une revue de la littérature permettant de bien comprendre les enjeux actuels entourant le développement de nouveaux antibiotiques, une brève description des deux bactéries pathogènes visées, puis un résumé détaillé des études rapportant une activité biologique du tétraphénylborate de sodium, incluant la description des recherches effectuées par le laboratoire du professeur Veyrier. Enfin, ce premier chapitre présente également une description des méthodes de synthèse et d'évaluation biologique qui ont été utilisées pour cette étude.

# **1 INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE**

---

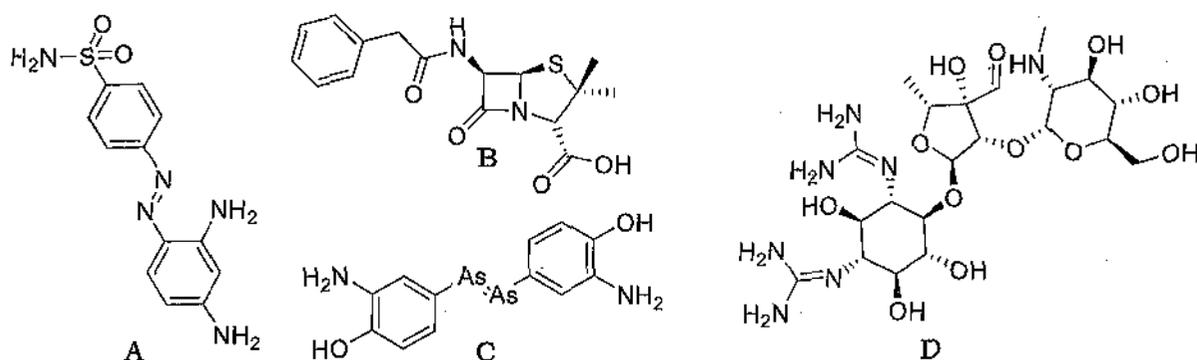
Le postulat de Koch a longtemps été utilisé comme référence afin de déterminer si une maladie est infectieuse ou non. Ce postulat, basé sur la présence de l'agent pathogène impliqué, est progressivement remplacé en 1996 par le postulat moléculaire de Koch, basé sur la présence d'une séquence nucléique, par manque d'exactitude [1]. Ce modèle permet de décrire cinq grandes familles d'agents infectieux : les virus, les bactéries, les champignons, les parasites et les arthropodes. Les médecines modernes et traditionnelles ont utilisé des outils de lutte contre ceux-ci : les vaccins, les antiviraux, les antibiotiques, les antifongiques, les antiprotozoaires, les anthelminthiques, l'hygiène et la prévention.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux bactéries. Elles seraient la première forme de vie apparue il y a 3,77 milliards ou bien 4.28 milliards d'années [2]. Elles sont capables de s'adapter à tout type de biotope: les sols, plantes, déserts, océans ainsi que les environnements extrêmes présentant de fortes acidités, températures, basicités, radiation. La majorité des bactéries demeure inoffensive, mais certaines provoquent des maladies infectieuses résultant d'interactions avec leur hôte. Leur capacité d'adaptation remarquable leur ont aussi permis de s'adapter à notre médecine moderne.

## **1.1 Antibiorésistance**

Les fondements de l'ère des antibiotiques commencent avec les travaux de Louis Pasteur et Jules Joubert en 1877 [3]. Ils découvrirent que l'injection de germe aérobie (non spécifié) à des rats empêchait le développement des symptômes de l'anthrax (causé par *Bacillus anthracis*). Il s'agit de la première évidence qu'un microorganisme est capable d'inhiber le développement d'un autre, phénomène se nommant l'antibiose. Un pionnier dans les traitements chimiques est Paul Ehrlich. Il a développé la première thérapie chimique à base d'arsenic en 1909 pour guérir *Treponema pallidum* [3]. Celle-ci sera commercialisée par Bayer sous le nom Salvarsan. Toutefois, les découvertes qui changeront drastiquement le monde sont la pénicilline en 1928 et les sulfamides en 1935. Leur utilisation massive commençant durant la Seconde Guerre mondiale [4] a permis de sauver la vie de très nombreuses personnes. Ces découvertes ont fait l'objet de trois prix Nobel de médecine : G. Domagk en 1939 pour la découverte du prontosil,

A. Fleming, E. Chain et H. Florey en 1945 pour leur découverte de la pénicilline ainsi que S. Waksman en 1952 pour la découverte de la streptomycine (figure 1). La mise sur le marché de ces traitements a permis de sauver des millions de vies et a été la principale cause de l'augmentation de l'espérance de vie de 1950 à 1970 [5]. La cause majeure de mortalité est passée des infections transmissibles aux maladies non transmissibles (cancer, maladie cardiovasculaire et accident vasculaire cérébral). Les maladies infectieuses sont alors devenues le problème des aînés, immunodéprimés et autres groupes à risque [6].



**Figure 1. Structure semi développée de (A) prontosil, (B) pénicilline, (C) arsphénamine et (D) streptomycine.**

À cette période, certaines maladies développent ou acquièrent la capacité d'échapper aux traitements destinés à les tuer. Les premières résistances antibiotiques ont pu être identifiées dès l'année 1940 [7] et caractérisées. Cependant, cette découverte n'inquiètera que très peu car jusqu'alors la résistance est pensée comme acquise verticalement, c'est-à-dire par une succession de mutations aléatoires et transmises à la génération suivante. Ce mode d'acquisition est cependant peu efficace, et n'explique pas l'apparition aussi rapide de résistances. En 1963, la première description de transfert horizontal montre qu'il est possible de transmettre une résistance d'une espèce à une autre par le biais d'un plasmide [8].

Durant les années 70 à 90, l'innovation s'est progressivement essoufflée en raison des diminutions de retour sur investissement. En effet, les coûts de recherche et développement (R&D) des molécules antibiotiques sont de plus en plus élevés. Les courtes périodes de traitement, les antibiotiques de première génération qui restent tout de même efficaces dans la majorité des cas ainsi que le faible temps de couverture d'un brevet, limitent le retour sur investissement. De plus, les patients et les institutions n'acceptent pas de dépenser le prix d'un traitement anticancéreux pour guérir d'une

infection bactérienne qui est souvent associée à une maladie bénigne. Les budgets de recherche alloués sont transférés à d'autres sujets de plus grande importance tels que les antiviraux, antifongiques, et plus spécifiquement la tuberculose [9]-[11]. La dernière classe d'antibiotique est mise sur le marché en 1962 pour les bactéries à Gram négatif avec les quinolones et en 1984 pour les bactéries à Gram positif avec la daptomycine. Les molécules mises sur le marché par la suite n'apportaient pas de nouveau mécanisme d'action. Durant les années 80, le nombre de cas de résistance à la pénicilline causée par *Streptococcus pneumoniae* explose passant de 6% à 44 % sur cette décennie en Espagne [9]. L'OMS ouvre ainsi les premiers groupes de travail dédiés à l'antibiorésistance [12]. En janvier 1981 est signé le *Statement Regarding Worldwide Antibiotic Misuse* par 147 chercheurs provenant de 27 pays différents. Stuart B. Levy fonda dans l'objectif d'optimiser l'usage d'antimicrobiens et de contenir l'antibiorésistance *L'Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA)* [13]-[18]. Malgré les efforts de recherche sur les impacts de l'antibiorésistance sur notre société, la plupart des organisations gouvernementales n'y prêteront que peu d'attention [12], [19], [12]. En 1992, la publication de *Emerging Infections: Microbial Threats To Health in the United States* déclenchera un grand revirement de situation, le CDC lancera un programme de surveillance en 1994 et, en 1998, l'Europe créera un système de surveillance sur son territoire, aujourd'hui devenu l'ECDC.

Depuis 2010, le nombre d'alertes émises par les universités, organisations nationales et internationales n'a cessé d'augmenter [20]. En janvier 2017, douze espèces de bactéries sont sélectionnées en fonction du nombre de cas, leur taux de mortalité, leur risque sur la santé et la communauté, l'existence et l'évolution de résistances, leurs voies de transmission ainsi que leurs voies de prévention en milieu hospitalier et communautaire (figure 2). Elles sont classées en trois ordres de priorités : critique, élevée et moyenne. Parmi celles classées critiques, on retrouve *Pseudomonas aeruginosa*, résistante aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et fluoroquinolone, puis *Acinetobacter baumannii* qui est une infection nosocomiale opportuniste létale jusqu'à 70 % des cas.

Les *enterobacteriaceae* telles que *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* sont résistantes à la majorité des antibiotiques comme les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, les carbapénèmes, et la colistine [21], considérée comme l'antibiotique de dernier recours en cas d'infection multirésistante. L'augmentation rapide des cas de résistance aux antibiotiques utilisés en clinique est particulièrement inquiétante compte tenu du nombre limité de composés antibactériens mis sur le marché au cours des dernières années. L'apparition de telles résistances rend de plus en plus complexes et risquées des chirurgies considérées comme bénignes comme les césariennes, les remplacements de hanche ou l'avulsion des dents de sagesse.

En 2019, le centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) publie un rapport sur l'antibiorésistance aux États-Unis. En comparaison à l'année 2013, il y a eu une augmentation de 7 % du nombre d'infections présentant au moins une

Critique	Haute	Moyenne
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacter baumannii</i></li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>• <i>enterobacteriaceae</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Enterococcus faecium</i></li> <li>• <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>• <i>Campylobacter</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• <i>Neisseria gonorrhoeae</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus pneumoniae</i></li> <li>• <i>Haemophilus influenzae</i></li> <li>• <i>Shigella spp</i></li> </ul>

**Figure 2. Liste des bactéries pathogènes prioritaires sélectionnées par l'OMS.**

résistance et une augmentation de 18 % du nombre de morts dues à une résistance. Pour l'Europe, le réseau de surveillance des résistances antimicrobiennes (EARS-net) estime en 2015 [22] une augmentation de 251 % du nombre d'infections et 246 % du nombre de morts dues aux infections résistantes [22] par rapport à 2007. Du fait que EARS-net et le CDC n'ont ni liste de pathogènes ni méthodes de suivi identiques, ces données ne sont pas directement comparables.

### 1.1.1 Apparition de résistance aux antibiotiques

Lorsqu'un traitement antibiotique est utilisé, l'ensemble de la communauté bactérienne est exposé à la molécule. Les bactéries pathogènes comme non pathogènes subissent alors une pression sélective sur leur possession d'un gène leur offrant un avantage sur l'antibiotique utilisé. Ces avantages peuvent être acquis par transfert vertical mais, c'est le transfert horizontal qui joue le rôle le plus important. Les bactéries sont capables de proliférer et partager leurs avantages à d'autres bactéries de la même espèce ou non. Il existe trois systèmes principaux de transfert horizontal :

- La **transduction** est l'importation d'un élément de résistance par le biais d'un phage, une classe de virus infectant les bactéries.
- La **conjugaison** permet la transmission de résistance, d'un élément virulence, de moyen de métabolisme et de résistance à des biocides par le transfert d'un plasmide. C'est un élément mobile d'ADN qui est transféré et dupliqué entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse.
- La **transformation** est un moyen utilisé permettant l'intégration à leur génome d'un fragment d'ADN provenant de leur environnement. La bactérie doit être dans un état physiologique particulier, appelé compétence naturelle.

### 1.1.2 Mécanisme de résistance aux antibiotiques

Les bactéries ont mis au point divers mécanismes de défense contre les antibiotiques soit en agissant directement sur celui-ci (diminution de l'efficacité / concentration) ou en utilisant des interactions communautaires.

#### **Résistance diminuant l'efficacité du mécanisme d'action de l'antibiotique**

Contre les antibiotiques ciblant une protéine, l'ARN ou bien un autre matériel biologique, une bactérie est capable de produire des quantités accrues de la cible du médicament afin de conserver la fonction physiologique associée. Elle est aussi capable de transformer la cible afin de diminuer son affinité avec l'antibiotique utilisé, cette transformation pouvant être une modification dans le génome ou une modification après transcription de l'ADN. Cette dernière étape est réalisée par une enzyme, la méthyle transférase, qui méthyle l'ARN au niveau du site de fixation de l'antibiotique. Une dernière possibilité est le développement d'une nouvelle voie de signalisation par la bactérie lui permettant de contourner complètement celui visé par l'antibiotique [23].

### Mécanisme agissant sur la décroissance de la concentration d'un antibiotique

Une enzyme peut être utilisée afin de réagir avec l'antibiotique et mener à une inactivation de celui-ci. Les plus étudiées sont les  $\beta$ -lactamase capables de briser le cycle de la lactamine, mais il existe une grande diversité d'enzymes, telles que les nucléotidyltransférases ou bien les monooxygénases [24]. Ce mécanisme s'apparente à une forme de métabolisation.

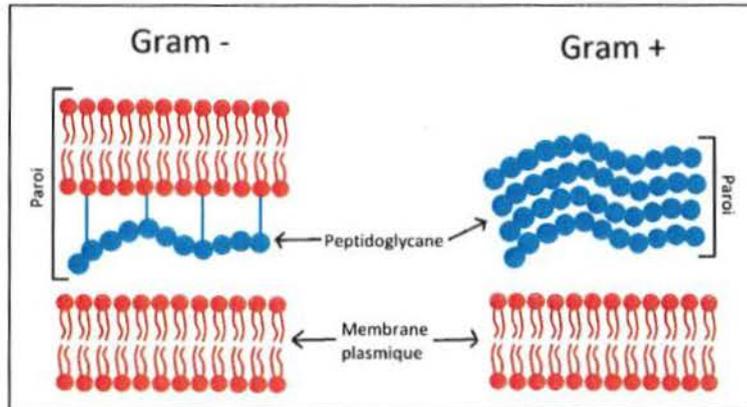


Figure 3. Structure simplifiée de la membrane de bactérie à Gram positif et Gram négatif. Figure tirée de commons.wikimedia.org CC BY-SA 4.0.

La première ligne de défense face à un composé toxique d'une bactérie est sa paroi cellulaire. À l'exception des lipopeptides antimicrobiens, tous les antibiotiques ont une action intra bactérienne. Les bactéries à Gram positif et Gram négatif présentent de fortes différences structurelles dans leur membrane (figure 3). Elle est capable de filtrer toutes les molécules polaires, qui sont contraintes d'emprunter les porines. Les porines sont capables de laisser diffuser de petites molécules, les bactéries sont aptes à réagir au stress d'un antibiotique et diminuer le nombre de porines afin de réduire leur sensibilité.

La majeure partie des microorganismes possède un groupe de protéines transmembranaires appelé pompe à efflux. Elles effectuent un transport actif de polluants, métaux, métabolites ou signaux de quorum sensing dans le milieu. Leur rôle peut être spécifique à un ou plusieurs xénobiotiques. Les transporteurs jouant un rôle dans l'antibiorésistance sont principalement les *small multidrug resistance family* (SMR) et *multi antimicrobial extrusion protein* (MATE) qui visent de façon spécifique les antimicrobiens. La troisième, *major facilitator superfamily* (MFS), joue aussi un rôle non spécifique dans l'antibiorésistance [25], en exportant des cations endogènes et des substances lipophiles.

### **Interaction communautaire menant à une résistance accrue**

Afin d'échapper aux antibiotiques, les bactéries sont capables de passer d'un état individuel dit « planctonique » à une forme agglomérée dite de « biofilm ». Le biofilm est une communauté de nature variée, complexe où des bactéries ainsi que d'autres espèces de champignons, d'algues et de protozoaires peuvent être recrutés. Il démontre la plupart du temps un comportement fortement coopératif [26]. Il a une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, protéines, tensioactifs, lipides et glycolipides qui permet son d'adhérence à n'importe quelle surface [27]. Cette matrice constitue un premier rempart de protection en réduisant la diffusion des antibiotiques à l'intérieur du biofilm. Le biofilm est aussi un site d'échange horizontal de gènes accrues jusqu'à mille fois [28]. Le cycle de vie du biofilm est régulé par, entre autres, le *quorum sensing* impliquant de nombreux mécanismes régulateurs qui contrôlent l'expression coordonnée des gènes bactériens [29].

Une seconde action communautaire apparaît lors de la libération de l'indole provenant de la métabolisation du tryptophane. Il joue un rôle signalétique extracellulaire intra et inter espèce. Il intervient dans de multiples rôles physiologiques de bactéries, tels que la formation de spores, la stabilité du plasmide, l'expression de gène, la virulence et le biofilm [30]. L'indole a un rôle souvent en opposition à l'autoinducer-2, un acide boronique régulateur du *quorum sensing* [30]. L'indole produit massivement par les souches résistantes se diffuse dans la communauté bactérienne et prodigue un rôle protecteur chez celle sensible à l'antibiotique [31]. L'ensemble de la population est donc capable de survivre sans avoir un gène de résistance prédominant et permettant le maintien de sa diversité génétique. Cette forme de résistance a été nommée la défense altruiste [31] car la population résistante investit une énergie supplémentaire dans le processus qui n'est pas nécessaire à sa propre survie.

## **1.2 Solutions alternatives dans la lutte contre les bactéries multirésistantes**

### **1.2.1 Antibiotiques à spectre très étroit**

La majeure partie des antibiotiques aujourd'hui sur le marché sont des antibiotiques à large spectre, c'est-à-dire qu'ils sont actifs sur les bactéries à Gram positif et Gram négatif. De multiples facteurs ont historiquement poussé la recherche industrielle et académique à développer des antibiotiques universels. Le premier facteur est que les

lois du marché sont peu favorables au développement de nouveaux antibiotiques. Dû au court temps d'application des brevets, ces molécules doivent être rentabilisées en un temps très limité après leur autorisation de mise sur le marché. Les patients ne souhaitent pas non plus défrayer des coûts élevés pour un antibiotique étant donné le nombre d'antibiotiques encore efficaces sur le marché. C'est donc la R&D des antibiotiques « universels » qui domine encore aujourd'hui. Le second facteur est la méconnaissance du rôle bénéfique du microbiote, ce qui n'a été possible que très récemment avec l'application du séquençage à haut débit (HTS). Le troisième facteur est la faible connaissance du phénomène d'antibiorésistance ainsi que l'ensemble des mécanismes qui y sont liés. Enfin, les antibiotiques à large spectre représentent la solution la plus judicieuse lorsque le pronostic vital est engagé. Une approche intéressante serait d'orienter des efforts vers le développement de nouvelles générations d'antibiotiques à spectre très étroit (*ultra-narrow spectrum antibiotic*) ou bien d'antibiotiques sélectifs pour certains pathogènes (*pathogens selective antibiotic*). Cette notion est apparue récemment dans la littérature [32]–[34] et ne semble pas avoir fait consensus sur sa dénomination. Pour le reste du document, le terme « spectre très étroit » sera utilisé.

Des thérapies ciblées pourraient prendre l'avantage sur la résistance bactérienne due à une diminution d'apparition de souches résistantes. En effet, le mécanisme d'action associé à la drogue serait unique pour un seul ou bien un petit groupe de bactéries pathogènes. Les bactéries commensales ne seraient pas exposées à une pression sélective car elles ne possèdent pas la cible de l'antibiotique à spectre très étroit. Par conséquent, elles n'auraient aucune raison de développer une résistance ou de conserver un gène inutile. Le dernier point est appuyé par le fait que, pour maintenir un gène de résistance actif, de l'énergie non nécessaire à la survie d'une bactérie non ciblée par ce traitement est nécessaire. Ainsi, les transferts horizontaux inter espèces seraient très limités voire supprimés, diminuant ainsi l'apparition de résistances.

Un deuxième argument est le rôle du microbiote dans la prévention de maladies. En effet, le corps humain est l'hôte de nombreuses espèces fongiques et bactériennes avec lesquelles il interagit de façon mutuelle. La peau, le système digestif et les muqueuses sont les principaux lieux de vie de ces bactéries. Il y aurait plus de cinq cents espèces différentes dans le corps humain participant à des éléments clés de la survie de son hôte telle que la production de molécules importantes comme l'acide folique, la vitamine

K, la biotine et certains glucides. Le microbiote a un rôle protecteur important, il stimule le système immunitaire en produisant des antigènes, diminue les risques d'allergies, eczéma et certaines maladies auto-immunes. De plus, il protège l'individu d'infections sévères telles que *Salmonella Typhimurium* ou *Escherichia coli* en entrant en compétition dans l'obtention des nutriments nécessaires à leur survie. *Staphylococcus epidermidis* est capable de sécréter des protéases luttant contre le biofilm de *Staphylococcus aureus*. Un peptide antimicrobien est utilisé contre lui par *Staphylococcus lugdenensis*. Certaines bactéries du microbiote sembleraient même être capables de s'attaquer aux bactéries ayant le plus grand potentiel de résistance. *In vitro*, *N. lactamica* est capable d'induire la mort de *N. gonorrhoeae*. En effet, cette bactérie étant en permanence en état de compétence, ingérant l'ADN de son milieu en tant que source de nutriments ou l'intégrant à son génome, *N. lactamica* est capable de libérer des brins d'ADN-poison à l'encontre de *N. gonorrhoeae* [35]. Ce mécanisme est susceptible de se produire chez d'autres bactéries naturellement compétentes comme *Streptococcus pneumonia*, *Acinetobacter baumaninnii*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, et *Vibrio cholerae*. Pour toutes ces raisons, le microbiote est une arme de choix quand il s'agit de se battre contre une infection. Malheureusement, tous les antibiotiques présents sur le marché ont comme effet secondaire son éradication. Un traitement mène parfois à une perte définitive de sa diversité et sa fonction. Par conséquent, un antibiotique à spectre très étroit pourrait être une solution de choix pour la préservation du microbiote et de l'ensemble de son action bénéfique sur son hôte, tout en étant néfaste envers l'agent infectieux. Par contre, les antibiotiques à spectre très étroit présentent une limitation pour les infections sévères dont les méthodes de diagnostic sont aujourd'hui trop lentes. En effet, les principales méthodes de diagnostic sont la recherche d'un antigène ou l'utilisation d'un milieu de culture spécifique. À titre d'exemple, c'est le cas d'*Acinetobacter baumaninnii* qui est diagnostiqué depuis un échantillon de sang ou de liquide cébrospinal puis cultivé sur un milieu de croissance sélectif. L'ensemble de la procédure nécessite 24 heures de culture, ce qui est trop long pour une maladie ayant un taux de mortalité et de résistance élevés. Ce type de cas nécessitant la mise en place du traitement antibiotique préalablement à l'identification de la bactérie, l'antibiotique à large spectre est aujourd'hui celui qui offre la plus grande probabilité de mener le patient à une guérison. Fort heureusement, des technologies émergentes pourraient drastiquement réduire les délais d'identification pour des analyses de routine [36]. Le

perfectionnement des analyses chimiques, grâce à l'accélération des procédés, la chute des limites de détection ainsi que l'intelligence artificielle, a permis l'étude approfondie du métabolome, c'est-à-dire l'identification des petites molécules, métabolites et autres marqueurs chimiques liés à une bactérie. L'avancement technologique du côté de la désorption-ionisation laser assistée par matrice couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (MALDI-TOF) serait capable d'établir un diagnostic avec quelques microlitres d'échantillon et un temps d'analyse de vingt à trente secondes [37].

Finalement, l'antibiotique à spectre très étroit serait une opportunité de traitement intéressante en considérant les nombreux avantages médicaux qui pourraient en découler. Notamment par les deux arguments exposés ci-dessus, il se révélerait plus durable et plus sûr pour le patient. Bien que plusieurs obstacles se dressent face à leur utilisation, ceci n'est pas infranchissable et pourrait déboucher vers des traitements plus adaptés.

### **1.2.2 Cibler la virulence d'une bactérie**

Une approche intéressante serait de développer des antibiotiques à spectre étroit ciblant des facteurs de virulence. Ces derniers sont un matériel biologique produit par un agent infectieux lui donnant son caractère pathogène. Il peut permettre aux bactéries pathogènes d'échapper ou bien d'inhiber le système immunitaire, affaiblir son hôte en sécrétant des toxines, hémolysines, lipases ou peptidases. Ces facteurs permettent à la bactérie de coloniser l'hôte et d'utiliser ses nutriments.

Le concept de bloquer un facteur de virulence est souvent associé à une pression sélective minime [38]. En effet, cibler un facteur de virulence inclut un spectre d'action très étroit. Certains facteurs de virulence permettent à la bactérie d'être pathogène mais ne sont pas nécessaires à sa propre survie et sa multiplication. Ainsi, l'inactivation induit peu ou pas de pression sélective tout en supprimant la pathogénicité. Le principal désavantage est que la bactérie pourrait continuer d'être transmissible. Une deuxième possibilité serait que le facteur de virulence soit nécessaire à la survie ou la réplication. Ceux-ci imposeraient une pression sélective menant à des clones résistants. Cependant, il est permis de penser que le clone résultant payerait sa résistance au prix de sa virulence.

Contrairement au retard d'action observé avec plusieurs antibiotiques en raison de leur passage transmembranaire, les molécules ciblant des facteurs de virulence ont

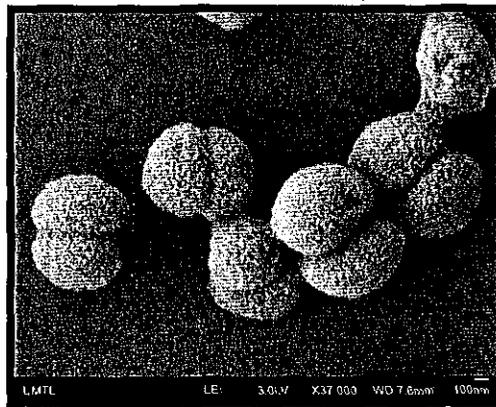
probablement une action plus rapide. Une approche ciblant un facteur de virulence pourrait permettre une action complémentaire à l'antibiotique, car leur mode d'action est différent. Elle permettrait une meilleure protection pour l'hôte immunodéprimé car *l'atténuation de la virulence améliorerait le pronostic vital.*

### 1.3 Le genre *Neisseria*

Dans l'optique d'investiguer ce type d'application, le laboratoire de la Pre Castonguay et celui du Pr. Veyrier se sont intéressés aux *Neisseria*, un genre de bactérie diplocoque (figure 4) à Gram négatif appartenant aux  $\beta$ -protéobactéries. Elles sont retrouvées sur certaines muqueuses de mammifères. À ce jour, onze *Neisseria* sont retrouvées chez l'homme, colonisant les voies respiratoires supérieures sans induire de pathogénicité. *N. perflava*, *N. sicca* et *N. lactamica* sont notamment présentes dans les muqueuses du rhinopharynx et permettraient de prévenir des infections par des pathogènes graves dont des cas d'antibiorésistance sont connus, tels que *Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*.

#### 1.3.1 *Neisseria gonorrhoeae*

*Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) est un gonocoque décrit pour la première fois par Albert Neisser en 1879. Elle est la première identifiée du genre *Neisseria*. Elle est responsable d'une infection sexuellement transmissible, la gonorrhée, possible presque exclusivement par contact direct de muqueuse, ce qui limite la population à risque. Cependant, son portage est souvent asymptomatique ce qui rend aisé sa dissémination. Elle se manifeste chez l'homme par une inflammation des voies urinaires et peut dégénérer en prostatite ou épидidymite. Chez la femme, elle se manifeste par une urétrite et peut conduire à la stérilité. Chez le nouveau-né, elle peut être transmise à la naissance entraînant une ulcération de la cornée menant à la cécité [39].



**Figure 4. *Neisseria meningitidis* observée par microscope électronique à balayage. Crédit : Laboratoire Veyrier.**

Les bactéries pathogènes du genre *Neisseria* sont naturellement compétentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de capter l'ADN de leur milieu et de s'en servir comme source de nutriments ou l'intégrer à leur génome. Des résistances à l'ensemble des options thérapeutiques ont été décrites : pénicilline, tetracycline, fluoroquinolones, macrolides, cefixime (2007), ceftriaxone (2013), azithromycine et érythromycine (2018).

Aux États-Unis, le CDC rapporte 820 000 cas en 2013 et 1,14 millions en 2019, soit une augmentation de 39 %. La part d'infection ayant présenté au moins une résistance a augmenté de 123 %. En Europe, 58 985 cas sont rapportés en 2013 et 89 624 en 2017, soit une augmentation de 52 % [40]. Au niveau mondial, ce chiffre est estimé à près de 106 millions. Des cas de haut niveau de résistance ont été décrits dans plusieurs pays, avec une résistance totale à l'ensemble des traitements de première et seconde lignes et une faible sensibilité au traitement de dernier recours. Le même constat est fait au Canada avec + 65 % d'infections entre 2010 et 2015, portant à 19 845 cas pour cette année.

Les premières tentatives de vaccin contre la gonorrhée remontent au début des années 1900 [41], abandonnées au profit des antibiotiques. Cependant, vis-à-vis du contexte actuel, de potentielles utilisations de vaccins sont de nouveau étudiées. L'obtention d'un vaccin efficace pose de nombreux défis dû au fait que *N. gonorrhoeae* est un pathogène exclusivement humain, ce qui limite l'efficacité des modèles animaux pour comprendre les interactions entre la bactérie, son hôte et le système immunitaire. Finalement, *N. gonorrhoeae* démontre une remarquable capacité de reconfiguration de ses antigènes. Le vaccin MeNZB contre *N. meningitidis* stimule la production d'anticorps contre le gonocoque chez 31 % des patients. Les perspectives de la mise sur le marché d'un vaccin sont très limitées, mais non exclues. De ce fait, les seules méthodes de prévention efficaces sont les mesures d'hygiène.

De plus, les perspectives de nouvel antibiotique efficace contre *N. gonorrhoeae* sont à peine meilleures que celles d'un vaccin. En effet, la seule molécule en étude clinique est le zoliflodacine, une spiropyrimidinétrone ciblant la topoisomérase de type II (figure 5). Il est développé exclusivement pour une utilisation contre *N. gonorrhoeae* par *Enthasis Therapeutics*.

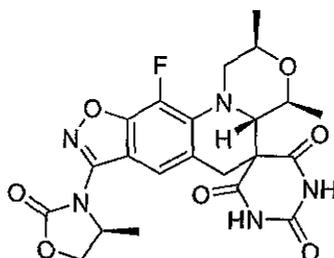


Figure 5. Structure chimique du zoliflodacine.

### 1.3.2 *Neisseria meningitidis*

*Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) est un agent pathogène exclusif à l'être humain, surpassant le seuil épidémiologique principalement en Afrique et en Asie avec 21649 nouveaux cas en 2015 en Afrique subsaharienne. Faisant partie de la flore normale du nasopharynx chez 5 à 10 % de la population adulte, cette bactérie peut cependant devenir pathogène en rejoignant la circulation systémique. Elle n'a jamais été isolée chez un autre animal que l'homme, probablement dû à son incapacité à utiliser d'autres sources de fer que la transferrine humaine. Elle est fatale dans 80 % des cas en l'absence de traitement et 15 % en cas de traitement. Elle résulte en de nombreux symptômes après rémission tels que la paralysie, surdité, déficience mentale et troubles épileptiques. Les principaux symptômes sont des abcès cérébraux, maux de tête, fièvre et constipation. Dans des cas suraigus, on constate une apparition de purpura. Le traitement de référence est la ciprofloxacine ou rifampicine.

À ce jour, elle démontre peu de résistance face aux traitements modernes. Cependant, son taux de mortalité en cas de traitement reste élevé, nécessitant d'accélérer les phases de diagnostic et de traitement. L'émergence d'une souche présentant de multiples résistances antibiotiques de *Neisseria meningitidis* n'est pas exclue par transfert horizontal entre deux espèces mais reste peu probable [42].

### 1.3.3 Proximité entre les espèces pathogènes et commensales

*N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* descendent toutes deux d'un ancêtre commun devenu pathogène et une forte proximité avec *N. lactamica* a été mise en évidence tel que montré à la figure 6 [43]. En effet, cette dernière possède 67 % des 127 gènes de virulence identifiés chez *N. meningitidis* [44]. Elle colonise avec *N. meningitidis* le nasopharynx humain et, pourtant, celle-ci n'est pas pathogène à l'exception de quelques cas chez des individus immunodéprimés [45], [46]. Cibler sa virulence impliquerait de trouver un

moyen d'appliquer une pression sélective sur une différence d'entre ces trois espèces. Le développement de thérapie anti-virulence contre *Neisseria meningitidis* est particulièrement pertinent. Elle pourrait permettre d'annihiler rapidement les effets toxiques de la maladie et d'offrir de meilleurs taux de rétablissement que les antibiothérapies classiques.

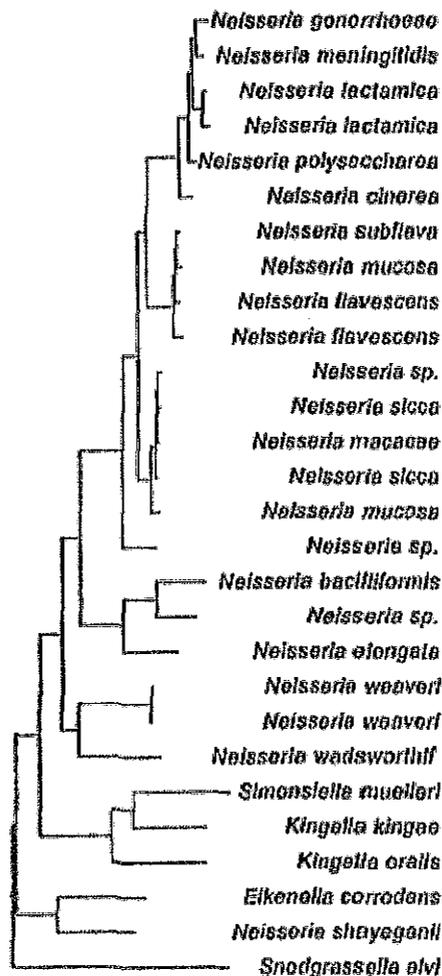
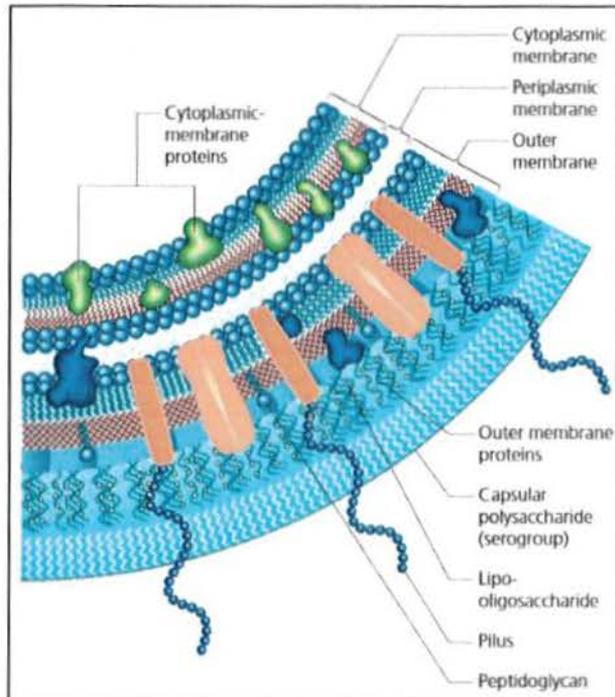


Figure 6. Arbre phylogénétique de la famille *Neisseria*. Tiré des travaux de Veyrier & al [47].

### 1.3.4 Rôle de l'enveloppe bactérienne dans la virulence

Les *Neisseria* sont toutes des bactéries à Gram négatif différenciables des bactéries à Gram positif par coloration de gram. Les membranes plasmiques ont pour rôle de filtrer toutes les molécules et les ions polaires, tandis que le peptidoglycane filtre les molécules de haut poids moléculaire et maintient la structure et la forme (coque, bacille...) de

l'ensemble de l'enveloppe face à la pression osmotique [48], [49]. En ce qui a trait à leur pathogénicité, c'est l'enveloppe bactérienne (figure 7) qui joue le rôle principal, étant donné qu'elle est le principal moyen d'interaction entre les bactéries et l'hôte. Les facteurs de virulence s'y retrouvent donc pour la majorité.



**Figure 7. Structure de l'enveloppe de *Neisseria meningitidis*. Tiré de Stephen et al [50].**

Chez les *Neisseria*, on retrouve différents facteurs de virulence possédant plusieurs particularités face au reste des bactéries. La capsule polysaccharidique est une différence présente chez *N. meningitidis*, qui lui permet une meilleure résistance face à la phagocytose ou bien la protège lors de la transmission aérienne d'un hôte à l'autre. La plupart des souches isolées d'individus sains sont souvent sans capsule mais les souches isolées de la circulation sanguine sont toujours avec capsule. Les lipopolysaccharides, chez la majorité des bactéries, sont constitués d'un lipide A, d'un cœur oligosaccharide et d'un polysaccharide O, couvrant 75 % de la surface de l'enveloppe [48], [51]. Les *Neisseria* pathogènes déploient des lipooligosaccharides (LOS), de plus petit poids moléculaire et ne possédant pas la répétition O-antigène [52]. Leur lipide A ancre le LOS dans la membrane interne. Le cœur oligosaccharidique est divisé en deux régions. Le domaine interne est hétérogène en raison de multiples substitutions de phosphoéthanolamine, glycine, glucose, acétate régulé par l'environnement [53]. Le

domaine externe est hautement variable en raison de fréquentes erreurs de réplication [53]. La sialyltransférase se sert de l'acide sialique de l'hôte afin de l'implanter dans le domaine terminal du LOS. Cette faculté lui permet d'exprimer plusieurs LOS simultanément ressemblant à ceux de certaines cellules humaines, permettant ainsi d'imiter les surfaces des cellules humaines et duper le système immunitaire [54]. Les lipoprotéines de surface sont utilisées par les bactéries à Gram négatif afin d'interagir avec leur environnement [55]. Chez les *Neisseria*, plusieurs ont des modes d'action spécifiques à des protéines humaines. Il existe une forte similarité entre les lipoprotéines de surface des pathogènes et de *N. lactamica*. Huit lipoprotéines sont retrouvées chez la famille *Neisseria* [56], l'ensemble d'entre elles ayant été retrouvées chez *N. meningitidis*. La *Factor H binding protein* (fHbp) n'est toutefois pas présente chez *N. gonorrhoeae* et *N. lactamica* [56].

## 1.4 L'anion tétraphénylborate

Le tétraphénylborate de sodium a récemment été décrit comme s'intégrant à une catégorie d'antimicrobiens à spectre très étroit et anti virulence contre les *Neisseria* pathogènes. Pour autant que nous le sachions, une propriété antimicrobienne n'a été signalée qu'à deux reprises au travers de brevets. La première est le sel tétraphénylborate de tétracycline décrit avec la même activité que la tétracycline seule [57]. La seconde décrit une grande variété de sels de bore et leurs applications en tant que liquide ionique antimicrobien de surface [58]. Ces deux descriptions n'apportent que peu d'évidences quant à une potentielle application thérapeutique. La section suivante intégrera une revue de littérature sur les molécules organoborées et leurs intérêts thérapeutiques les plus importants, l'activité anticancéreuse découlant de ce mécanisme qui apporte des éléments transposables à une application antimicrobienne. Pour terminer, une description des premiers travaux menés par les équipes de recherche des professeurs Castonguay et Veyrier sera présentée, démontrant le potentiel antibiotique sélectif de cet anion contre les pathogènes du genre *Neisseria*, découverte à la base de l'étude présentée dans ce mémoire.

### 1.4.1 Intérêt thérapeutique suscité par les dérivés organoborés

Le bore est naturellement présent sous forme d'acide borique existant de façon indissociable du borate en milieu aqueux (schéma 1). La première est une espèce non chargée trigonale plan et le second une forme anionique tétraédrique (schéma). Cette propriété unique à l'atome de bore intéresse grandement les chimistes médicaux, elle se retrouve sur les fonctions acides boroniques et benzoxaboroles et est hautement modulable.

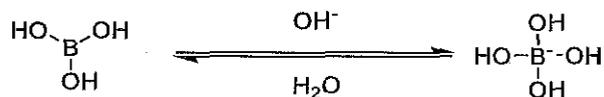
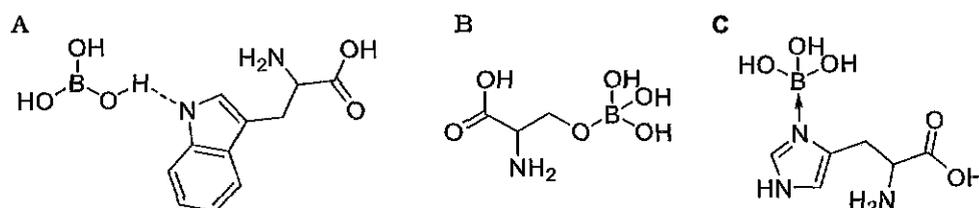


Schéma 1. Alternance forme trigonal plan (gauche) et tétraédrique (droite).

Les acides boroniques sont étudiés pour leurs interactions avec les cis 1,3 diols de carbohydrates comme senseurs de carbohydrates pour le diabète. Ces mêmes propriétés ont été suggérées comme traitement de virus possédant une enveloppe hautement glycosylée tel que le virus d'immunodéficience humaine [59]. Pour le reste des applications, ce sont de rares exceptions en lien avec des inhibiteurs protéiques. Trois

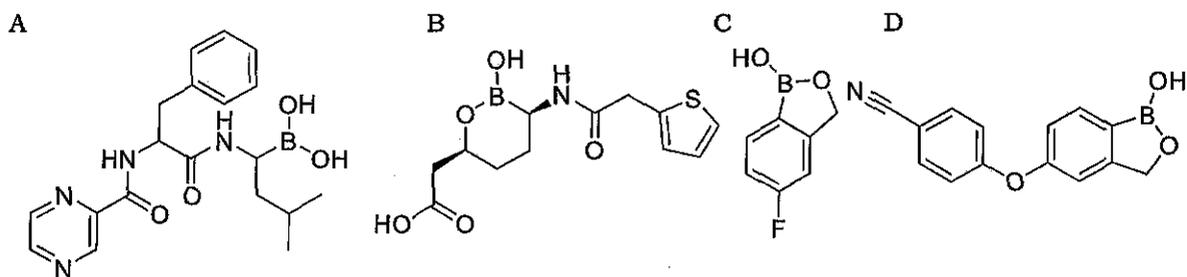
interactions de l'atome de bore sont connues en chimie médicinale (figure 8). L'hydrogène est capable d'accepter une liaison hydrogène (A), de participer réversiblement à une estérification avec un alcool (B) et est capable de participer à une liaison de coordination avec les doublets non liant des atomes d'azote (C). Ces trois interactions permettent d'augmenter l'affinité d'une structure chimique pour une protéine. Ces interactions permettent de renforcer l'affinité avec la cible et son action est parfois comparable à celle du groupement sulfonate faisant des acides boroniques et des benzoxaboroles des inhibiteurs protéiques par excellence. Ils ont permis le développement d'application anticancéreuse comme pour les maladies complexes et infectieuses.



**Figure 8. Illustration des interactions principales des composés organoborés. (A) Liaison hydrogène, (B) estérification et (C) coordination.**

Plusieurs molécules organoborées ont été mises sur le marché depuis 2003 (figure 9). Le bortézomib est utilisé pour traiter le myélome multiple et l'amylose AL [60], [61]. *Mycobacterium tuberculosis* inhibe la protéase caséinolytique (CLpP1P2) et le protéasome avec un  $IC_{50}$  de 1,6 et 0,8  $\mu\text{M}$  respectivement [62]. Son activité antibactérienne a aussi été démontrée avec sa plus petite concentration qui empêche la croissance de la bactérie (CMI) de 4  $\mu\text{M}$  et la plus faible concentration qui permet de tuer la bactérie (CMB) de 50  $\mu\text{M}$  [62]. Il inhibe également l'anhydrase carbonique, une cible thérapeutique prometteuse de quatre souches fongiques et les trois isoformes de *Mycobacterium tuberculosis* avec une affinité entre 1.12 et 11.30  $\mu\text{M}$  [63]. Le vaborbactam est un acide boronique intracyclique qui a été mis sur le marché pour les infections résistantes [64]. Il est utilisé en bithérapie avec une pénicilline, il inhibe la  $\beta$ -lactamase, responsable de la dégradation de l'antibiotique. Plus récemment, la découverte des dérivés de benzoxaborole s'est avérée être des structures puissantes et hautement modulables. Le tavaborole est utilisé pour traiter les onychomycoses en inhibant la leucyl-tRNA synthétase et le crisaborole est utilisé pour le traitement des dermatites et atopiques en prodiguant une action anti-inflammatoire en inhibant la phosphodiesterase 4B [65]. Le tavaborole a une bien meilleure affinité que les acides

boroniques avec l'anhydrase carbonique d'origine fongique 72 nM (*Candida glabrata*) et en possède moins avec les isoformes humaines I et II respectivement de 2015 et 462 nM [66], [67]. Plusieurs dérivés ont été rapportés pour leur activité antiparasitaire avec un LC<sub>50</sub> jusqu'à 150 nM [68] sur *Trypanosoma brucei*, des chalcones hybrides benzoxaboroles avec un LC<sub>50</sub> de l'ordre de 300 ng.ml<sup>-1</sup> [69]. Certaines structures fluorées ont aussi été menées jusqu'en essais cliniques pour cette même application [70]. Des structures silicées, les benzosiloxaboroles ont une plus grande affinité avec les diols à pH neutre et une activité sur certaines souches fongiques a été rapportée [71].



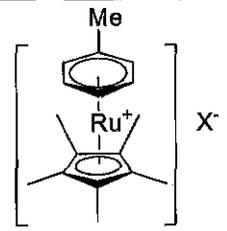
**Figure 9.** Structure chimique du (A) bortézomib, (B) vaborbactam, (C) tavaborole (C) et du (D) crisaborole.

#### 1.4.2 Intérêts thérapeutiques de l'anion tétraphénylborate

Le tétraphénylborate est une structure qui, *a priori*, ne possède pas les propriétés d'interactions des acides boroniques et benzoxaboroles. Toutefois, diverses activités thérapeutiques ont été rapportées. C'est un sel anion organique apolaire et faiblement coordonnant, c'est-à-dire qu'il interagit peu avec les cations. Les premiers anions faiblement coordonnants étudiés sont le tétrafluoroborate, l'hexafluorophosphate et le perchlorate. Ils ont permis la stabilisation et l'étude de nombreux électrophiles organométalliques. Par la suite, des borates fluorés « BARF » incluant plusieurs atomes de fluor dans leurs structures sont les anions les moins coordonnants connus. Pour le tétraphénylborate, cette propriété lui permet des applications en chimie analytique pour sa capacité à précipiter sélectivement en milieu aqueux le césium, le rubidium, l'ammonium et le potassium [72]. Il confère une plus grande lipophilie aux sels que les anions halogénés ou que le tétrafluoroborate.

La première utilisation de l'anion tétraphénylborate à visée thérapeutique est publiée en 2008. Des sels de ruthénium contenant différents contre-ions ont été testés sur quatre lignées cellulaires, MCF7, MDA-MB-231, MM96L et NFF. Les complexes de ruthénium sont grandement étudiés dans des applications anticancéreuses et plusieurs d'entre eux

ont fait l'objet d'essais cliniques comme NAMI-A, KPI019 et RAPTA-C. Le ruthénium possède de nombreux avantages contrairement aux molécules organiques ou aux organoplatinés. On peut, par exemple, citer des états d'oxydation et des géométries allouant un contrôle des propriétés stériques et électroniques différents de ces autres molécules. La vitesse d'échange de ces ligands est contrôlable de l'ordre de la minute à plusieurs heures. Certains complexes sont activables par réduction dans l'environnement des cellules cancéreuses. Dans cette étude, 12 sels de ruthénium différents contenant trois anions différents ont été préparés afin d'étudier leurs influences sur les propriétés anticancéreuses (tableau 1). Le sel d'ammonium du tétraphénylborate a été testé à de fortes concentrations et ne démontre pas de toxicité jusqu'à 1000  $\mu\text{M}$  sur chacune des lignées cellulaires [73]. Les sels comportant le borate se sont avérés systématiquement deux à six fois plus toxiques que ceux contenant les ions  $\text{PF}_6$  et  $\text{BF}_4$ . Cette variation de contre-ion démontre pour la première fois que le tétraphénylborate est capable d'initier un mécanisme cytotoxique sur une cellule humaine saine ou cancéreuse pour atteindre un niveau de toxicité proche du cisplatine. De plus, le facteur de sélectivité a tendance à s'accroître dans la majeure partie des expériences et reste toujours plus haut que le cisplatine.

	<b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>				<b>Facteur de sélectivité (IC<sub>50</sub> NFF)/ (IC<sub>50</sub> Cancer cell line)</b>		
	MCF7	MDA- MB-231	MM96L	NFF	MCF7	MDA- MB-231	MM96-L
X = $\text{BF}_4$	8.55	13.7	4.62	161	18.8	11.8	34.9
X = $\text{PF}_6$	13.6	20.8	4.53	159	11.7	7.64	35.1
X = $\text{BPh}_4$	4.99	5.20	2.28	92.2	18.5	17.7	40.4
Cisplatine	1.80	NA	1.70	3.30	1.83	NA	1.94

**Tableau 1.** Activité de trois sels de ruthénium sur les lignées cellulaires, MCF7 (adénocarcinome du sein métastatique), MDA-MB-231 (adénocarcinome du sein métastatique), MM96L (mélanome lymphatique) et NFF (tissu osseux sain).

Notre laboratoire a récemment eu l'occasion de confirmer cette observation sur certains composés de ruthénium étudiés pour leur capacité anticancéreuse sur les modèles MCF-7 et T47D [74], [75]. Les complexes testés se sont avérés plus toxiques en présence de l'anion tétraphénylborate avec une  $\text{IC}_{50}$  de l'ordre du cisplatine. Un co-traitement entre le sel de  $\text{BF}_4$  et le  $\text{NaBPh}_4$  à 25  $\mu\text{M}$  mène à une activité non différente de  $[\text{BPh}_4]$  et

l'accumulation de ruthénium entre le sel de BF<sub>4</sub> et de BPh<sub>4</sub> ne mène pas à une accumulation de ruthénium significativement différente. Ce résultat montre, d'une part, que le tétraphénylborate ne nécessite pas exclusivement un sel comprenant un cation actif ainsi qu'un anion sensibilisant mais qu'ils peuvent exercer leur action en provenant de deux sels différents. D'autre part, l'internalisation de ruthénium dans la cellule n'est pas significativement plus élevée, ce qui exclut l'hypothèse d'une entrée accrue à l'intérieur de la cellule afin d'expliquer l'activité observée.

IC <sub>50</sub> (μM)	Ru <sub>1</sub> BF <sub>4</sub>	Ru <sub>1</sub> PF <sub>6</sub>	Ru <sub>1</sub> BPh <sub>4</sub>	Ru <sub>2</sub> BF <sub>4</sub>	Ru <sub>2</sub> BPh <sub>4</sub>	Cisplatine
MCF7	>100	>100	28 (±3)	>150	139.5	21 (±1)
T47D	>100	>100	17 (±2)	>150	53.5	>100

Tableau 2. Activité de trois sels de ruthénium sur les lignées cellulaires MCF7 (adénocarcinome du sein métastatique) et T47D (carcinome canalaire).

### 1.4.3 Interactions du tétraphénylborate avec les membranes biologiques

L'explication la plus probable quant à son activité biologique est son interaction singulière avec les membranes biologiques possédant un potentiel électrique. L'anion tétraphénylborate a contribué à diverses découvertes sur le fonctionnement de plusieurs membranes biologiques. Il a été montré, en 1970, que le tétraphénylborate était capable de diffuser au travers des membranes de particules submitochondriques. Le transport est ATP dépendant, poussé par la différence de potentiels de part et d'autre de la membrane [76]. Le passage de la membrane de la mitochondrie ne s'effectue cependant pas spontanément et l'anion s'accumulerait à la surface de la mitochondrie. À plus haute concentration, des dysfonctions électriques ont été mesurées, l'auteur présume une interaction accrue avec l'ammonium de la sphingosine [77]. La même expérience réalisée sur le chromatophore de *Rhodospirillum rubrum* montre le même phénomène que les submitochondries [78].

Cette propriété a été mise au profit d'une méthode de sensibilisation des mitochondries à des molécules toxiques. Le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) est une molécule convertie en 1-méthyl-4-phényl pyridinium dans le cerveau (MPP<sup>+</sup>)

(figure 10). C'est un inhibiteur de la phosphorylation oxydative, réduisant le taux d'ATP et déclenchant la mort cellulaire. Il était utilisé comme herbicide de la famille des Paraquat. Ces deux molécules ont permis de nombreuses avancées dans la compréhension et le développement de traitements pour la maladie de parkinson entre 1975 et 1995. Certaines études ont démontré des effets synergétiques intéressants avec l'anion tétraphénylborate. L'IC<sub>50</sub> d'inhibition de la respiration mitochondriale du MPP<sup>+</sup> est décrit de l'ordre de 10 µM est de 1.5 µM avec l'ajout de 10 µM de tétraphénylborate [79]. L'accumulation accrue du MPP<sup>+</sup> est aussi rapportée dans les mitochondries en présence de l'anion [79]. Cette sensibilisation se confirme sur la lignée neuroblastome x gliomes hybrides NG108-15. En co-incubant avec 100 µM du borate, il est observé une baisse de la production d'ATP avec un EC<sub>50</sub>=0.5 µM.

Le mécanisme proposé est le suivant : l'anion tétraphénylborate génère une augmentation du potentiel de surface des mitochondries. Ceci induit l'augmentation de la liaison du MPP<sup>+</sup> à la surface des mitochondries [79]. Le transport au travers de la membrane est assuré par le tétraphénylborate, capable de circuler avec et sans le MPP<sup>+</sup> en contre-ion [80]. L'anion servirait de transporteur de cation au travers de la membrane en formant une paire d'ions.

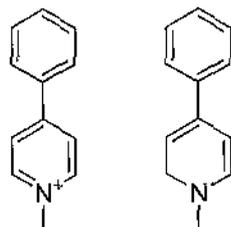


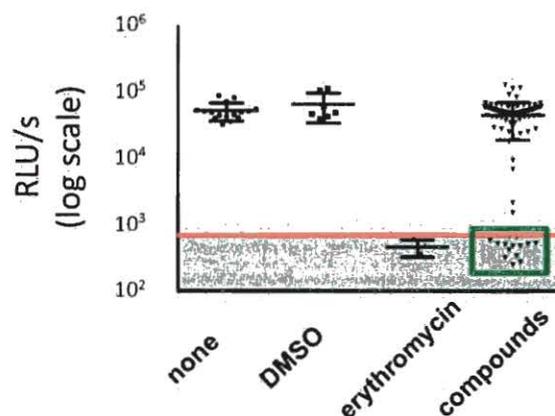
Figure 10. Formule semi développée du MPP<sup>+</sup> (gauche) et MPTP (droite).

#### 1.1.4 Activité biologique : un composé bactéricide sélectif des espèces pathogènes du genre *Neisseria*

##### Criblage d'une librairie de composés

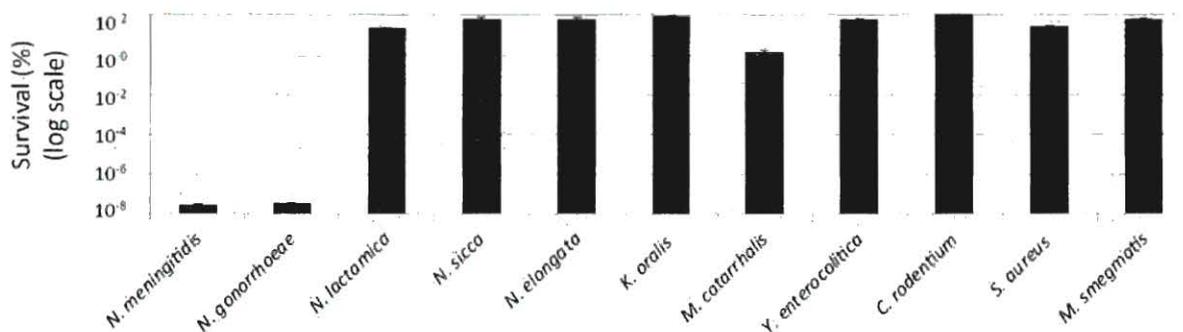
Dans l'objectif d'identifier de nouvelles opportunités de traitement, les professeurs Veyrier et Castonguay ont réalisé un criblage d'une base de données de produits chimiques de 2500 composés par luminométrie [81], [82]. Dix-sept composés se sont révélés actifs contre *N. meningitidis* (figure 11). Quatre d'entre eux comportaient un anion tétraphénylborate. Les complexes organométalliques Ru<sub>1</sub>BPh<sub>4</sub> et Ru<sub>2</sub>BPh<sub>4</sub> se sont révélés avoir une activité bactériostatique chez *N. meningitidis* tandis que les sels comportant le tétrafluorure se sont avérés inactifs. Les complexes de ruthénium ne

semblent donc pas participer à l'activité du sel. Des informations complémentaires sur la technique de luminométrie sont fournies dans la section 1.6.2.



**Figure 11. Criblage d'une librairie de molécules pour l'identification de composés ayant la capacité d'inhiber la croissance de *N. meningitidis* par luminométrie.** Chaque point représente une des molécules testées et RLU/s représente l'unité relative de luminescence par seconde [81].

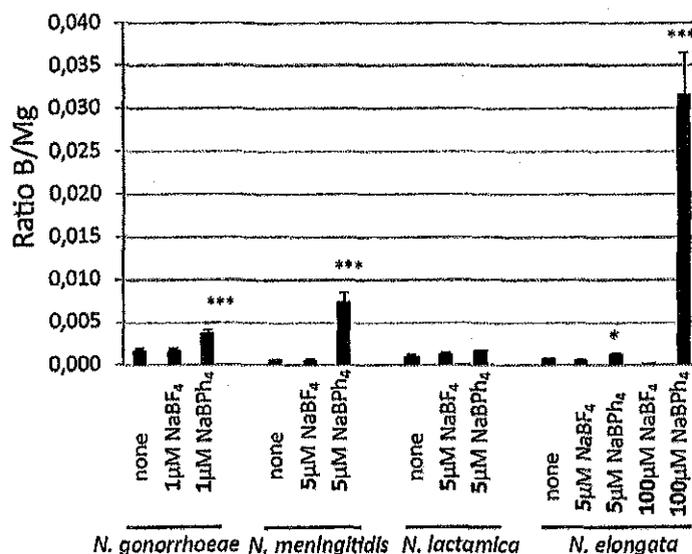
Le tétraphénylborate de sodium a démontré avoir une activité bactéricide exclusive aux *Neisseria* pathogènes. Une activité bactéricide du composé est constatée chez les espèces pathogènes dès 10  $\mu$ M, or, une faible activité est constatée à 200  $\mu$ M chez *N. lactamica* et *N. elongata* (figure 12). Le cation semble ne pas participer à l'activité. Les sels de sodium, de potassium et d'ammonium, n'ont pas démontré de différences d'activité.



**Figure 12. Pourcentage de survie d'un panel d'espèces** (DO600 = 0,01) exposées pendant trois heures à une concentration de 50  $\mu$ M de NaBPh<sub>4</sub>. Chaque barre représente la moyenne de trois mesures indépendantes [81].

L'internalisation du bore dans les bactéries a été mesurée par spectrométrie de masse à couplage inductif chez *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. elongata* et *N. lactamica*. Des concentrations sublétales ont été sélectionnées (1 et 5  $\mu$ M) et le sodium tétrafluoroborate

a été choisi comme contrôle négatif. À ces concentrations, une accumulation accrue chez les pathogènes fut observée et aucune chez les non pathogènes (voir figure 13). À 100  $\mu\text{M}$ , une augmentation de la quantité de bore fut observée chez *N. elongata* sans pour autant que le tétraphénylborate de sodium ne démontre d'activité antibactérienne à ces concentrations.



**Figure 13. Présence accrue de bore chez les bactéries pathogènes traitées avec le NaBPh<sub>4</sub> déterminé par ICP-MS [81].**

Afin de mieux comprendre son action, l'étudiante à la maîtrise Eve Bernet a réalisé une suite d'expériences afin de caractériser la réponse de la bactérie face au NaBPh<sub>4</sub>. Cette étude a consisté en l'isolation et l'investigation des caractéristiques de mutants résistants.

### Réponse de la bactérie face au stress

Une étude de transcriptomique a été réalisée après six heures de contact avec 7  $\mu\text{M}$  de NaBPh<sub>4</sub>. Les séquences ARN ont permis d'identifier deux gènes sous-exprimés et six surexprimés étant statistiquement significatifs, mais pas biologiquement. Il s'agissait de gènes codant pour un *ArsR family transcriptional regulator* et un *metal ABC transporter*. Ces gènes ont été vérifiés par qRT-PCR et n'ont pas montré d'expressions significativement différentes.

### **Étude de l'hydrophobicité de la membrane**

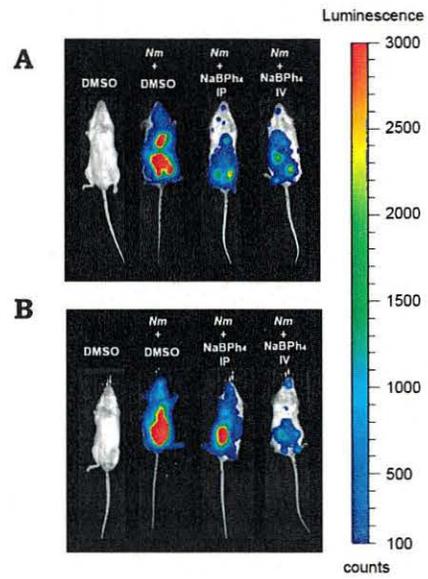
Il a été supposé que les *Neisseria* pathogènes auraient pu avoir une membrane de lipophilie différente leur permettant de filtrer plus ou moins de molécules modérément lipophiles tel que l'anion tétraphénylborate. Pour ce faire, le test MATH [83], [84] a été réalisé afin de caractériser la lipophilie des membranes de bactéries. Il n'a pas été possible de détecter de différence de lipophilie entre chaque espèce bactérienne.

### **Caractérisation génomique des clones résistants**

Il semble donc que la bactérie ne réagisse pas au stress provoqué par le NaBPh<sub>4</sub> par une modification d'expression des gènes aux concentrations testées. Une étude génomique sur des clones résistants a été réalisée. Quatre clones de *N. meningitidis* présentant une CMI de 18.75 à 37.5 µM contre 4.7 pour la souche sauvage ont été séquencés. Un total de 11 gènes mutés a été identifié chez les clones mutants, dont dix impliqués dans la membrane de la bactérie, le dernier étant seulement hypothétique. Ils ont identifié des gènes régulant les propriétés hydrophiles de la membrane, la synthèse du peptidoglycane, la glycosylation et l'expression des gènes des pili, le transport d'acide gras, les porines, l'acquisition de fer, la biosynthèse des LOS et des protéines impliquées dans l'absorption du fer, du nickel et de la vitamine B<sub>12</sub>.

### **Traitement de souris infectées par *N. meningitidis***

Le NaBPh<sub>4</sub> a été testé sur le modèle d'infection murin de *N. meningitidis* coinfecté avec le virus de la grippe. Le NaBPh<sub>4</sub> est administré par voie intrapéritonéale (IP) ou bien intraveineuse (IV) en une seule injection de 700 ng. L'infection est nettement réduite après seulement 24 heures (figure 14). Les souris non infectées n'ont pas démontré de signe de toxicité, et cela 15 jours après l'injection. De plus, les clones résistants se sont montrés moins virulents avec un modèle de septicémie murin. Cette dernière information démontre le haut potentiel des antibiotiques sélectifs décrits à la section 1.2.



**Figure 14.** Souris infectées par (A) *Neisseria meningitidis* seulement et (B) coinfectées avec le virus de la grippe, puis traitées avec une dose de tétraphénylborate de sodium [81].

## 1.5 Synthèse et réactivité des borates

Le tétraphénylborate est généralement synthétisé par l'addition d'un réactif de Grignard sur un triester borate, tétrafluoroborate [85], ou bien du trifluoroborate [86], [87] (schéma 2). Plusieurs autres organométalliques fortement réactifs ont pu être décrits tels que les organopotassiques, organosodiques et organolithiens. Le cation est sélectionné avec un traitement de la réaction avec une solution aqueuse de carbonate. Les choix de réactifs changent peu les résultats, offrant tous des rendements supérieurs à 90 %. Cependant, une faible diversité de structures est possible due aux faibles tolérances des organométalliques vis-à-vis d'une majorité des fonctions chimiques intéressantes existantes, tels que les alcools, amines ou cétones. Cependant, le nitrile, alcane, nitro et fluor sont compatibles avec la nature hautement nucléophile des organométalliques intéressants pour le design de nouveaux composés actifs. La famille la plus étudiée est celle des fluoroborates. Décrits pour la première fois par Kobayashi [88], usuellement abrégés  $\text{Bar}^{\text{F}_4}$ , BARF ou Kobayashi anions, ceux-ci peuvent être purifiés et séchés par cristallisation avec des mélanges pentane-éther diéthylique [89].

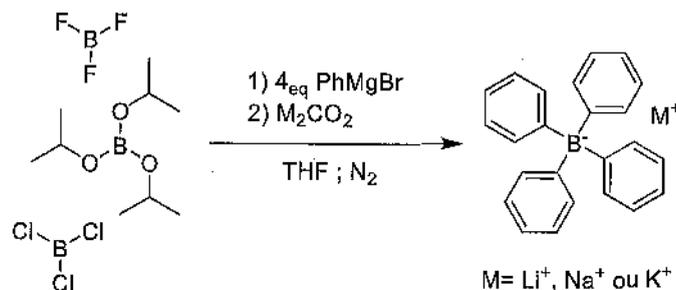
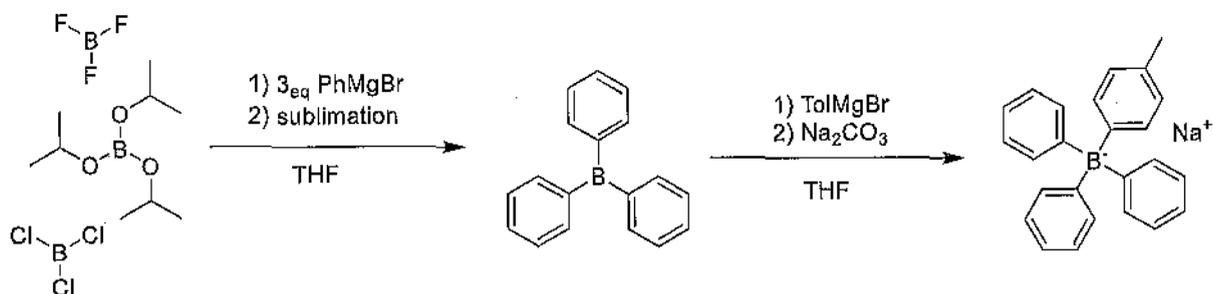


Schéma 2. Voie de synthèse générale de l'anion tétraphénylborate.

### 1.5.1 Préparation de borate possédant des groupements hétérogènes

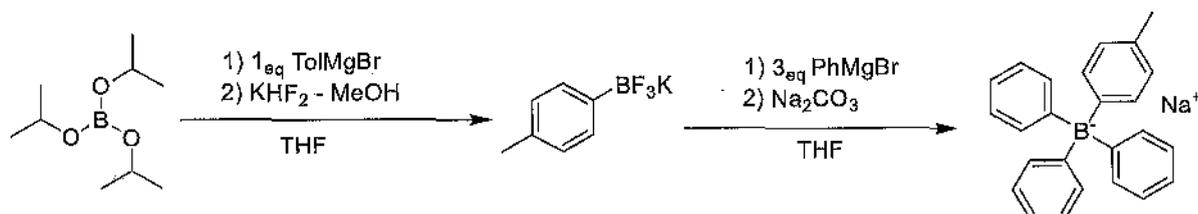
Il est aussi possible d'obtenir des fonctionnalisations hétérogènes. Les premières sont les groupes 3-1, majoritairement préparés depuis le triorgano borane correspondant (schéma 3). L'accès le plus simple aux triorganoboranes est habituellement l'hydroboration de l'alcane correspondant avec le  $\text{BH}_3$  étherate. Cette réaction est cependant impossible pour l'ajout de groupements aromatiques, l'utilisation de réactifs d'organométalliques est alors plus adaptée [90]. Ils sont préparés dans le toluène, l'éther diéthylique ou bien le THF depuis le trifluorure de bore, le trichlorure de bore ou bien les triesters borates. L'ordre de réactivité est généralement le suivant :  $\text{K}, \text{Na} > \text{Li} > \text{Mg} > \text{Zn}; \text{Cd}$  [91]. Les triorganoboranes qui ne sont pas encombrés s'avèrent

particulièrement instables, s'oxydant en présence d'air et ayant parfois besoin de multiples étapes de sublimation afin d'être purifiés [92], [93]. Ces étapes de purification supplémentaires rendent la préparation du triphénylborane plus complexe et plus onéreuse.



**Schéma 3. Préparation du tolyltriphénylborate par l'addition d'un réactif de Grignard sur le triphénylborane.**

Une seconde possibilité serait la synthèse d'un sel de potassium trifluoroborate en une seule étape depuis un ester de bore, possible par la formation *in situ* d'un acide boronique avec son traitement par un sel, un réactif de Grignard approprié et de bifluorure de potassium (schéma 4). Dans une seconde étape, le borate souhaité pourrait être synthétisé par l'addition de trois à quatre équivalents d'un réactif de Grignard sur le potassium trifluoroborate. Le principal inconvénient de cette voie de synthèse est l'utilisation du bifluorure de potassium qui est dangereux, pouvant causer de sévères brûlures sur la peau.



**Schéma 4. Préparation du tolyltriphénylborate par l'addition de 3 eq de réactif de Grignard sur le tolyltrifluoroborate de potassium.**

La dernière possibilité serait de suivre une procédure publiée en 2002 [85], [94]. L'addition successive d'un ou deux équivalents d'un fluoro aryle d'organo-magnésium suivie de l'addition du phényle après un retour à température ambiante mènerait aux borates 3-1 ou 2-2 sélectivement (schéma 5). L'auteur démontre que cette réaction ne fonctionne que dans l'éther diéthylique, le THF menant à un mélange de toutes les

combinaisons de borates. La même propriété avait été remarquée avec les organolithiens non aromatiques [90].

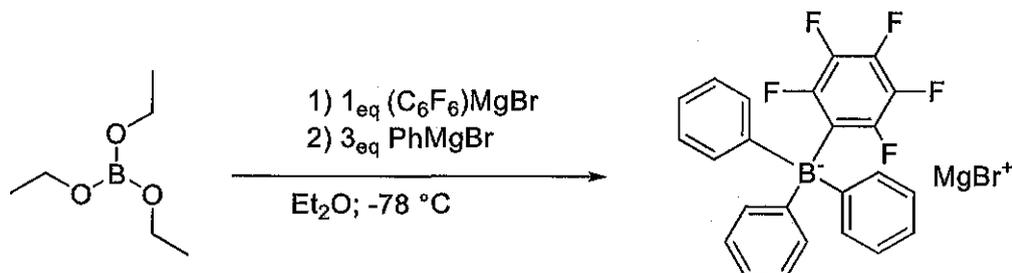


Schéma 5. Synthèse par addition successive sur le borate de triéthyle.

### 1.5.2 Introduction de fonction chimique sur un tétraarylborate

#### Halogénéation radicalaire

Les organoborates contenant un groupe tolyle sembleraient être suffisamment résistants aux radicaux libres pour ne pas être dégradés [95], [96]. Deux brevets rapportent la bromation de Wohl-Ziegler du tolyltriphénylborate avec le *N*-bromosuccinimide (NBS) et l'azobisisobutyronitrile (AIBN) afin d'initier la réaction [97], [98] (schéma 6). Des rendements de 80 % sont décrits après 8 heures de réaction à 80 °C. De plus, ce même brevet décrit la susceptibilité de cette nouvelle fonction aux substitutions nucléophiles avec plusieurs amines et phosphines menant à la formation du zwitterion correspondant avec des rendements de plus de 90 %.

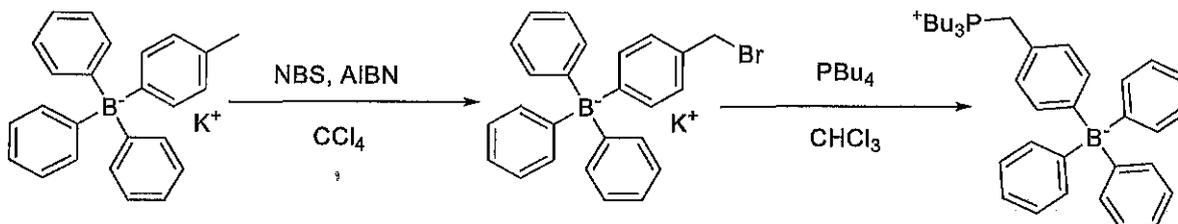


Schéma 6. Exemple de la fonctionnalisation d'un motif tétraarylborate en deux étapes : bromation radicalaire suivie d'une substitution nucléophile.

Cette structure et la démonstration de sa susceptibilité pourraient être une voie d'accès à des fonctionnalisations intéressantes tels que les alcynes et azotures particulièrement utiles pour leur accès à la cycloaddition de Huisgen 1,3 dipolaire [99]. On peut aussi noter la possibilité d'accès à une variété de fonctions réactives en conditions douces tels que les amines, thiols et alcools.

## 1.6 Modèles de caractérisation physico-chimique et d'évaluation toxicologique retenus pour l'étude

Il existe une très grande variété de modèles pharmacologiques permettant de définir les profils toxicologiques d'une molécule. Les propriétés physico-chimiques dont la lipophilie ont préalablement été caractérisées afin de s'assurer que les molécules sélectionnées représentent une gamme appropriée à des fins de comparaison. Pour définir l'efficacité de nos molécules, l'essai de luciférase sera utilisé. La toxicité sera définie sur modèles *ex vivo* et *in vivo*.

### 1.6.1 Propriétés physico-chimiques

Le rôle de la lipophilie est connu depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle [100], [101]. Plusieurs moyens permettent de modéliser le concept de lipophilie tels que : le dénombrement des fonctions chimiques, les paramètres de Hildebrand ou bien celui de Hansen. Cependant, le modèle le plus accepté, dont les bases de données sont les plus grandes et l'outil de prédiction le plus efficace, est le coefficient de partage entre une phase d'octanol et une phase d'eau (équation 1).

$$\text{Log}(P) = \text{Log}_{k_{ow}} = \text{Log}\left(\frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{eau}}}\right)$$

Équation 1. Calcul de la valeur Log(P).

Une revue particulièrement influente a permis de définir cinq règles permettant d'obtenir une absorption et une perméation membranaire optimale [102]. Ces règles décrivent un Log(P) d'un maximum de cinq. Une étude plus complète a permis de mieux définir la relation entre le Log(P) et les chances d'obtenir des résultats fructueux lors d'expériences pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Cet intervalle de Log (P) est devenu 0,75 – 3,25 [103]. Des méthodes par comparaison des temps de rétention en chromatographie à haute performance [104] ou bien par calcul théorique [105] permettent d'obtenir cette valeur. Cependant, elles s'avèrent moins sensibles et nécessitent de connaître le Log(P) réel de composés similaires. Dans le cas des borates, ils n'ont pas d'analogues dans les bases de données et devront être testés par la méthode universelle du flacon agité [106], [107].

### 1.6.2 Détermination de la concentration minimum nécessaire pour inhiber le développement d'une bactérie

L'ATPmétrie est une technique de biologie moléculaire basée sur une réaction de bioluminescence entre l'adénosine triphosphate (ATP), le magnésium, l'oxygène et la luciférase, une enzyme de la famille des monooxygénases ATP-dépendante. La présence d'ATP étant strictement requise à la présence d'un organisme vivant, ceci a donné lieu à de nombreuses méthodes afin de quantifier la présence de bactéries [108]. Cette méthode a démontré avoir une justesse supérieure aux techniques de comptage et équivalente à la cytométrie en flux [109].

Une méthode de luminométrie vise à transformer une bactérie, sur laquelle on souhaite réaliser l'expérience en insérant l'opéron *luxCDABE*. Celui-ci contient l'ensemble du système de bioluminescence de *V. harveyi* [110], permettant ainsi l'obtention de bioluminescence complètement indépendante, plus simple, rapide et utilisable en temps réel [111]. Une souche de *N. meningitidis* comportant le promoteur traité avec une molécule bioactive émet une quantité de lumière variable en fonction de la croissance de la bactérie, permettant ainsi de déterminer la concentration minimum inhibitrice (figure 15).

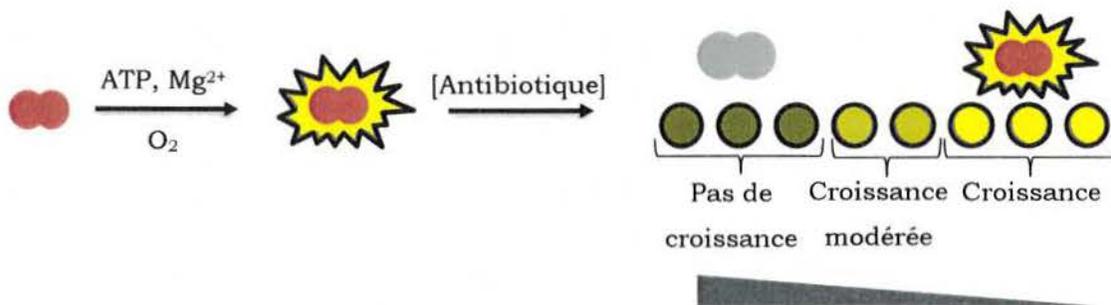


Figure 15. Représentation du fonctionnement de l'expérience de luminométrie.

### 1.6.3 Essais de cytotoxicité *ex vivo* sur l'érythrocyte humain

Les érythrocytes communément appelés globules rouges sont les cellules du sang chargées du transport de l'oxygène. La membrane des cellules est composée d'environ 20 % d'eau, 40 % de protéines, et 35 % de lipides [112]. Elles prennent une forme de disque capable de changer réversiblement de forme sous l'effet d'un stress environnemental. C'est un modèle de choix pour évaluer la toxicité d'une molécule en développement vis-à-vis des structures membranaires. En effet, les érythrocytes ne

contiennent pas d'ADN et la majeure partie des organelles sont absentes du milieu intracellulaire (mitochondrie et réticulum endoplasmique) [113], [114]. Cependant, ils possèdent une structure membranaire complète composée de trois principales catégories de protéines. Le cytosquelette est composé des spectrines, actines et protéines 4.1, les protéines membranaires intégrales et les protéines à ancrage lipidique. De plus, la facilité d'accès aux érythrocytes humains et leur manipulation rendent le modèle particulièrement intéressant pour de premières investigations de toxicité. C'est aussi une expérience essentielle pour assurer la sécurité d'un médicament et permet d'adapter la concentration d'injection lors des premiers essais *in vivo* sur les modèles de mammifères. Lors de l'apoptose des érythrocytes (eryptose), ils libèrent l'hémoglobine qu'ils contenaient. Ainsi, la mortalité est mesurée par spectrométrie visible entre 530 et 560 nm. Lors de l'éryptose, il y a activation du *Calcium-activated potassium channel* et permet de ce fait sa mesure grâce à la concentration intracellulaire de calcium.

#### **1.6.4 Essais de toxicité *in vivo***

Les modèles animaux de poissons en recherche biomédicale ont de nombreux avantages comparés aux modèles murins. Ils font partie des vertébrés et possèdent la majeure partie des organes et tissus de mammifères (excepté mamelle, prostate et poumon). Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) [115] est une espèce de poisson d'eau douce de la famille des Cyprinidés. Ces poissons ont une période de développement rapide : trois jours après fertilisation, ils possèdent déjà la majeure partie de leur morphologie adulte [116]. Le poisson zèbre possède de nombreux avantages par rapport aux modèles mammifères classiques, dont notamment un coût de maintenance et d'utilisation faible. C'est une espèce ovipare, donc avec fertilisation et développement embryonnaire externe, permettant la manutention à l'état embryonnaire aisée. Il a une des meilleures clarté optique grâce à laquelle de nombreuses observations visuelles peuvent être réalisées. L'utilisation de marqueur fluorescent est aussi aisée. Le poisson-zèbre possède une fonction hépatique [117] et endocrinienne [118] comparable à l'être humain. Il a 71.4 % de gènes orthologues à l'homme [119].

L'essai de toxicité embryonnaire du poisson-zèbre est particulièrement pertinent pour les criblages de toxicité aiguë, sous chronique et chronique. En effet, un très grand nombre de pesticides [120], [121], métaux lourds [122], perturbateurs endocriniens [123], ainsi que les complexes organométalliques [74], [124]–[127] et molécules

organiques [128], [129] à objectif médicinal ont fait l'objet d'essais sur le modèle de développement embryonnaire du poisson-zèbre. Ce modèle est aussi décrit comme plus sensible que le modèle *in vitro* MTT [130] en plus d'être capable de mesurer des effets secondaires. Une méta analyse est arrivée à la conclusion que le modèle délivre des informations sur la toxicité de manière équivalente aux modèles de rongeurs [131].

## 2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

---

L'objectif principal de ce projet est la synthèse, la caractérisation et l'évaluation du potentiel thérapeutique d'analogues de l'anion tétraphénylborate.

### 2.1 Hypothèses

- L'apport de modifications structurales mineures au tétraphénylborate de sodium modulera ses propriétés physico-chimiques, ce qui aura un effet sur son activité biologique.
- L'introduction d'un anion tétraphénylborate dans la structure d'un agent ayant des propriétés antibiotiques augmentera son potentiel antibactérien tout en conservant sa sélectivité.

### 2.2 Objectif spécifique 1 : Mise au point d'un protocole de boratisation

#### Raisonnement

La formation de la liaison carbone – bore est une étape critique pour chacune de nos voies de synthèse et peu documentée pour les groupements hétérogènes.

#### Méthodologie

La réaction la plus commune est l'addition d'un organolithien ou bien un organomagnésien sur le triphénylborate. La manipulation de ce type de réactifs est délicate et peut être réalisée de différentes manières. La synthèse depuis un fluoroborate est aussi envisageable pour éviter l'utilisation du triphénylborane, ainsi que la formation *in situ* du triphénylborane. Le premier objectif sera donc la mise au point de protocoles efficaces et robustes menant à des hétéroborates.

#### Alternative

Des synthèses alternatives pourront être envisagées comme par exemple l'exploration des organocuprates, organocadmiens et organozinciques.

### 2.3 Objectif spécifique 2 : Mise au point d'une librairie de nouveaux organoborates

#### Raisonnement

Plusieurs éléments semblent décrire un mécanisme d'action en lien avec la membrane des bactéries. L'ensemble des membranes de cellules étant composées de glyco et

phospho lipides ainsi que de protéines membranaires. Des modifications qui pourraient allouer une meilleure accumulation et affinité pour la membrane seront réalisées.

### **Méthodologie**

De nombreuses modifications faciles d'accès et compatibles avec un organomagnésien sont possibles. La substitution d'un hydrogène par un fluor ou un méthyle sont des modifications permettant de nouvelles interactions et d'augmenter la lipophilie. L'échange d'un phényle par une chaîne alcane de longueur variable pourrait permettre une interaction et/ou insertion particulière dans la membrane.

## **2.4 Objectif spécifique 3 : Détermination des propriétés physico-chimiques et du potentiel thérapeutique des analogues et intermédiaires de synthèse**

### **Raisonnement**

Les antibiotiques nécessitent des index thérapeutiques larges afin d'avoir un potentiel intéressant. Différents essais de toxicité et mesures de leurs propriétés physico-chimiques permettront de mettre en exergue la relation existante entre leur structure, leurs propriétés et leur activité biologique.

### **Méthodologie**

Une fois synthétisée, la lipophilie de chaque composé sera mesurée par *shaking flask method*. Pour ce qui est du potentiel thérapeutique, la CMI sera déterminée par luminescence. La toxicité et cytotoxicité de chaque composé seront déterminées respectivement sur globule rouge humain *ex vivo* et sur poisson zèbre *in vivo*.

## **2.5 Objectif spécifique 4 : Obtention d'une fonctionnalisation versatile**

### **Raisonnement**

La préparation de borates impose une faible compatibilité avec la plupart des fonctions chimiques. Une fois préparé, le borate est sensible aux acides, à l'hydrolyse et aux oxydants. Ceci limite l'accès à des structures innovantes. Il est donc important de trouver une voie d'accès à un groupement fonctionnel menant à des réactions intéressantes et variées afin de permettre la conception d'une plus grande variété de molécules.

### **Méthodologie**

Une voie de synthèse permettant l'introduction d'une amine, d'un azoture, d'une base de Schiff ou bien d'une position benzylique activée pourrait permettre de répondre à l'hypothèse 2.

### **Alternative**

L'introduction d'un iodure d'aryle ou d'un aldéhyde pourrait mener à des réactions intéressantes mais offre un nombre plus restreint de possibilités de couplage.

### **3 CHAPITRE 1 : ÉTUDE DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ D'ANALOGUES DU TETRAPHENYLBORATE POUR LE DESIGN D'ANTIMICROBIENS CONTRE LES SOUCHES PATHOGÈNES DE LA FAMILLE *NEISSERIA***

---

#### **Structure-activity relationship (SAR) study of tetraphenylborate derivatives for the design of antibiotics against *Neisseria* pathogens**

Robin Vidal, Eve Bernet, Golara Golbaghi, Mohammad Mehdi Haghdoost, Sébastien Houle, Shunmoogum A. Patten, Charles Dozois, Frédéric Veyrier,<sup>§</sup> Annie Castonguay<sup>§\*</sup>  
INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Québec, Canada

**Correspondance :** \* [annie.castonguay@iaf.inrs.ca](mailto:annie.castonguay@iaf.inrs.ca)

Contribution des auteurs (§ dénote une contribution égale)

**Robin Vidal** a réalisé le design, la synthèse, les essais de toxicité de chaque molécule (poissons zèbres et hémolyse) et a participé à l'écriture de l'article.

**Eve Bernet** a réalisé les tests antimicrobiens sur *N. meningitidis*.

**Golara Golbaghi** m'a appris à réaliser les tests sur poisson-zèbre, a participé à l'écriture de l'article, m'a conseillé et aidé tout au long du projet.

**Mohammad Mehdi Haghdoost** m'a aidé dans mes choix, conseillé sur les démarches et raisonnements appliqués tout au long du projet.

**Sébastien Houle** m'a assisté à la mise au point de l'expérience d'hémolyse et m'a appris à travailler dans un environnement de risque biologique de niveau 2.

**Shunmoogum A. Patten** nous a offert les poissons-zèbres et l'équipement pour réaliser l'expérience *in vivo*.

**Charles Dozois** nous a offert la possibilité de réaliser les expériences d'hémolyse dans son laboratoire.

**Frédéric Veyrier** nous a offert la réalisation des tests antimicrobiens.

**Annie Castonguay** a financé puis dirigé le projet de recherche.

L'article sera sans doute soumis au *Journal of Medicinal Chemistry* ou bien *Medicinal Chemistry Letters* (ACS)

## Abstract

There is a need to develop novel treatment against bacteria that are becoming increasingly resistant to currently used antibiotics. For instance, *Neisseria gonorrhoeae* vaccines are not yet operational and antibiotics are currently minimally preventing a devastating global epidemic. Now STD is worldwide considered as an emerging public health threat. We recently found that tetraphenylborate anion is highly effective at selectively inhibiting the growth and at killing *Neisseria gonorrhoea* and *Neisseria meningitidis*. The aim of our study is then to develop a new family of antibiotics with a comparable or higher activity but importantly, that do not alter the activity of other bacteria including nonpathogenic *Neisseria* that constitute the normal flora in healthy individuals and contribute to prevent other potential infections. Herein, we explored the effect of *i*) replacing one of the phenyl rings with an alkyl chain of 1-8 carbons, or *ii*) substituting the pattern around some of the aromatic rings with a methyl group or a fluoride, and how altering the position of more polar functional groups affected the antimicrobial activity. Results from this preliminary structure-activity study against the two pathogens of interest are reported, including the influence of their respective lipophilicity, the hemolytic innocuity on human red blood cells and the *in vivo* effect of selected candidates on the development of zebrafish embryos. Results emerging from this investigation could lead to the development of novel strategies for the design of highly effective treatments for these pathogens that are becoming serious human threats.

## Introduction

Due to the absence of SOS like system<sup>1</sup> and its natural competence, *Neisseria gonorrhoea* has a high potential to evolve in response to antibiotics pressure, and becomes resistant to virtually all antibiotic.<sup>2, 3</sup> There is a need to find new treatment options in the fight against *Neisseria gonorrhoea* that can preserve native flora and consequently, preventing any opportunist infection and positive action of commensal *Neisseria Lactamica*<sup>2</sup> during an infection. We recently discovered that a boron-based anion, tetraphenylborate (BPh<sub>4</sub><sup>-</sup>), does not only display a high bactericidal activity against the two above-mentioned pathogenic bacteria from the *Neisseria* genus (*N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae*, MIC = 15 μM), but also importantly, does not affect other bacteria of the *Neisseria* family found in the normal flora of healthy individuals.<sup>4, 5</sup> Notably, the use of increased doses

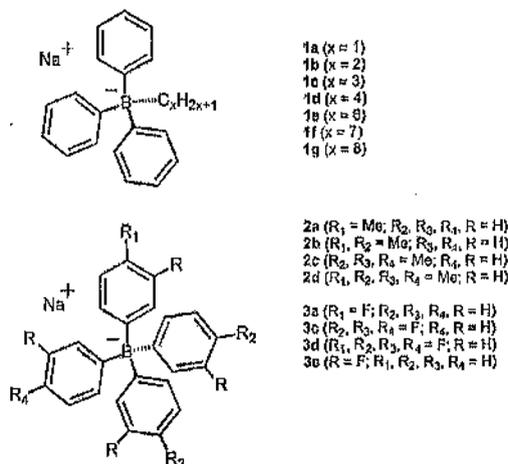
of  $\text{BPh}_4^-$  ( $\geq 5$  folds) did not similarly affect closely related species *N. lactamica*, more distant *Neisseriaceae* (such as *N. elongata* or *Kingella oralis*) nor even completely unrelated species such as *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium smegmatis* and *Staphylococcus aureus*. A few observations from our laboratories seem to support the hypothesis that the drug candidate target(s) would be located intracellularly or within the cell envelope. We found that i) an increased boron cellular uptake was observed after incubation of *N. meningitidis* with  $5 \mu\text{M}$  of  $\text{BPh}_4^-$ , as measured by ICP-MS, and that ii) an alteration in genes coding for membrane elements was displayed for mutants with slightly decreased susceptibility. Importantly, using a mouse model of infection, we demonstrated that  $\text{NaBPh}_4$  could be used as a curative treatment (single dose of  $0.7 \mu\text{g}$ ), reducing the bacterial burden during experimental septicemia. Although numerous boron-containing species were previously reported for their coveted biological activities,<sup>6-12</sup> the considerable activity combined to the narrow selectivity of the tetraphenylborate moiety towards these two devastating pathogens is unprecedented and of high importance from a therapeutic standpoint.

Although the tetraphenylborate anion was not previously reported for its antimicrobial properties, its biological activity is not completely unknown. It was previously shown that the anion can act as an uncompetitive  $\text{GABA}_a$  antagonist comparable to pregnenolone sulphate.<sup>4</sup> It was also reported to act as a sensitizer of mitochondria and cancerous cells in the presence of toxic cationic species.<sup>5-8</sup> It has been proposed that this anion could increase the surface potential of membranes and induce an enhancement of the binding of cationic species. It has also been hypothesized that tetraphenylborate could in some cases potentially form an ion pair with cationic species, which would result in a complex that could more efficiently cross cell membranes.<sup>13, 14</sup> It has been demonstrated that the tetraphenylborate anion does not itself induce a high in vitro cytotoxicity in human cancer cells, but that it could greatly enhance the cytotoxicity of cationic organoruthenium species when used in combination, which was not the case when tetrafluoroborate or hexafluorophosphate anions were instead used.<sup>15</sup> In the study we recently reported, we found that the antimicrobial activity of the tetraphenylborate anion could potentially be linked to its interaction with the pathogenic *Neisseria* membrane.<sup>4, 5</sup> Keeping in mind that lipophilicity generally plays a key role on most pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs<sup>16</sup> and that more lipophilic compounds are known to display enhanced affinities with bacterial lipid

bilayers,<sup>17</sup> this hypothesis prompted us to investigate the effect of varying the lipophilicity of the above-mentioned anion. We undertook the synthesis of a panel of tetraphenylborate derivatives, with the aim of identifying drug candidates with an enhanced antimicrobial activity, but also with a maintained selectivity towards the two pathogenic bacteria of interest. Herein, we report the structure-antimicrobial activity relationship study of tetraphenylborate anion derivatives of different lipophilicities, a preliminary account on their hemolytic activity, and the acute in vivo toxicity of selected candidates.

## Results and discussion

Based on the assumption that enhancing the lipophilicity of the tetraphenylborate backbone could lead to the development of analogues with an enhanced therapeutical value, two different types of modifications were then brought to the structure of the anion. Since it is well precedented that the introduction of alkyl chains, methyl groups and fluoride atoms can enhance the lipophilicity of various species,<sup>18</sup> we explored the effect of *i*) replacing one of the phenyl rings with an alkyl chain of 1-8 carbons, and *ii*) substituting the pattern around some of the aromatic rings with a methyl group or a fluoride atom (Scheme 1). Notably, C-F bonds are less susceptible to degradation due to the higher bond energy compared to C-H. Moreover, the introduction of electron-withdrawing groups on the *m*- or *p*- position of the phenyl rings of tetraphenylborate backbone previously proved to reduce its susceptibility to electrophilic attack, making it more stable under acidic conditions.<sup>19</sup>

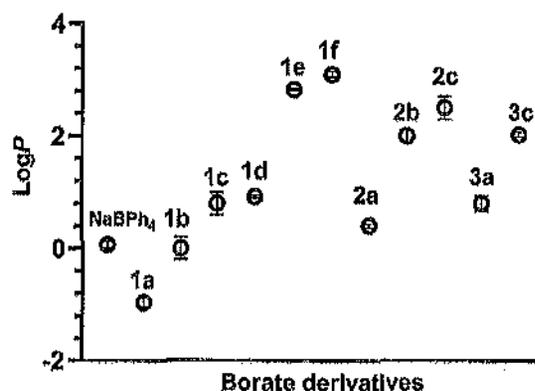


**Scheme 1.** Structure of the various borate derivatives reported in this study.

Compounds **1** were prepared by the addition of the corresponding Grignard reagent (except **1d** for which *n*BuLi was used) on a solution of triphenyl boron or B(O*i*Pr)<sub>3</sub> in THF. An alternative two-step route was also attempted, involving as a first step the reaction of the alkane with potassium trifluoroborate, but led to lower yields. For instance, this route was used for the preparation of **1e**, which was then obtained by the addition of an excess of phenylmagnesium bromide as a second step with a global yield of 25 %, compared to 48% when prepared with the first and more direct method. Compounds **1a**, **1b**, **1c**, and **2b** were synthesized from triphenyl boron by using commercially available Grignard solution and **2d** from *n*-BuLi solution.<sup>20</sup> The remaining compounds were prepared by the in-situ generation of an organomagnesium reagent via iodine activation.<sup>21</sup> Most of the borate derivatives were obtained in 20 to 50% yields with the exception of **2d**, which was obtained with a 77% yield. This higher yield could be explained by the absence of a biphenylbialkaneborate side-product, observed from the synthesis of most species **1a** – **1g**. The formation of this undesired compound could be most likely due to a difference in the nucleophilicity of the Grignard reagents. The various borates were initially isolated as THF-containing oils, even after the compounds were left under vacuum for several hours. Solvent-free borates could be isolated by precipitation with a dichloromethane/hexane mixture and dried under vacuum (25 Pa).<sup>22</sup> The addition of corresponding organomagnesium and organolithium of 4-fluorophenylbromide on diphenyldifluoride borate did not lead to the sodium bis(4-fluorophenyl)diphenyl borate in diethyl ether just like as tetrahydrofuran. All compounds were characterized by NMR spectroscopy and HR ESI-MS. Due to spin 3/2 and 3 respectively for <sup>11</sup>B and <sup>10</sup>B, <sup>1</sup>H NMR spectrums display specific two broad multiplet for proton in position *ortho*, **1** and **2**, at the same chemical shift for most cases, which confirms the presence and position of the boron atom within the structure. Due to <sup>13</sup>C-<sup>11</sup>B coupling, some 1:1:1:1 quartet signals corresponding to ipso carbons could not be observed in the <sup>13</sup>C spectra. However, the presence of signals corresponding to these carbons could be observed in the HMBC or HSQC 2D spectra. When observed, the coupling constants for this signal were found to be 48 – 50 Hz for aromatic carbons and 40 – 42 Hz for aliphatic carbons, values that are within the typical range for these signals, respectively.<sup>23</sup>

To evaluate the impact of the above-described modifications of the tetraphenylborate framework on lipophilicity, a Log*P* value was determined for all borate derivatives using

the shaking-flask method, commonly used for measuring the octanol-water partition coefficients ( $P$ ) of UV-active substrates.<sup>24, 25</sup> Most of the borate derivatives were found to display a higher lipophilicity than  $\text{NaBPh}_4$ , except for **1a** (lower) and **1b** (not found significantly different).  $\text{Log}P$  values for **1g**, **2d**, **3d**, **3e** were found higher than 4, and not determined due to the lack of accuracy of the results obtained from this technique for compounds of very high lipophilicity ( $\text{log}P > 4$ ). The expected trend of  $\text{log}P$  values was noted for each of the distinct families, increasing with the length of the alkyl chain<sup>26</sup> (**1**), the number of methyl<sup>27</sup> (**2**) and fluoride<sup>18</sup> (**3**) substituents on the phenyl rings.



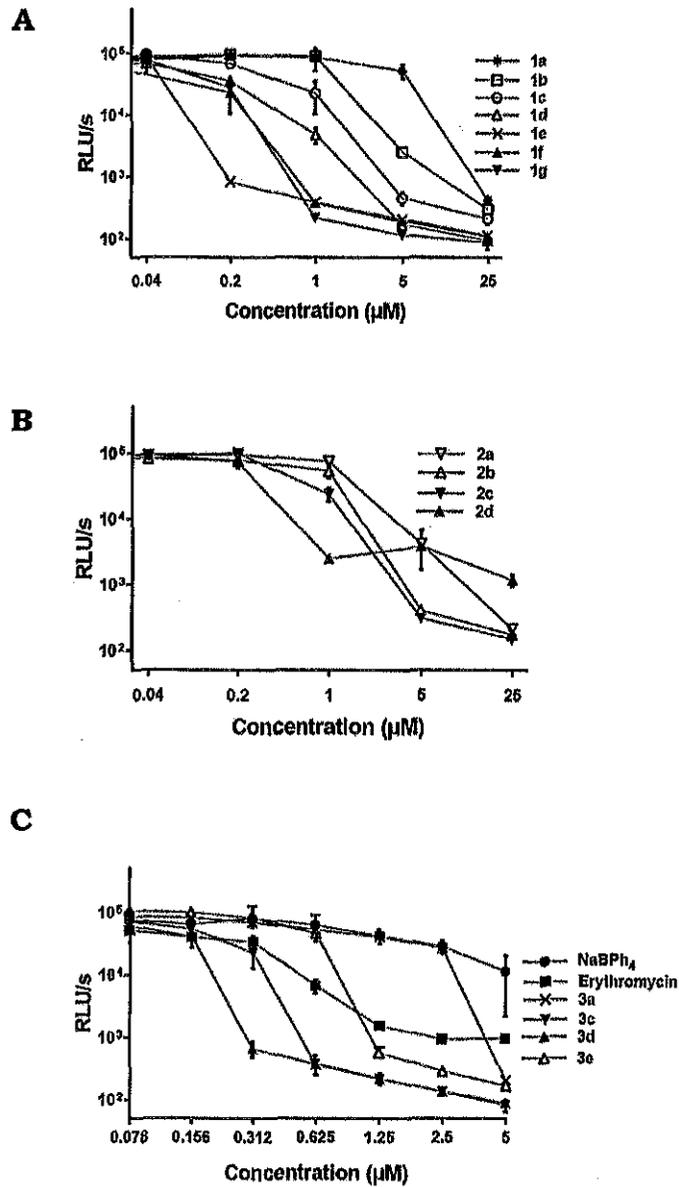
**Figure 1.** Lipophilicity of some of the borates derivatives reported in this study ( $\text{Log}P$  values) determined using the shaking-flask method.

Due to the poor water-solubility of some drug candidates, the preparation of stock solutions of various compounds in an organic solvent (usually DMSO) followed by their dilution in aqueous media is routinely achieved prior to testing their biological activity.  $\text{NaBPh}_4$  was not found to be problematic in terms of aqueous solubility, as UV-Vis spectra of milli-Q water solutions (after filtration) recorded at various concentrations suggested its solubility to be considerable up to at least 50 mM (Figure S1). However, as most of the analogous compounds reported in the current study display higher lipophilicities, we reasoned that evaluating the DMSO solubility of one of the most lipophilic compounds of the series, **1g**, would be advised. It is noteworthy that the borate derivatives reported here display a UV-Vis absorbance that overlaps with that of DMSO, preventing the use of this technique. Using NMR spectroscopy, we evaluated the solubility of **1g** to be considerable up to at least 9 mM (Figure S2). Consequently, lower concentrations were chosen for the preparation of stock solutions for all borates prior to their biological activity assessment. It is worth mentioning that  $\text{NaBPh}_4$  was found to

be highly stable in DMSO, as no apparent spectral alteration was observed by NMR (1 mM) for up to 10 weeks (Figure S3), indicating that DMSO could be a solvent of choice to prepare stock solutions of the borates for biological experiments.

### **Antimicrobial activity**

The *in vitro* growth inhibitory activity of the compounds was evaluated using a luminescent strain of *N. meningitidis*. Preliminary results are shown in Figure 2. It is interesting to note that most compounds were found to display a higher *in vitro* growth inhibitory activity than sodium tetraphenylborate against this pathogen. Moreover, the lipophilicity of the borate derivatives seems to play an important role in their antimicrobial activity. For instance, for compounds of group **1**, we can clearly note an increase in antimicrobial activity that is consistent with an increase of the length of the alkyl chain, from **1a** to **1e** (methyl to hexyl). It is difficult to assess if the high lipophilicity of **1f** and **1g** might potentially lead to solubility issues under the conditions of the assay, and this might be the reason why both derivatives were found to be less potent antimicrobials than **1e**. Compounds of group **3** were also found to display distinguished activities, especially in the case of the most lipophilic compounds **3c** and **3d**. It is interesting to note that switching the position of the fluoride atom on the phenyl ring from para- to meta- (in case of the tetra-substituted analogues) led to a decrease in antimicrobial activity (**3d** vs **3e**). Compound **3e** was then discarded from further studies.



**Figure 2. Effect of borate derivatives A) 1, B) 2 and C) 3 on the growth of *N. meningitidis* measured after 16 h using a luciferase-based assay.** For comparison purposes, results from treatment with solutions of NaBPh<sub>4</sub> and erythromycin are also displayed in C). RLU/s stands for relative lights units measured per seconds. DMSO (max 1%) was used as a control for each experiment. Data represent mean values  $\pm$  standard deviation from triplicates, from 2 or 3 independent experiments.

In order to assess if a lipophilicity increase had an effect on the selectivity of the derivatives for the two pathogens of interest, minimum bactericidal concentrations were determined for selected compounds of group **1** on different pathogenic and non pathogenic *Neisseria* (Table 1). Taken together, these preliminary results indicate that increasing the lipophilicity of the group **1** borate derivatives lead to a more important bactericidal activity, more specifically for the two pathogenic *Neisseria* bacteria *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae*. However, increasing the lipophilicity also led to a decrease in selectivity, especially in the case of *N. lactamica*, for which borate derivatives **1c**, **1d**, and **1g** display some bactericidal potential. In the near future, this study will be performed with other of the borate derivatives, and extended to other types of bacteria so that a clear conclusion can be drawn regarding the selectivity of these compounds for the two *Neisseria* pathogens.

Compounds	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. lactamica</i>	<i>N. elongata</i>
NaBPh <sub>4</sub>	15	15	>100	>100
<b>1a</b>	100	100	>100	>100
<b>1b</b>	15	5	>100	>100
<b>1c</b>	5	<5	20	>100
<b>1d</b>	1,25	2,5	20	>100
<b>1g</b>	<1,25	2,5	5	100

**Table 1.** Minimum bactericidal concentration (MBC) of a selection of the various borate derivatives in  $\mu\text{M}$ .

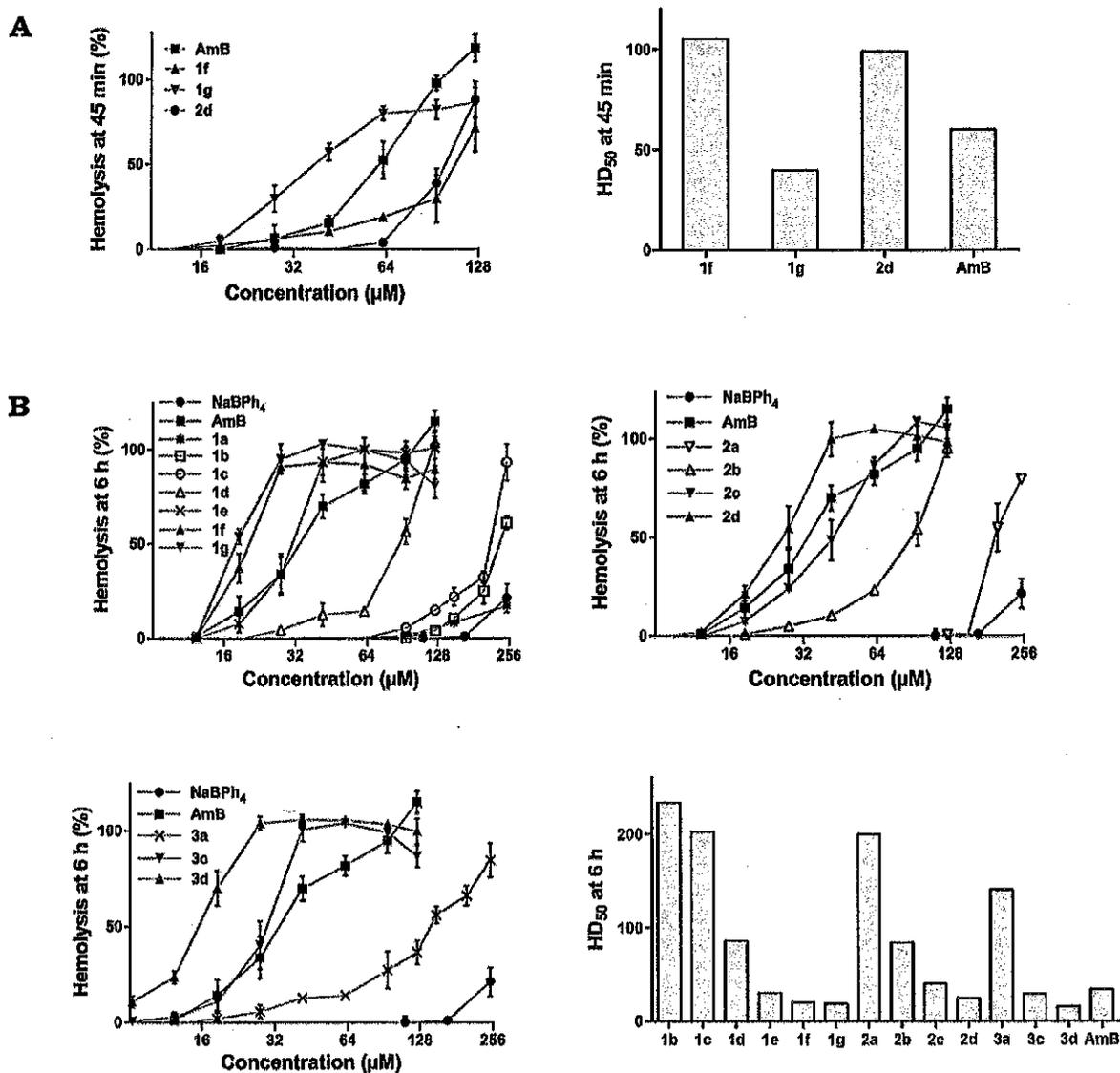
### Hemolytic activity on human red blood cells

Hemolysis is characterized by the rupture of erythrocytes, which results in the release of hemoglobin into the plasma, causing damage to various vital organs such as the liver, kidney and heart.<sup>28</sup> The lysis of red blood cells can prevent the direct intravenous administration of some therapeutic agents and sometimes increases the toxicity of these agents when administered by other routes.<sup>29, 30</sup> Thus, hemolytic assays are commonly used to evaluate the toxicity of drug candidates including antimicrobials.<sup>31-36</sup> Erythrocytes do not contain DNA, mitochondria or endoplasmic reticulum, but their membrane is complete as it consists of 35 % of lipids and 40 % of proteins, including spectrin, actin and various membrane and lipid anchor proteins, making them a model of choice for the investigation of the interactions of different species with biological membranes.<sup>36, 37</sup> Given the instability of tetraphenyl borate in acidic conditions, we

reasoned that intravenous (IV) injection could be considered as one of the preferred modes of administration for this type of drug candidate. Although the hemolytic activity of tetraphenyl borate was not previously demonstrated, we recently reported, using a mouse model of infection, that the IV administration of NaBPh<sub>4</sub> did not display noticeable signs of toxicity over the course of two weeks.<sup>4, 5</sup> These preliminary results prompted us to evaluate the hemolytic potential of the borate derivatives reported in this study and compare them to tetraphenylborate. The goal of this investigation was two-fold: i) to prevent any borate derivative that would display a too important hemolytic activity from being selected for further biological assessments, and ii) to evaluate whether the lipophilicity level of the various borate derivatives has an important effect on their hemolytic activity. Previous reports have shown that an increase in lipophilicity often leads to an increase of the hemolytic activity of a given compound, due to its enhanced affinity to the membrane of erythrocytes.<sup>34, 38, 39</sup> Among other examples, it was demonstrated that decreasing the lipophilicity of copolymers bearing hydrophobic hexyl and cationic groups on the same repeating unit by introducing PEG side chains into their structure dramatically reduced the hemolytic activities.<sup>38</sup> In another study, it was also shown that testosterone esters display a more important hemolytic activity than unaltered and less lipophilic testosterone.<sup>40</sup>

We first examined the hemolytic potential of borate derivatives **1**, **2** and **3** for 45 minutes, over concentrations varying from 16 to 256  $\mu$ M (Figure 3). The release of hemoglobin was used to quantify the membrane-damaging properties of the compounds tested, and monitored by UV-Vis absorbance measurements. It is noteworthy that hemolytic activity assessments are commonly performed within this timeframe (45 min to 1 h) to establish a preliminary evaluation of the toxicity profile of a given compound.<sup>41, 42</sup> For comparison purposes, we also tested the hemolytic activity of amphotericin B (AmB) (positive control), a marketed drug used to treat severe fungal infections despite its important hemolytic properties. Considering that the tetraphenylborate anion is commonly used in analytical chemistry as a precipitating agent for potassium cations, these experiments were performed in 0.9 % NaCl medium (as previously reported in several other studies)<sup>43</sup> to prevent any precipitation of the borates likely to occur in potassium-rich media.<sup>44</sup> Whereas most compounds did not display any hemolytic activity after 45 min up to 128  $\mu$ M (results not shown), **1f**, **1g** and **2d** were found to readily disrupt red blood cells in a concentration-dependent manner within this time

period (Figure 3A), suggesting a potential *in vivo* detrimental effect of these compounds that could severely limit their therapeutic applications. Allowing the compounds to interact with erythrocytes for a longer time period revealed their hemolytic activity to depend on their lipophilicity (6 h). All borates were found to display a higher hemolytic activity than tetraphenylborate and this activity was found to be proportional to the lipophilicity of the borates within the same groups (**1**, **2** and **3**), notably with an increased alkyl chain length in **1**, the number of methyl groups in **2** and the number of fluorine atoms in **3**. Interestingly, a direct comparison between analogous borate derivatives bearing the same number of methyl group(s) and fluorine atom(s) seems to indicate a slightly important effect of fluorine on the hemolytic activity, especially in the case of **2a** and **3a** where only one methyl group and one fluorine atom is present, respectively. Supplementary independent hemolysis experiments should be performed to conclude on whether this difference is significant. These results show that an optimal balance between antibacterial and hemolytic activities should be taken into account for future *in vivo* studies.



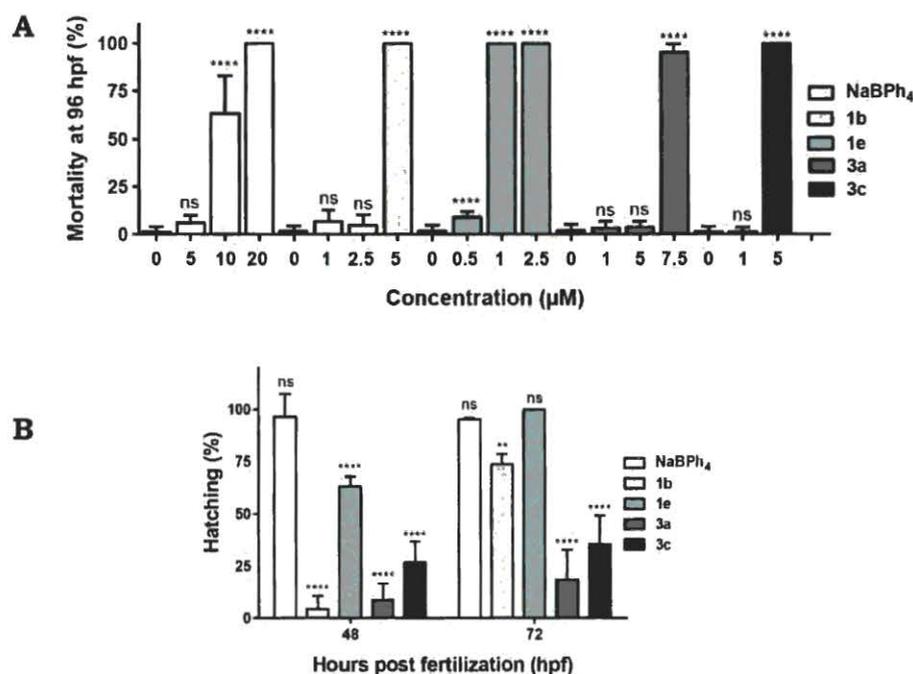
**Figure 3. Hemotoxicity of tetraphenylborate anion derivatives 1, 2, 3 groups and the control drug AmB on human red blood cells.** Log-dose response curves (16, 32, 64, 128 and 256  $\mu\text{M}$ ) for each compound and  $\text{HD}_{50}$  values (concentration that causes 50% hemolysis relative to the positive control, Triton 2% X-100) after A) 45 min and B) 6 h. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation made in triplicate. For clarity, species that did not display any activity at the tested concentrations are not included in the graphs. Results from a single hemolysis experiment at 45 min or 6 h were used to estimate  $\text{HD}_{50}$  values using a four parameter non-linear regression.<sup>45, 46</sup>

### **In vivo toxicity on the development of zebrafish embryos**

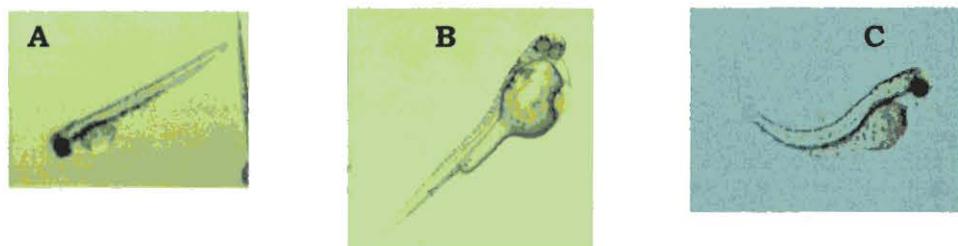
The zebrafish embryo (*Danio rerio*) is a suitable model for the *in vivo* toxicity screening of drug candidates, and is considered as a promising alternative to reduce and/or replace mammalian vertebrate usage.<sup>47</sup> Notably, 71% of human genes have at least one zebrafish ortholog, there are many similarities between zebrafish and human in most aspects of embryo development,<sup>48</sup> and zebrafish develop most of the major organ systems present in mammals in less than a week.<sup>48</sup> Advantages of using zebrafish for this purpose include their low cost, small size, high fertility, transparency, and ability to absorb compounds.<sup>47</sup> This assay was found to be as efficient and for some compounds more sensitive than the *in vitro* MTT assay for toxicity evaluation purposes.<sup>49</sup> Moreover, it conveniently allows the monitoring of side effects, which are found to be translated to traditional mammalian species in approximately 80% of the cases.<sup>47</sup> Thus, this assay has been so far widely used to screen the toxicity of various compounds, including pesticides,<sup>50, 51</sup> heavy metals,<sup>52</sup> endocrine disrupters,<sup>53</sup> as well as various inorganic<sup>54-57</sup> and organic<sup>58, 59</sup> drug candidates. The *in vivo* toxicity of **1b**, **1e**, **3a**, **3c** was assessed on the development of zebrafish embryos, and compared to that of tetraphenylborate. Compounds **1e** and **3c** were selected to evaluate the toxicity of the borate derivatives that displayed the highest antimicrobial activity among the series (and a relatively higher lipophilicity than tetraphenylborate), whereas **1b** and **3a** were selected to evaluate the effect of bringing small changes to the structure of tetraphenylborate (with a more similar lipophilicity). For this study, the mortality, hatching and abnormality rates of *Danio rerio* exposed to various concentrations of the borate derivatives (0.5-20  $\mu\text{M}$ ) were monitored every 24 h over a period of 96 h post fertilization (hpf) (Figures 4 and 5). It is important to note that quantifying the uptake of the various compounds in zebrafish would eventually be needed to prevent any erroneous interpretation of these results.

We first examined the effect of the borates on mortality and found that for all the compounds, a higher concentration-dependent mortality rate was observed compared to that of tetraphenylborate (Figure 4A). At 96 hpf, **1e** was found to be the most toxic, displaying a 100% mortality rate at a concentration as low as 1  $\mu\text{M}$ , whereas for the other compounds, a higher concentration of 5  $\mu\text{M}$  (**1b** and **3c**) and 7.5  $\mu\text{M}$  (**3a**) was required to lead to the same outcome. We were also interested to assess if the

compounds would induce any delay or inhibition in the hatching of zebrafish embryos, consisting of chorion digestion by hatching enzymes, normally taking place at 48-72 hpf.<sup>60</sup> A delay in hatching, often due to an increase in chorion stiffness, is associated with retarded embryo development and consequently, considered as a sign of chronic toxicity. At 72 hpf, tetraphenylborate and **1e** were not found to have any effect on the hatching rate at 1  $\mu\text{M}$ , whereas **1b**, **3a** and **3c** induced a considerable delay, found to be significantly more pronounced for compounds of the **3** group. Exposure of **1b** and **1e** led to systematic yolk edema, a swelling caused by the accumulation of watery fluids (Figure 5B).<sup>61</sup> This effect was observed when zebrafish embryos were exposed to solutions of 0.5  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  and higher of **1e** and **1b** after 24 hpf and 48 hpf, respectively. Yolk edema was also noted after exposure to **3a** and **3c** under the same conditions, but to a lesser extent. Interestingly, this effect was completely reversed after 96 hpf for **1b** after exposure to solutions up to 5  $\mu\text{M}$ . This phenomenon could not be evaluated at concentrations higher than 1  $\mu\text{M}$  in the case of **1e** given the high mortality rate induced by this compound. Nevertheless, this type of malformation could be responsible for the high mortality rate observed for these compounds.<sup>62</sup> Importantly, yolk edema was never observed in the case of tetraphenylborate at concentrations lower than 20  $\mu\text{M}$ . However, severe lordosis, an abnormal spinal curvature, was observed after exposure of zebrafish embryos to tetraphenylborate solutions of 5  $\mu\text{M}$  and higher (Figure 5C).<sup>63, 64</sup> Borate derivatives **1b**, **1e**, **3a** and **3c** did not display any significant skeletal malformation, which appear to be specific to  $\text{NaBPh}_4$ . Similar abnormalities were previously observed. Among multiple examples, they were notably noted when zebrafish were exposed to 40  $\mu\text{M}$  and 48  $\mu\text{M}$  solutions of the marketed drugs ketoprofen and ibuprofen,<sup>64</sup> respectively, or to 700 nM solutions of the antimicrobial sulfadimidine.<sup>65</sup> These results demonstrate that small modifications of the tetraphenylborate backbone can lead to different malformations and have an important effect on its *in vivo* toxicity.



**Figure 4. Effect of NaBPh<sub>4</sub>, 1b, 1e, 3a and 3c on the development of zebrafish embryos.** A) Mortality rate over 96 hpf. B) Hatching success over 48 and 72 hpf at 1 μM. Data were normalized with the respective controls, and expressed as means ± standard deviation from three independent experiments (a total of sixty embryos). Significant differences: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*\*P < 0.0001 vs. the control (0.5 % DMSO).



**Figure 5. Gross morphological phenotypes of zebrafish embryos.** A) Untreated (0.5 % DMSO) at 96 hpf. B) Yolk edema after treatment with 1e (1 μM) at 48 hpf. C) Lordosis observed after treatment with NaBPh<sub>4</sub> (20 μM) at 72 hpf

## Conclusion

The new borate derivatives presented in this study seem very promising, as the changes brought in the structure of the tetraphenylborate anion led to a great enhancement of their *in vitro* antimicrobial activity, while retaining their selectivity to the two *Neisseria* pathogens and remaining quite safe on human erythrocytes. We have clearly shown that increasing the lipophilicity had a major impact on the biological activity of the

compounds reported, in all the model used in this study. The use of small molecules such as the borate derivatives reported here, as selective and anti-virulence antimicrobials, could change the way we approach antibiotic therapy.

## Experimental section

**General Comments.** All chemicals including tetrakis(tolyl)borate (**3d**) and Sodium tetraphenylborate were purchased from commercial sources and used without further purification. Potassium trifluoro(phenyl)borate was prepared according a literature procedure.<sup>66</sup> Reactions were performed under an inert atmosphere of nitrogen using Schlenk techniques and solvents were dried using a solvent purification system (Pure Process Technology). NMR spectra (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}, COSY, HSQC, and HMBC) were recorded using a 600 MHz Bruker Avance III NMR spectrometer (QCI cryoprobe, 3mm NMR tubes, 25°C). Chemical shifts ( $\delta$ ) and coupling constants are expressed in ppm and Hz, respectively. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} spectra were referenced to solvent resonances, and spectral assignments were confirmed by 2D experiments. It is noteworthy that due to coupling, the signals corresponding to carbons that are directly linked to boron could sometimes not be observed in the <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} spectra, but their presence could be confirmed from 2D spectra. Mass spectra (ESI-MS) were obtained using a Waters quarto premier mass spectrometer and used in direct injection mode. High-resolution and high accuracy mass spectra (HR-ESI-MS) were obtained using an Exactive Orbitrap spectrometer from ThermoFisher Scientific (CQIB-INRS). Partition coefficients (Log*P*) were determined using the shaking flask method (HPLC-UV).<sup>24, 25</sup> HPLC-UV were obtained using an Agilent 1260 infinity II equipped with a pursuit C18 150 × 3.0 mm 3.0  $\mu$ m column using a Milli-Q water and acetonitrile gradient. The purity for all compounds was assessed by absolute <sup>1</sup>H qNMR following guidelines<sup>67</sup> (20 s relaxation time).

### General procedure for the synthesis of Grignard reagents

Magnesium turnings (53 mg, 2.18 mmol) were heated at 120 °C under reduced pressure for 1h. THF (20 mL) was added followed by the addition of a small crystal of diiodine and the corresponding n-bromoalkane or bromoaryl (1.93 mmol). The mixture was brought to boil for 1-3 h, cooled to room temperature and used immediately.

**Synthesis of potassium hexyltrifluoroborate.** Magnesium turnings (223 mg, 9.17 mmol) were heated at 120 °C under reduced pressure for 1h. THF (20 mL) was added followed by the addition of a small crystal of diiodine and hexyl bromide (1.45 g, 8.77

mmol). The mixture was brought to boil for 1-3 h until the solution turn to greenish solution. The mixture was cool to -78 °C and triisopropyl borate was added (1.50 g, 7.98 mmol) and return back to room temperature slowly over 16 hours. The middle is treat with 1M HCl and extract with ethyl acetate 3 time. The organic phase is dry under reduce pressure, dissolve in methanol 15 ml and 3.5 eq of potassium bifluoride is added and stir over 3 day. The remaining potassium bifluoride is filter and methanol remove under reduce pressure. The residual oil is dissolve in toluene and shake well until a white precipitate is forming and recover by filtration. Potassium hexyltrifluoroborate was obtained as a white powder (842 mg, 55 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>) δ 0.16 – 0.26 (m, 2H), 0.90 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.22 – 1.37 (m, 8H).

**General procedure for the synthesis of triphenylalkylborates (1a-g), tolyltriphenylborate (2a) and Sodium 4-fluorophenyltriphenylborate (3a)**

The corresponding Grignard reagent (0,60 mmol) was added dropwise (over 5 min) to a pre-cooled (-78 °C) solution of triphenyl boron (2 mL of a 0.25 M solution in THF) in THF (5 mL). The reaction mixture was kept at -78°C for 2 h and was then allowed to slowly return to room temperature overnight. 10 mL of an aqueous sodium carbonate (0.5 M) solution were then added. The mixture was extracted with ethyl acetate and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting oil was dissolved in dichloromethane, hexanes was added and the precipitate was filtered.

**Sodium methyltriphenylborate (1a)** was obtained as a white powder (70 mg, 54 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, methanol-d<sub>4</sub>) δ: 0.26 (q, J = 3.89 Hz, 3H), 6.80 (tt, J = 7.2, 1.5 Hz, 3H), 6.96 (t, J = 7.5 Hz, 6H), 7.22 – 7.30 (m, 6H); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (151 MHz, methanol-d<sub>4</sub>) δ: 13.42 (q, J = 42.3 Hz), 122.40, 126.50, 135.53, 168.84 (q, J = 48.2 Hz). HR-ESI-MS m/z (-): 257.15044 (Calc 257.15016). LogP = -0.96 ± 0.1.

**Sodium ethyltriphenylborate (1b)** was obtained as a white powder (70 mg, 32 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, methanol-d<sub>4</sub>) δ: 0.61 – 0.67 (m, 3H), 0.87 – 0.95 (m, 2H), 6.78 (tt, J = 7.2, 1.5 Hz, 3H), 6.94 (t, J = 7.3 Hz, 6H), 7.29 – 7.36 (m, 6H); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (151 MHz, methanol-d<sub>4</sub>) δ: 12.40, 122.21, 126.34, 136.07, 167.59 (q, J = 46.8 Hz). HR-ESI-MS m/z (-): 271.16600 (Calc 271.16581). LogP = 0.0 ± 0.2. Measured purity = 98.8 %.

**Sodium propyltriphenylborate (1c)** was obtained as a white powder (200 mg, 47 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0.77 – 0.89 (m, 5H), 0.93 (p, J = 7.1 Hz, 2H), 6.75 (tt, J = 7.0, 1.5 Hz, 3H), 6.90 (t, J = 7.4 Hz, 6H), 7.16 – 7.28 (m, 6H); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (151 MHz,

DMSO- $d_6$ )  $\delta$  165.77 (q,  $J = 47.8$  Hz), 134.37, 125.27, 121.08, 31.51 (q,  $J = 39.6$  Hz), 20.80, 19.79. HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 285.18173 (Calc 285.18146).  $\text{Log}P = 0.8 \pm 0.2$ .

**Sodium butyltriphenylborate (1d)** was obtained as a white powder (120 mg, 50 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 0.81 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H), 0.89 – 0.95 (m, 2H), 0.97 – 1.04 (m, 2H), 1.24 (h,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 6.79 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H), 6.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H), 7.30 – 7.39 (m, 6H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 13.62, 27.66 (q,  $J = 42.3$ ), 27.75, 30.46, 120.83, 124.98, 134.66, 166.55 (q,  $J = 48.1$  Hz). HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 299.1980 (Calc 299.1977) HR-ESI-MS  $m/z$  (+): 345.1770 [ $\text{M}+2\text{Na}$ ] $^+$  (Calc 345.1761)  $\text{Log}P = 0.92 \pm 0.021$ . Measured purity = 98.2 %.

**Sodium hexyltriphenylborate (1e)** was obtained as a white powder (213 mg, 48 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 0.85 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H), 0.87 – 0.93 (m, 2H), 0.98 – 1.04 (m, 2H), 1.16 – 1.27 (m, 6H), 6.78 (tt,  $J = 7.1, 1.4$  Hz, 3H), 6.95 (t,  $J = 7.5$  Hz, 6H), 7.31 – 7.36 (m, 6H);  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 14.67, 24.09, 29.19, 33.59, 36.17, 122.18, 126.33, 136.03, 167.93 (q,  $J = 48.2$  Hz, 2, 3, 5). HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 327.2307 (Calc 327.2321).  $\text{Log}P = 2.83 \pm 0.02$ . Measured purity = 97.7 %.

**Sodium heptyltriphenylborate (1f)** was obtained as a white powder (218 mg, 47 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 0.86 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 0.88 – 0.93 (m, 2H), 0.98 – 1.04 (m, 2H), 1.15 – 1.25 (m, 6H), 1.27 (hept,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 6.78 (tt,  $J = 7.1, 1.5$  Hz), 6.94 (t,  $J = 7.5$  Hz, 6H), 7.30 – 7.36 (m, 6H);  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 13.19, 22.54, 27.82, 29.51, 32.14, 35.04, 120.81, 124.97, 134.67, 166.56 (q,  $J = 47.0$  Hz). HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 341.24413 (Calc 342.24406).  $\text{Log}P = 3.10 \pm 0.05$ . Measured purity = 99.4 %.

**Sodium octyltriphenylborate (1g)** was obtained as a white powder (255 mg, 44 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 0.88 – 0.96 (m, 1H), 0.99 – 1.07 (m, 2H), 1.21 – 1.29 (m, 2H), 1.29 – 1.36 (m, 8H), 6.81 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3), 6.97 (t,  $J = 7.3$  Hz, 6H), 7.32 – 7.40 (m, 6H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 166.55 (q,  $J = 47.7$  Hz), 134.74, 125.11, 120.94, 35.09, 31.95, 29.83, 29.51, 27.81, 22.48, 13.21. HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 355.26012 (Calc 355.25971).  $\text{Log}P = 4.1 \pm 0.3$ . Measured purity = 98.7 %.

**Sodium tolyltriphenylborate (2a)** was obtained as a white powder (120 mg, 77 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 2.22 (s, 3H), 6.79 – 6.85 (m, 5H), 6.97 (t,  $J = 7.4$  Hz, 6H), 7.16 – 7.22 (m, 2H), 7.26 – 7.33 (m, 6H);  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$ : 19.89, 121.24, 124.93, 125.79, 129.80, 135.88, 160.16 (q,  $J = 49.8$  Hz), 164.14 (q,  $J =$

48.5 Hz). HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 333.18257 (Calc 333.18146).  $\text{Log}P = 0.41 \pm 0.02$ . Measured purity = 98.4 %.

**Sodium 4-fluorophenyltriphenylborate (3a)** was obtained as a white powder (200 mg, 50 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  6.65 (qt,  $J = 8.7, 2.0$  Hz, 2H), 6.83 (tt,  $J = 7.2, 1.5$  Hz, 3H), 6.97 (t,  $J = 7.5$  Hz, 6H), 7.16 – 7.24 (m, 2H), 7.24 – 7.31 (m, 6H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  112.32 (dq,  $J = 17.9, 3.1$  Hz), 122.72, 126.36 (q,  $J = 2.7$  Hz), 137.16, 138.03 – 138.15 (m), 161.25 (d,  $J = 236.1$  Hz), 165.14 (q,  $J = 49.5$  Hz). HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 337.19641 (Calc 357.15638)  $\text{Log}P = 0.80 \pm 0.13$ . Measured purity = 97.6%.

**Synthesis of sodium tris(4-methylphenyl)(phenyl)borate (2c).** To a suspension of potassium trifluoro(phenyl)borate (200 mg, 1.09 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was added and three equivalent of a solution of corresponding Grignard reagents was added dropwise over 5 minutes. The solution was stirred overnight at room temperature. After completion 10 ml of 0.5 M sodium carbonate was added and extract with ethyl acetate and dry under vacuum. The resulting oil was dissolved in dichloromethane and hexane was added, the resulting precipitate was filtered. The final product was obtained as a white powder (107 mg, 25 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 2.17 (s, 9H), 6.72 – 6.79 (m, 7H), 6.91 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.21 – 7.26 (m, 6H), 7.32 – 7.37 (m, 2H);  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 20.44, 121.14, 124.98, 125.92, 129.16, 136.17, 160.75 (q,  $J = 49.3$  Hz), 164.79 (q,  $J = 49.0$  Hz).  $\text{Log}P = 2.5 \pm 0.2$ .  $\text{Log}P = 2.59 \pm 0.07$ . Measured purity = 98.6 %. HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 361.21288 (Calc 360.21276).

**Sodium tris(4-fluorophenyl)(phenyl)borate (3c)** was obtained as a white powder (217 mg, 41 %)  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  6.65 – 6.71 (m, 6H), 6.87 (tt,  $J = 7.3, 1.5$  Hz, 1H), 6.99 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.15 – 7.20 (m, 6H), 7.21 – 7.24 (m).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  111.09 (dq,  $J = 17.9, 2.7$  Hz), 121.54, 125.11 (q,  $J = 2.6$  Hz), 135.60, 136.54, 158.39 (qd,  $J = 50.1, 3.3$  Hz), 159.94 (d,  $J = 236.7$  Hz), 163.36 (q,  $J = 49.9$  Hz). HR-ESI-MS  $m/z$  (-): 373.13726 (Calc 373.13754).  $\text{Log}P = 2.5 \pm 0.2$ . Measured purity = 97.9 %.

**Synthesis of 2-aminoethyldiphenylborate.** The synthesis was adapted from a previously reported procedure.<sup>33</sup> Triisopropyl borate (2 g, 10.63 mmol) in anhydrous THF (40 ml) was cooled to  $-78$  °C and two equivalent of phenyl magnesium bromide at

3M (21.27 mmol) was added dropwise over 15 minutes. The solution was kept at -78 °C for 2 h and allowed to slowly return to room temperature overnight. After completion, 10 mL of 1 M HCl aqueous solution was added and extract with ethyl acetate and dry under vacuum. The resulting oil was dissolved in ethyl acetate and an excess of ethanolamine was added, and stirred overnight. The solution was washed with distilled water and dried with MgSO<sub>4</sub>. The solution was dried under vacuum and the precipitate recrystallized with a mixture of dichloromethane/hexanes. The final product was obtained as a white powder (1.26 g, 55 %).

**Synthesis of Sodium bis(4-methylphenyl)diphenylborate (2b)** The synthesis of the potassium difluorodiphenylborate precursor was adapted from a previously reported procedure.<sup>34</sup> To a solution of 2-aminoethyldiphenyl borate (200 mg, 0.89 mmol) in 5 mL of methanol were added 3 equivalents of potassium bifluoride and the reaction mixture was stirred for 1h. The excess of potassium bifluoride was filtered and the solvent evaporated under vacuum. The resulting powder was stirred for a few hours in diethyl ether and then filtered. Potassium (difluoro)diphenylborate was obtained as a white powder (200 mg, 93 %). To a solution of potassium (difluoro)diphenylborate (250 mg, 1.03 mmol) in anhydrous THF (20 mL) cooled to -78 °C was added and 2.5 equivalent of a solution of tolylmagnesium bromide at 0.5 M (0,74 mmol) was added dropwise over 5 minutes. The solution was stirred overnight at room temperature. After completion 10 mL of 0.5 M sodium carbonate was added and extract with ethyl acetate and dry under vacuum. The resulting oil was dissolved in dichloromethane and hexanes was added, the resulting precipitate was filtered the final product was obtained as a white powder (120 mg, 59 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2.15 (s, 6H), 6.73 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 6.76 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 6.90 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 7.00 – 7.07 (m, 4H), 7.12 – 7.20 (m, 4H); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 21.30, 121.84, 125.67, 126.58, 129.77, 135.97, 160.23 (q, J = 49.0 Hz), 164.27 (q, J = 50.2 Hz). HR-ESI-MS m/z (-): 347.19739 (Calc 347.19711). LogP = 2.0 ± 0.1. Measured purity = 97.6 %.

**Synthesis of Sodium tetra(4-fluorophenyl) borate (3d)** To a solution of triisopropyl borate (200 mg, 0.95 mmol) in anhydrous THF (20 mL) were added 4 eq. of a solution of the corresponding Grignard reagent dropwise, over 5 minutes. The solution was stirred overnight at room temperature. After completion, 10 mL of an aqueous solution of

sodium carbonate (0.5 M) were added. An extraction with ethyl acetate was then performed, the organic solvent evaporated and the residue dried under vacuum. The resulting oil was dissolved in dichloromethane, hexanes was added, and the resulting precipitate was filtered. The final product was obtained as a white powder (222 mg, 61 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ 7.24 – 7.13 (m, 4H), 6.75 – 6.63 (m, 4H). ESI-MS m/z (-): 391.2 (Calc 391.13). Measured purity = 98.3 %.

**Synthesis of Sodium tetra(3-fluorophenyl) borate (3e)** was obtained as a white powder (397 mg, 60 %). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>) δ 7.06 – 6.96 (m, 8H), 6.88 – 6.83 (m, 4H), 6.62 – 6.54 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Methanol-d<sub>4</sub>) δ 166.11 (q, J = 99.6, 49.5 Hz), 162.29 (d, J = 241.2 Hz), 131.10, 126.25, 120.76 (d, J = 16.1 Hz), 108.07 (d, J = 21.3 Hz). ESI-MS m/z (-): 391.2 (Calc 391.13). Measured purity = 98.4 %.

***N. meningitidis* luminescent strain growth assay.** To compare the activity of the different boron-containing salts (scheme 1), the amount of light produced after 16h of growth for *N. meningitidis* luminescent strain was measured. Contrarily to optical density (OD) readings which can be misleading due to the absorbance of dead cells, this measurement is directly correlated to the amount of live cells, as the half-life of the luciferase and its substrate are limited and that the emission of light is therefore not subsisting after the death of the cells. To perform this assay, *N. meningitidis* (LNP24198) expressing luciferase (LuxABCDE) was grown overnight under the control of the constitutive promoter *porBp* in GCB agar media, and a cell-suspension corresponding to an OD<sub>600</sub>=0.01 was subsequently prepared. In parallel, fresh stock DMSO solutions of the compounds were prepared (100X, with final concentrations being indicated in the different figures) and 1.8 µL of the corresponding solutions were added per well of 96-well plates. In each well, 178.2 µL of bacterial suspension were subsequently added. Bacteria were allowed to grow during 16 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The emitted light was measured using a 96-well plate luminometer (PerkinElmer Wallac 1420 Victor) and results are expressed in relative light unit per second (RLU/s). All these assays were minimally performed in triplicates.

**Hemolytic Activity Assay.** Toxicity to human red blood cells (RBCs) was assessed by a hemoglobin release assay. Freshly collected human blood from two donors (*INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Quebec, Canada*) were treated with heparin to prevent coagulation and then washed three times with Alsever's solution,

centrifuged at 500 g for 5 min and then suspended in a 0.9% sodium chloride. Red blood cells were diluted with 0.9% sodium chloride solution to obtain a 1% v/v RBC solution. 1492  $\mu$ L of the 1% RBC solution was added to 96-well microplates and 7.5  $\mu$ L of freshly prepared DMSO stock solutions of the borate derivatives **1**, **2** and **3** were added. The solution was diluted in series with a dilution factor of 1.5. Microplates were incubated at 37°C for 45 min and 6 h. Microplates were then centrifuged at 500 g for 5 min, afterwhat the supernatant was transferred to empty microplates. Absorbance of the supernatant was measured at 540 nm with a Tecan plate reader. Each experiment was carried out in triplicates. All data were normalized with 0.9 % NaCl solution as 0% and 2 % Triton X-100 as 100%. Hemolysis experiments were performed following a protocol approved by our local ethics research committee in human research.

**Zebrafish Embryo Assay.** Wild-type zebrafish (*Danio rerio*) embryos were raised at 28.5 °C and staged as previously described. Embryos at the 4-cell stage were respectively exposed to **1b**, **1e**, **3a** and **3c** at prepared by diluting the DMSO stock solution of each compound in the fish medium (DMSO final concentration = 0.5 %). The medium (containing the compound to be tested) was refreshed after 48 h for each experiment. A control experiment was also included. Experiments were performed in triplicates, and a total of sixty embryos from the pooling of three different crosses have been used per each treatment. The mortality, gross morphology and hatching rates of the embryos in each system were observed every 24 h for a period of 96 h under a stereo microscope (Leika S6E). Zebrafish experiments were performed following a protocol approved by the Canadian Council for Animal Care (CCAC) and our local animal care committee.

## References

1. Black, C. G.; Fyfe, J. A. M.; Davies, J. K., Absence of an SOS-like system in *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* **1998**, *208* (1), 61-66.
2. Kim, W. J.; Higashi, D.; Goytia, M.; Rendón, M. A.; Pilligua-Lucas, M.; Bronnimann, M.; McLean, J. A.; Duncan, J.; Trees, D.; Jerse, A. E.; So, M., Commensal *Neisseria* Kill *Neisseria gonorrhoeae* through a DNA-Dependent Mechanism. *Cell Host and Microbe* **2019**, *26* (2), 228-239.e8.

3. Bodie, M.; Gale-Rowe, M.; Alexandre, S.; Auguste, U.; Tomas, K.; Martin, I., Addressing the rising rates of gonorrhoea and drug-resistant gonorrhoea: There is no time like the present. *Canada Communicable Disease Report* **2019**, *45* (2/3), 54-62.
4. Castonguay, A.; Veyrier, F. Compounds and methods for the treatment of pathogenic *Neisseria*, Patent WO 2020/051701.
5. Bernet, E.; Lebughe, M.; Vincent, A.; Vidal, R.; Haghdoost, M.M.; Golbaghi, G.; Castonguay, A.; Veyrier, F., Sodium tetraphenylborate is highly efficient at treating, with a narrow toxicity, infections caused by *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae* (submitted to *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*).
6. Sun, X.; Zhai, W.; Fossey, J. S.; James, T. D., Boronic acids for fluorescence imaging of carbohydrates. *Chemical Communications* **2016**, *52* (17), 3456-3469.
7. Sanjoh, M.; Miyahara, Y.; Kataoka, K.; Matsumoto, A., Phenylboronic Acids-based Diagnostic and Therapeutic Applications. *Analytical Sciences* **2014**, *30* (1), 111-117.
8. Diaz, D. B.; Yudin, A. K., The versatility of boron in biological target engagement. *Nature Chemistry* **2017**, *9* (8), 731-742.
9. Smoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M., Boron containing compounds as protease inhibitors. *Chemical Reviews* **2012**, *112* (7), 4156-4220.
10. Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Totrov, M.; Hirst, G. C.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; King, P.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Clifton, M. C.; Atkins, K.; Raymond, A.; Potts, K. T.; Abendroth, J.; Boyer, S. H.; Loutit, J. S.; Morgan, E. E.; Durso, S.; Dudley, M. N., Discovery of a cyclic boronic acid  $\beta$ -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (9), 3682-3692.
11. Baker, S. J.; Akama, T.; Zhang, Y. K.; Sauro, V.; Pandit, C.; Singh, R.; Kully, M.; Khan, J.; Plattner, J. J.; Benkovic, S. J.; Lee, V.; Maples, K. R., Identification of a novel boron-containing antibacterial agent (AN0128) with anti-inflammatory activity, for the potential treatment of cutaneous diseases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (23), 5963-5967.
12. Lee, E. B.; Lebowitz, M. G.; Wu, J. J., Treatment of psoriasis with crisaborole. *Journal of Dermatological Treatment* **2019**, *30* (2), 156-157.
13. Aiuchi, T.; Shirane, Y.; Kinemuchi, H.; Arai, Y.; Nakaya, K.; Nakamura, Y., Enhancement by tetraphenylboron of inhibition of mitochondrial respiration induced by

1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>). *Neurochemistry International* **1988**, *12* (4), 525-531.

14. Hunziker, A.; Orme, F. W.; Macey, R. I., Transport of hydrophobic ions in erythrocyte membrane: I. Zero membrane potential properties. *The Journal of Membrane Biology* **1985**, *84* (2), 147-156.

15. Loughrey, B. T.; Healy, P. C.; Parsons, P. G.; Williams, M. L., Selective cytotoxic Ru(II) arene Cp\* complex salts [R-PhRuCp\*]<sup>+</sup>X<sup>-</sup> for X = BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, and BPh<sub>4</sub>. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47* (19), 8589-8591.

16. Waring, M. J., Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2010**, *5* (3), 235-248.

17. Hishida, M.; Endo, A.; Nakazawa, K.; Yamamura, Y.; Saito, K., Effect of n-alkanes on lipid bilayers depending on headgroups. *Chemistry and Physics of Lipids* **2015**, *188*, 61-67.

18. Müller, K.; Faeh, C.; Diederich, F., Fluorine in pharmaceuticals: Looking beyond intuition. *Science* **2007**, *317* (5846), 1881-1886.

19. Meisters, M.; Vandenberg, J. T.; Cassaretto, F. P.; Posvic, H.; Moore, C. E., Studies in the tetraarylborates: Part V. The influence of substituents on the stability of tetraarylborates. *Analytica Chimica Acta* **1970**, *49* (3), 481-485.

20. Siegmann, K.; Pregosin, P. S.; Venanzi, L. M., Reaction of Organoboron Compounds with Platinum(II) Disolvento Complexes. *Organometallics* **1989**, *8* (11), 2659-2664.

21. Lai, Y.-H., Grignard reagents from chemically activated magnesium. *Synthesis* **1981**, *08*, 585-604.

22. Martínez-Martínez, A. J.; Weller, A. S., Solvent-free anhydrous Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> salts of [B(3,5-(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, [BArF<sub>4</sub>]<sup>-</sup>. Improved synthesis and solid-state structures. *Dalton Transactions* **2019**, *48* (11), 3551-3554.

23. Eaton, G. R., NMR of boron compounds. *Journal of Chemical Education* **1969**, *46* (9), 547-556.

24. Román, I. P.; Mastromichali, A.; Tyrovola, K.; Canals, A.; Psillakis, E., Rapid determination of octanol-water partition coefficient using vortex-assisted liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1330*, 1-5.

25. Yiantzi, E.; Psillakis, E.; Tyrovola, K.; Kalogerakis, N., Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. *Talanta* **2010**, *80* (5), 2057-2062.
26. McKarns, S. C.; Hansch, C.; Caldwell, W. S.; Morgan, W. T.; Moore, S. K.; Doolittle, D. J., Correlation between hydrophobicity of short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. *Fundamental and Applied Toxicology* **1997**, *36* (1), 62-70.
27. Eom, I. Y., Estimation of partition coefficients of benzene, toluene, ethylbenzene, and p-xylene by consecutive extraction with solid phase microextraction. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2011**, *32* (5), 1463-1464.
28. Krzyzaniak, J. F.; Alvarez Núñez, F. A.; Raymond, D. M.; Yalkowsky, S. H., Lysis of Human Red Blood Cells. 4. Comparison of in Vitro and in Vivo Hemolysis Data. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1997**, *86* (11), 1215-1217.
29. Bolard, J.; Legrand, P.; Heitz, F.; Cybulska, B., One-Sided Action of Amphotericin B on Cholesterol-Containing Membranes is Determined by Its Self-Association in the Medium. *Biochemistry* **1991**, *30* (23), 5707-5715.
30. Food; Drug, A., Guidance for Industry Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients. *FDA Guidance* **2005**, (May), 12-12.
31. Wang, Y.; Zhou, Z.; Zhu, J.; Tang, Y.; Canady, T. D.; Chi, E. Y.; Schanze, K. S.; Whitten, D. G., Dark Antimicrobial Mechanisms of Cationic Phenylene Ethynylene Polymers and Oligomers against *Escherichia coli*. *Polymers* **2011**, *3* (3).
32. Robinson, K. R.; Mills, J. J.; Pierce, J. G., Expanded Structure-Activity Studies of Lipoxazolidinone Antibiotics. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *10* (3), 374-377.
33. Olsen, C. A.; Ziegler, H. L.; Nielsen, H. M.; Frimodt-Møller, N.; Jaroszewski, J. W.; Franzyk, H., Antimicrobial, hemolytic, and cytotoxic activities of  $\beta$ -peptid-peptide hybrid oligomers: Improved properties compared to natural AMPs. *ChemBioChem* **2010**, *11* (10), 1356-1360.
34. Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H., Interplay among folding, sequence, and lipophilicity in the antibacterial and hemolytic activities of  $\alpha/\beta$ -peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (2), 417-428.
35. Bragadeeswaran, S.; Priyadharshini, S.; Prabhu, K.; Rani, S. R. S., Antimicrobial and hemolytic activity of fish epidermal mucus *Cynoglossus arel* and *Arius caelatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2011**, *4* (4), 305-309.

36. De Oliveira, S.; Saldanha, C., An overview about erythrocyte membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **2010**, *44* (1), 63-74.
37. Pagano, M.; Faggio, C., The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell Biochemistry and Function* **2015**, *33* (6), 351-355.
38. Punia, A.; Lee, K.; He, E.; Mukherjee, S.; Mancuso, A.; Banerjee, P.; Yang, N.-L., Effect of Relative Arrangement of Cationic and Lipophilic Moieties on Hemolytic and Antibacterial Activities of PEGylated Polyacrylates. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (10).
39. Rogers, K. S., Rabbit Erythrocyte Hemolysis by Lipophilic, Aryl Molecules. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1969**, *130* (4), 1140-1142.
40. Biagi, G. L. G. M. C. e. B. A. M., Relation between lipophilic character and hemolytic activity of testosterone and testosterone esters. *Journal of medicinal chemistry* **1970**, *13* (5), 944-948.
41. Colonna, W. J.; Marti, M. E.; Nyman, J. A.; Green, C.; Glatz, C. E., Hemolysis as a rapid screening technique for assessing the toxicity of native surfactin and a genetically engineered derivative. *Environmental Progress and Sustainable Energy* **2017**, *36* (2), 505-510.
42. Evans, B. C.; Nelson, C. E.; Yu, S. S.; Beavers, K. R.; Kim, A. J.; Li, H.; Nelson, H. M.; Giorgio, T. D.; Duvall, C. L., Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2013**, (73), 7-11.
43. Amin, K.; Dannenfelser, R. M., In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. *Journal of pharmaceutical sciences* **2006**, *95* (6), 1173-1176.
44. Cluley, H. J., The determination of potassium by precipitation as potassium tetraphenylboron and its application to silicate analysis. *The Analyst* **1955**, *80* (950), 354-364.
45. Sebaugh, J. L., Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics* **2011**, *10* (2), 128-134.
46. Bonate, L. P., *Pharmacokinetics-pharmacodynamics modeling and simulation*. Springer US: New York, 2011; Vol. 53.
47. Ducharme, N. A.; Peterson, L. E.; Benfenati, E.; Reif, D.; McCollum, C. W.; Gustafsson, J. Å.; Bondesson, M., Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133

- chemicals from zebrafish developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicology* **2013**, *41*, 98-108.
48. Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R.; Ullmann, B.; Schilling, T. F., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* **1995**, *203* (3), 253-310.
49. Li, Y.; Huang, W.; Huang, S.; Du, J.; Huang, C., Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *422* (1), 85-90.
50. Mhadhbi, L.; Beiras, R., Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*). *Water, Air, and Soil Pollution* **2012**, *223* (9), 5917-5930.
51. Todd, N. E.; Van Leeuwen, M., Effects of Sevin (carbaryl insecticide) on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2002**, *53* (2), 267-272.
52. Bourrachot, S.; Simon, O.; Gilbin, R., The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **2008**, *90* (1), 29-36.
53. Saili, K. S.; Corvi, M. M.; Weber, D. N.; Patel, A. U.; Das, S. R.; Przybyla, J.; Anderson, K. A.; Tanguay, R. L., Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicology* **2012**, *291* (1-3), 83-92.
54. Li, S. P. Y.; Lau, C. T. S.; Louie, M. W.; Lam, Y. W.; Cheng, S. H.; Lo, K. K. W., Mitochondria-targeting cyclometalated iridium(III)-PEG complexes with tunable photodynamic activity. *Biomaterials* **2013**, *34* (30), 7519-7532.
55. Ali, M.; Dondaine, L.; Adolle, A.; Sampaio, C.; Chotard, F.; Richard, P.; Denat, F.; Bettaieb, A.; Le Gendre, P.; Laurens, V.; Goze, C.; Paul, C.; Bodio, E., Anticancer agents: Does a phosphonium behave like a Gold(I) phosphine complex? Let a "smart" probe answer! *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (11), 4521-4528.
56. Senerovic, L.; Zivkovic, M. D.; Veselinovic, A.; Pavic, A.; Djuran, M. I.; Rajkovic, S.; Nikodinovic-Runic, J., Synthesis and evaluation of series of diazine-bridged dinuclear platinum(II) complexes through in vitro toxicity and molecular modeling: Correlation between structure and activity of pt(II) complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (3), 1442-1451.

57. Haghdoost, M. M.; Golbaghi, G.; Guard, J.; Sielanczyk, S.; Patten, S. A.; Castonguay, A., of the counteranion †. **2019**.
58. van den Brandhof, E. J.; Montforts, M., Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2010**, 73 (8), 1862-1866.
59. van Leeuwen, C. J.; Adema, D. M. M.; Hermens, J., Quantitative structure-activity relationships for fish early life stage toxicity. *Aquatic Toxicology* **1990**, 16 (4), 321-334.
60. Kim, D. H.; Sun, Y.; Yun, S.; Sang, H. L.; Kim, B., Investigating chorion softening of zebrafish embryos with a microrobotic force sensing system. *Journal of Biomechanics* **2005**, 38 (6), 1359-1363.
61. Sant, K. E.; Timme-laragy, A. R., Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. **2019**, 5 (1), 125-133.
62. Fraysse, B.; Mons, R.; Garric, J., Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2006**, 63 (2), 253-267.
63. Pamanji, R.; Bethu, M. S.; Yashwanth, B.; Leelavathi, S.; Venkateswara Rao, J., Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research* **2015**, 22 (10), 7744-7753.
64. David, A.; Pancharatna, K., Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2009**, 27 (3), 390-395.
65. Yan, Z.; Yang, Q.; Jiang, W.; Lu, J.; Xiang, Z.; Guo, R.; Chen, J., Integrated toxic evaluation of sulfamethazine on zebrafish: Including two lifespan stages (embryo-larval and adult) and three exposure periods (exposure, post-exposure and re-exposure). *Chemosphere* **2018**, 195, 784-792.
66. Mohy El Dine, T.; Sadek, O.; Gras, E.; Perrin, D. M., Expanding the Balz-Schiemann Reaction: Organotrifluoroborates Serve as Competent Sources of Fluoride Ion for Fluoro-Dediazotiation. *Chemistry - A European Journal* **2018**, 24 (56), 14933-14937.
67. Pauli, G. F.; Chen, S. N.; Simmler, C.; Lankin, D. C.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Napolitano, J. G., Importance of purity evaluation and

the potential of quantitative  $^1\text{H}$  NMR as a purity assay. *Journal of Medicinal Chemistry*  
**2014**, 57 (22), 9220-9231.

## **4 CHAPITRE 2 : AUTRES FONCTIONALISATIONS DE L'ANION TÉTRAPHÉNYLBORATE**

---

Au cours de ce projet, plusieurs autres fonctionnalisations de l'anion tétraphénylborate ont été tentées afin de préparer des dérivés qui pourraient également démontrer d'intéressantes applications biologiques. Entre autres, certains efforts ont été dévoués à la préparation de ligands de type «base de Schiff», comprenant une fonction imine et une fonction hydroxyle, permettant leur complexation à certains métaux tel le ruthénium [132]. Certains complexes de ruthénium préparés au sein de notre groupe ont déjà démontré d'intéressantes activités contre *Neisseria meningitidis* (résultats non publiés). L'introduction de ce type de ligands anioniques à même la structure de complexes cationiques de ruthénium permettrait la mise au point de complexes métalliques zwitterioniques ayant des activités antibactériennes accrues. Il est intéressant de noter que de tels complexes pourraient aussi être plus sélectifs pour les pathogènes d'intérêt que les complexes de ruthénium qui ne comportent pas l'anion tétraphénylborate dans leur structure. Cette hypothèse pourrait aussi s'appliquer à d'autres agents antimicrobiens, et c'est pour cette raison particulière que nous avons aussi dévoué certains efforts à l'introduction d'une fonctionnalité azoture à l'anion tétraphénylborate dans la deuxième partie de ce chapitre. La fonction azoture est très populaire pour la conjugaison de drogues utilisant la chimie click [99]. L'introduction d'une fonction alcyne terminale a par exemple déjà été rapportée pour certains antibiotiques utilisés dans le traitement des infections aux *Neisseiria* pathogènes [133], et permettrait leur conjugaison à un anion tétraphénylborate comportant une fonction azoture via la chimie click.

### **4.1 Synthèse d'un ligand de type base de Schiff comportant un motif tétraphénylborate et tentatives de complexation au ruthénium**

La première fonctionnalisation effectuée fut la préparation d'un ligand de type base de Schiff. C'est une fonction couramment retrouvée en chimie organométallique car l'azote de l'imine est basique, allouant la coordination à de nombreux métaux. De plus, celles-ci ont démontré un large panel d'applications biologiques [132].

#### 4.1.1 Voie de synthèse #1 pour la formation du ligand de type base de Schiff

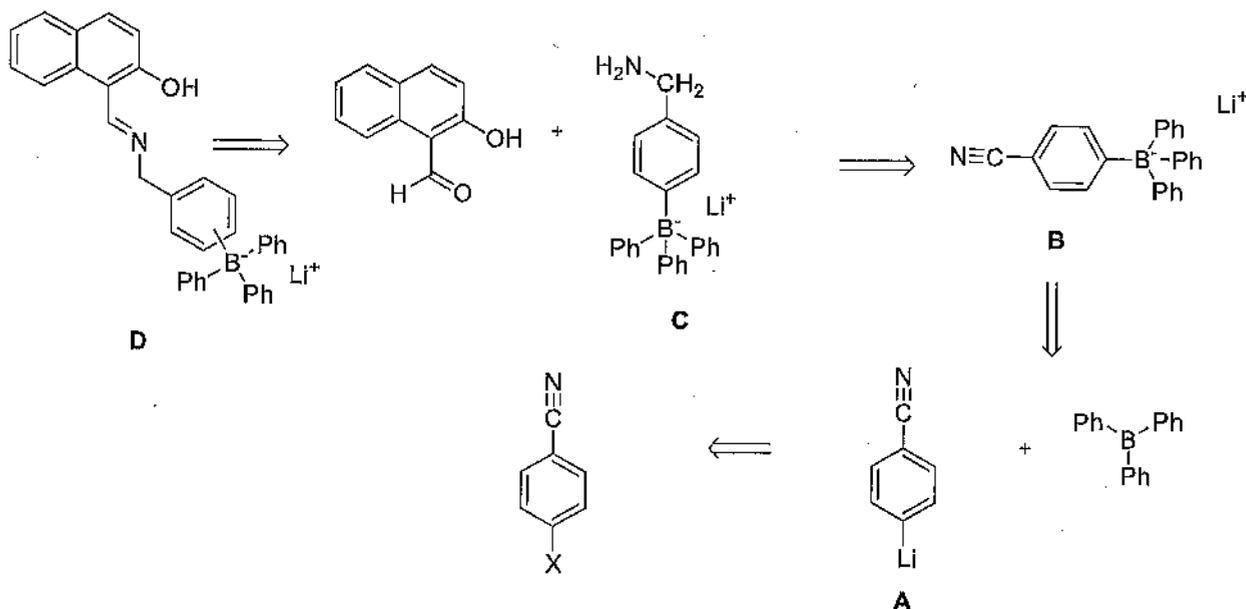
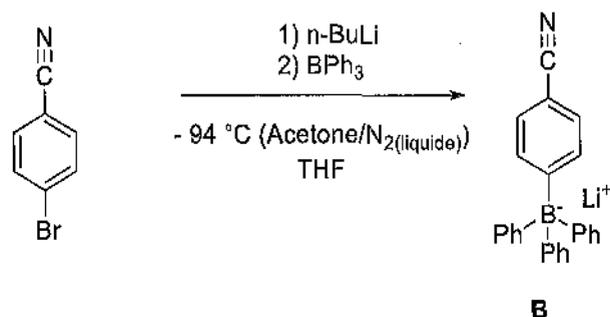


Schéma 7. Voie rétrosynthétique #1 d'un ligand de type base de Schiff comportant un motif tétraphénylborate.

La première voie de synthèse envisagée est illustrée par le Schéma 7. Le ligand **D** proviendrait de la condensation (formation de la base de Schiff) du 2-hydroxy-1-naphtaldéhyde et de l'amine fonctionnalisée **C**, qui serait elle-même obtenue par la réduction du nitrile correspondant **B**, une interconversion fonctionnelle répandue [134], [135]. Ce dernier résulterait de l'addition d'un synthon **A** (provenant d'un dérivé halogéné) au triphénylborane.

#### Préparation du (4-cyanophényl)triphénylborane **B**

La première synthèse effectuée a donc été celle de l'addition de l'organométallique correspondant du para-bromobenzonitrile sur le triphényle borane. Cette réaction permet de former le tétraphénylborate comportant une fonction nitrile, un intermédiaire requis dans la voie de synthèse proposée pour ce ligand. Il est à noter que cette molécule est intéressante aussi du point de vue de l'étude de l'influence de la modification d'un seul groupement phényle de l'anion tétraphénylborate sur son activité antimicrobienne. La préparation de cette molécule est d'autant plus motivée que le groupement nitrile a déjà démontré certaines capacités pour accroître l'activité de molécules antibactériennes [136]. Son activité antibiotique n'a toutefois pas encore été testée.

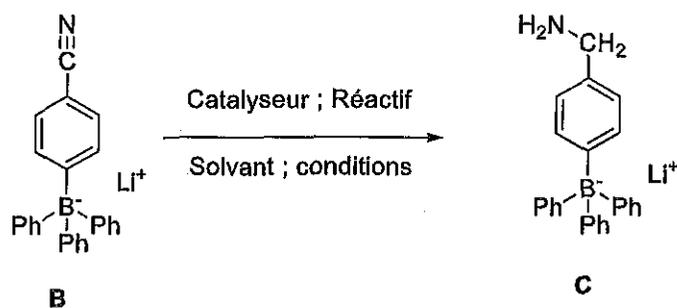


**Schéma 8. Préparation du (4-cyanophényl)triphénylborate B.**

Cette première étape fut réalisée dans un bain d'acétone. L'addition en quantité équimolaire de para-bromo-benzonitrile et nBuLi a conduit à la formation *in situ* du lithien **A**, suivie par l'addition du triphénylborane, menant au composé **B** (schéma 8). Un contrôle sur CCM démontre une conversion totale des réactifs. Le spectre RMN confirme l'obtention du produit attendu par l'apparition de massif caractéristique du  $^3J$   $^{11}\text{B}-^1\text{H}$  du tétraphénylborate (voir annexe). L'analyse HRMS (+) montre les cations  $[\text{M}+2\text{Na}]^+ \pm 1.78$  ppm et  $[2\text{M}+3\text{Na}]^+ \pm 0.59$  ppm. Le produit est un solide blanc, il coordonne très facilement les solvants ayant des doublets non liants tels que le THF ou l' $\text{Et}_2\text{O}$ , isolé dans ce cas sous forme d'huile rouge. L'utilisation d'ultrasons aide à la solubilisation du THF chélaté dans l'hexane et l'obtention du solide. La préparation de ce composé s'avère très sensible. La précipitation du produit dans un mélange de DCM et d'hexane permet d'éliminer l'excès de THF, mais deux équivalents restant coordonnés avec le contre-ion lithium sont visibles par RMN  $^1\text{H}$ . **B** est peu stable, se dégrade en une huile jaune au bout de quelques heures à l'air libre et un mois sous atmosphère inerte.

### **Préparation du [4-(aminométhyl)phényl]triphénylborane C**

La seconde réaction a nécessité plusieurs tentatives de réduction du nitrile par des réactifs conventionnels ainsi que par l'action de catalyseurs. Cette réaction permet de former le tétraphénylborate comportant une amine, fonctionnalité nécessaire afin d'effectuer la dernière étape de formation de la base de Schiff.



#	Réactif	Solvant	Catalyseur	Conditions
1	3 eq. LiBH <sub>4</sub>	THF		5 heures ; 110 °C
2	3 eq. LiBH <sub>4</sub>	THF - MeOH		5 heures ; 110 °C
3	1 eq. LiAlH <sub>4</sub>	THF		1 à 16 heures
4	1 eq. LiAlH <sub>4</sub>	Et <sub>2</sub> O		1 à 16 heures
5	1 eq. LiAlH <sub>4</sub>	THF		1 à 16 heures ; 110 °C
6	1eq. LiAlH <sub>4</sub>	Et <sub>2</sub> O		1 à 16 heures ; 110 °C
7	Isopropanol		0.05 à 0.02 % Sadler ; NaOH	0,5 à 72 heures
8	Isopropanol		0.05 à 0.02 % Sadler ; tBuOK	0,5 à 72 heures
9	Isopropanol		0.05 à 0.02 % Sadler ; NaOH	0,5 à 72 heures, 110 °C
10	Isopropanol		0.05 à 0.02 % Sadler ; tBuOK	0,5 à 72 heures, 110 °C
11	7 eq. NaBH <sub>4</sub> CoCl <sub>2</sub>	EtOH		6 - 24 heures
12	7 eq. NaBH <sub>4</sub> CuCl <sub>2</sub>	EtOH		6 - 24 heures
13	7eq. NaBH <sub>4</sub> NiCl <sub>2</sub>	EtOH		6 - 24 heures
14	7eq. NaBH <sub>4</sub> ZnCl <sub>2</sub>	EtOH		6 - 24 heures

**Tableau 3. Conditions utilisées pour la réduction du (4-cyanophényl)triphénylborate de lithium.**

La réduction de **B** a d'abord été abordée avec des donneurs d'hydrures classiques. La disparition du pic du produit de départ ( $m/z = 344,2$ ) a été suivie par spectrométrie de masse. Aucune conversion n'a été observée avec le borohydrure de lithium dans le THF, ou par activation avec une goutte de méthanol (tableau 3, entrées 1 & 2) [137]. Par la

suite, l'utilisation de tétrahydroaluminat de lithium a été tentée dans différents milieux et à différentes températures [138]. Dans le THF, on observe une faible conversion (tableau 3, entrées 3 et 5). L'Et<sub>2</sub>O mène à une meilleure conversion (tableau 3, entrées 4 & 6). Cependant, aucun d'entre eux ne mène aux produits souhaités. Due à la faible efficacité des hydrures classiques, une tentative de transfert d'hydrogène est effectuée avec le catalyseur de Sadler dans l'isopropanol avec deux bases différentes (tableau 3, entrées 7 & 10), mais malheureusement aucune de ces conditions n'a permis la réduction de la fonction nitrile. Le 2-butanol pourrait être un meilleur solvant de réaction [135]. La dernière tentative de réduction a porté sur l'utilisation des chlorures de cuivre, cobalt, nickel et zinc avec un large excès de borohydrure de sodium [139]. Les deux premiers sels offrent de meilleures conversions du produit de départ. L'utilisation de chlorure de nickel ou de cobalt mène à des rendements bruts obtenus inférieurs à 5 %. De plus, **B** ne peut être obtenu en suffisamment grande quantité pour pallier le faible rendement de cette réduction dû au prix élevé du triphénylborane. Après analyse des dernières options pour réduire le composé, seules des techniques d'hydrogénation catalytique par autoclave semblent viables mais difficiles à mettre en œuvre pour des raisons de sécurité.

#### 4.1.2 Voie de synthèse #2 pour la formation du ligand de type base de Schiff

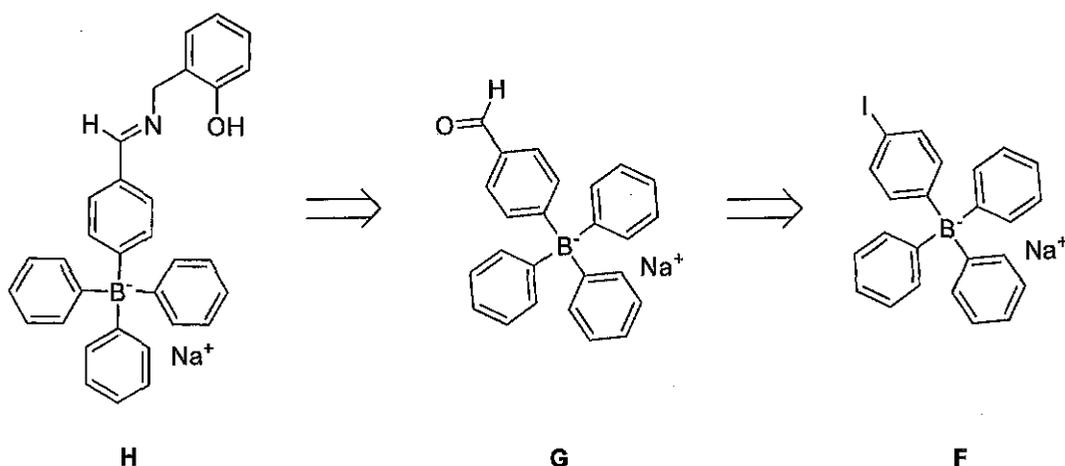
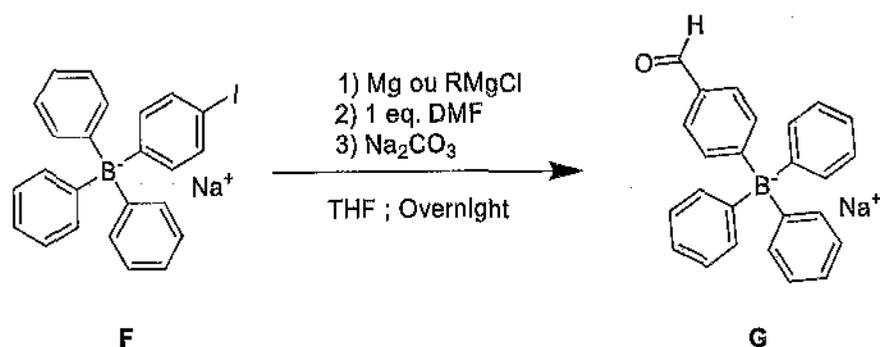


Schéma 9. Voie rétrosynthétique #2 d'un ligand de type base de Schiff comportant un motif tétraphénylborate.

Une alternative envisagée consisterait à inverser les fonctions amine et aldéhyde **H** en introduisant une fonction aldéhyde sur un des groupements phényles du

tétraphénylborate **G**. Le (4-iodophényl)triphénylborate de sodium **F** pourrait être utilisé pour former un aldéhyde par le procédé de synthèse d'aldéhyde Bouveault. L'obtention d'une fonction aldéhyde permettrait aussi de tirer avantage de la grande variété de réactivité de la fonction aldéhyde [140]. La préparation de **F** est réalisée depuis le diiodobenzène par la méthode décrite au chapitre 1.



#	Réactif	Solvant	Température
1	iPrMgCl	THF	- 50 °C and ta.
2	iPrMgCl . LiCl	THF	ta.
3	Mg	THF	Reflux
4	MeMgBr	THF	ta.

**Tableau 4. Conditions réactionnelles d'activation du (4-iodophényl)triphénylborate.**

C'est une synthèse *one-pot* d'aldéhyde depuis un dérivé halogéné, impliquant des conditions auxquelles le borate ne serait pas sensible. Il implique la formation *in situ* du réactif de Grignard correspondant de l'aldéhyde puis son addition sur le DMF. Le dérivé iodé a été choisi car il est celui qui est le plus susceptible à l'insertion de métal dans la liaison halogène-carbone. Ici, la formation du réactif de Grignard ne fonctionne pas par la voie classique (tableau 4, entrée 1) et mène à la dégradation du produit iodé. Le même résultat est obtenu par échange de magnésium avec le MeMgBr (tableau 4, entrée 2). Le iPrMgCl est décrit comme plus réactif (tableau 10, entrée 3), de même avec la réaction catalysée par le lithium (tableau 4, entrée 4). Le produit iodé de départ est toujours visible après extraction liquide-liquide par spectrométrie de masse. Aucune conversion n'est observée.

### 4.1.3 Voie de synthèse #3 pour la formation du ligand de type base de Schiff

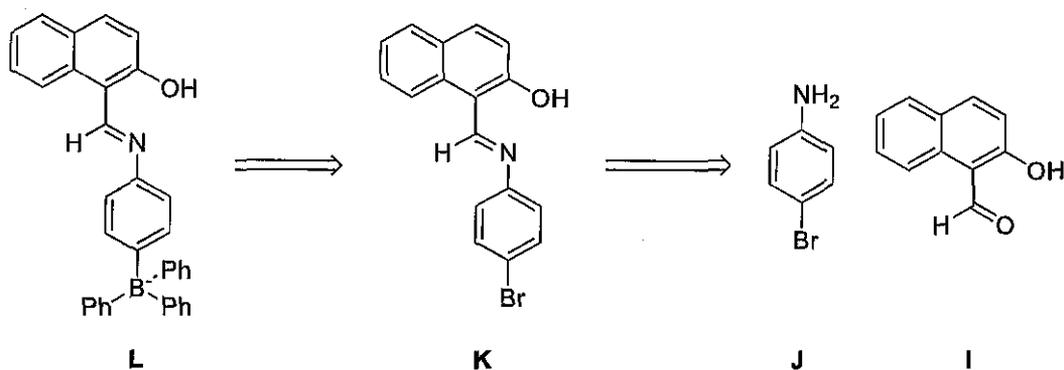


Schéma 10. Voie rétrosynthétique #3 d'un ligand de type base de Schiff comportant un motif tétraphénylborate.

La dernière option envisagée dans le schéma 10 fut la fonctionnalisation d'une base de Schiff déjà formée. Le ligand **L** serait synthétisé par addition de **K** sur du triphénylborane, qui serait lui-même obtenu par condensation des produits commerciaux **J** et **I**.

#### Préparation du 1-[(1E)-[(4-bromophényl)imino]méthyl]naphthalène-2-ol **K**

La première étape de synthèse est effectuée dans des conditions classiques de préparation de base de Schiff et **K** est obtenu avec un rendement de 81 % par simple filtration du milieu réactionnel (schéma 11).

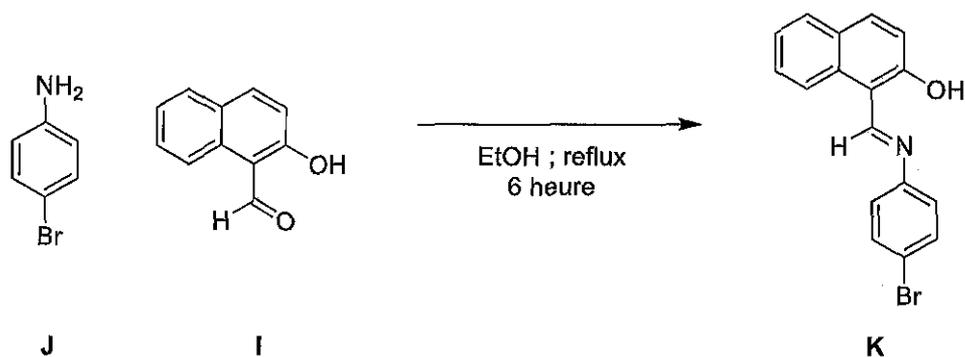


Schéma 11. Préparation du 1-[(1E)-[(4-bromophényl)imino]méthyl]naphthalène-2-ol **K**.

Le produit est caractérisé par spectrométrie de masse et RMN 1D et 2D. Les fragments  $[M+H]^+$  (327 m/z) et  $[2M+H]^+$  (653 m/z) confirment l'obtention d'un composé avec une masse attendue.

## Préparation du

### {4-[(E)-[(2-hydroxynaphthalèn-1 yl)méthylidène]amino]phényl}triphénylborate L

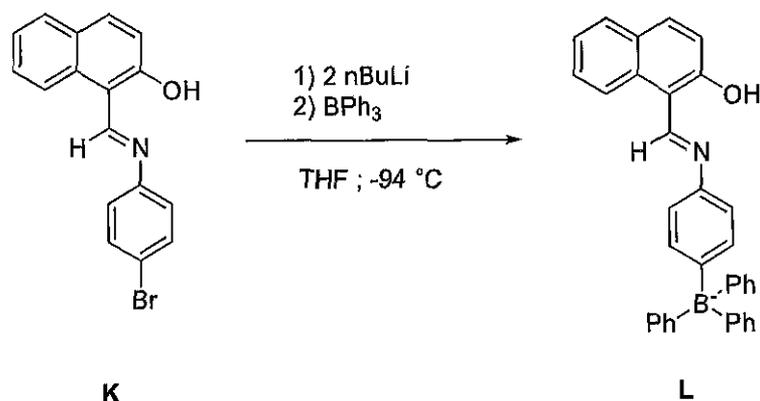
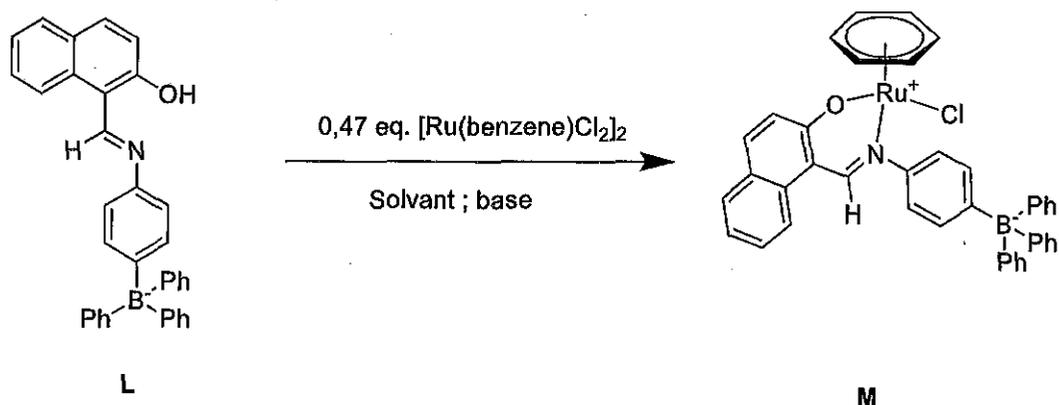


Schéma 12. Préparation du ligand de type base de Schiff D comprenant un anion tétraphénylborate.

La préparation du ligand a révélé la présence de trois composés par CCM en phase inverse. Un des trois composés s'est avéré être une impureté apolaire qui fut éliminée sur colonne chromatographique en phase normale, par la suite L est isolé avec une seconde impureté, qui est enlevée par chromatographie en phase inverse. Cette étape de purification sur phase normale est essentielle à la purification sur phase inverse.

Afin d'optimiser les conditions de réaction pour obtenir un meilleur rendement, le nombre d'équivalents de triphénylborane, la température du milieu est passée à -94 °C, et le milieu réactionnel est dilué. Ces trois conditions influencent faiblement le rendement. Le dernier point testé est la vitesse d'addition du triphénylborane, de 5 minutes à 30 minutes. Il est nécessaire de faire attention à l'ensemble des paramètres de synthèse afin d'obtenir une addition de lithien souhaité. Dans le cas contraire il y a apparition de butyltriphénylborate, des résidus de N-addition, O-addition et de dégradation de la base de Schiff. Un solide orange vif a été obtenu et des analyses complémentaires ont été effectuées afin de caractériser le composé : analyse élémentaire, RMN, HRMS et ICP-MS ont été réalisées afin de valider sa structure et la nature de son contre-ion. L'analyse ICP-MS a révélé un ratio de 65 % de sodium et 35 % de lithium, indiquant une masse pondérée finale de 505.42 g.mol<sup>-1</sup> pour ce composé.

#### 4.1.4 Tentatives de complexation du ligand de type base de Schiff au ruthénium



#	Solvant	Base	Conditions
1	EtOH	3 eq. Et <sub>3</sub> N	5 heures, ta.
2	EtOH	3 eq. K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 heures, ta.
3	ACN	3 eq. Et <sub>3</sub> N	5 heures, ta.
4	DCM	3 eq. Et <sub>3</sub> N	5 heures, ta.

Tableau 5. Conditions de complexation du ligand de type base de Schiff.

De très faibles quantités du ligand de type base de Schiff ont été isolées et de ce fait peu d'essais de complexation ont été tentés. Malheureusement, aucun d'entre eux n'ont permis d'isoler un complexe pur. Toutefois, une réaction menée dans le DCM a résulté, après recristallisation, en un produit qui pourrait correspondre au complexe isolé (tableau 4, entrée 4). Le spectre RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (figure 16) pourrait en fait correspondre à la structure du complexe de ruthénium. Un singulet de l'arène à 5,32 ppm et de la base de Schiff à 8,72 ppm ont des intégrations concordantes mais la structure n'a pu être confirmée par spectrométrie de masse. La présence de 1,4 équivalent d'un triéthylammonium n'a pu être éliminée et ce même après de nombreuses recristallisations successives. La quantité obtenue étant inférieure à 5 mg pour un rendement brut de 20 %. Il serait difficile d'augmenter l'échelle de synthèse au vu de la difficulté que représente l'isolation du ligand fonctionnalisé. De ce fait, l'isolation de ce complexe a été abrogée au profit d'autres voies de synthèse mais aura permis de démontrer qu'il semble possible de complexer une base de Schiff comportant un anion tétraphénylborate.

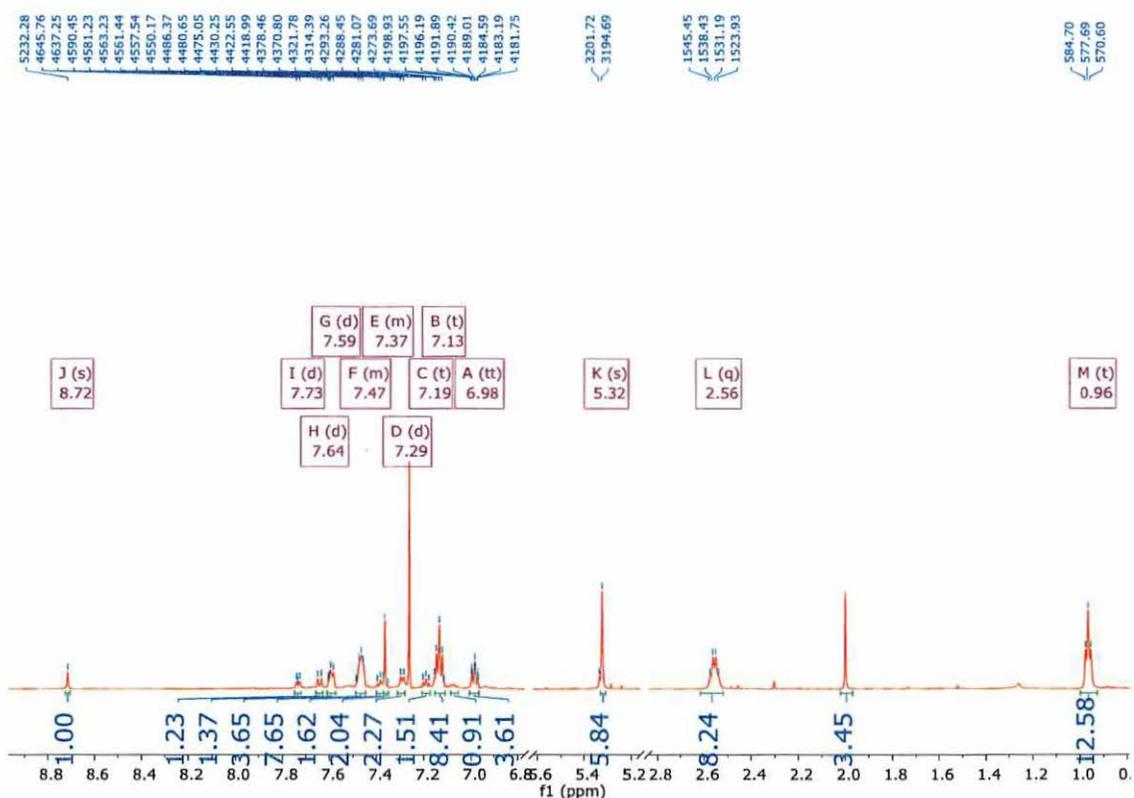


Figure 16. Spectre RMN 1D  $^1\text{H}$  du produit réactionnel brut M dans le  $\text{CDCl}_3$ .

## 4.2 Synthèse d'un anion tétraphénylborate comportant une fonction azoture

Nous avons tenté de préparer un organoborate comportant une fonction azoture afin de réaliser des cycloadditions 1-3 dipolaires "réaction click". Cette réaction s'effectue en conditions douces et permet de *clicker* le porteur de l'azide avec un alcyne [99]. Elle est rapide et génère peu de sous-produits. De nombreuses applications pourraient en découler telle que la préparation d'antibiotiques fonctionnalisés, de nanoparticules, de sondes fluorescentes ou bien de complexes organométalliques. De plus, ce couplage croisé a déjà pu être réalisé sur des motifs moléculaires apparentés aux halogénures d'aryle et aux trifluoroazidoarylborates [141]. L'anion azoture est un bon nucléophile capable de substituer des halogènes aromatiques, benzyliques ou bien aliphatiques.

#### 4.2.1 Synthèse par substitution aromatique

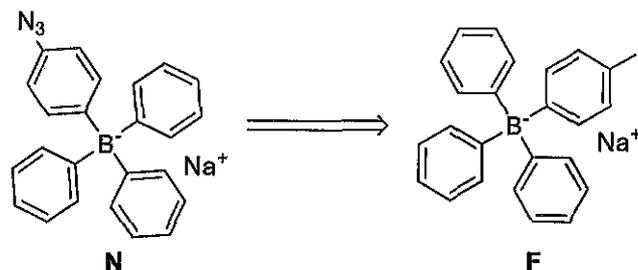
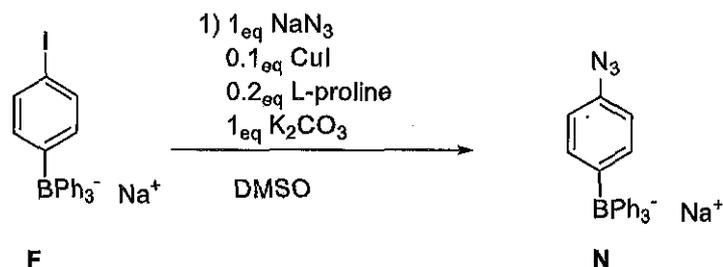


Schéma 13. Voie rétrosynthétique d'un dérivé tétraphénylborate contenant une fonction azoture par substitution aromatique.

L'azoture **O** pourrait être obtenu par substitution nucléophile aromatique depuis **F**. La préparation de **F** est discutée dans le chapitre 1.



#	Conditions
1	16 heures ; 90 °C
2	16 heures, 150 °C

Tableau 6. Substitution électrophile aromatique du (4-iodophényl)triphénylborate.

Cette réaction fut adaptée d'une préparation *one-pot* d'un azidoaryltrifluoroborate [141] depuis un **F**. Aucun avancement ne fut observé par spectrométrie de masse quand la réaction fut effectuée à 90 °C. Lorsque le milieu est porté à 150 °C, la dégradation du produit de départ est observée.

#### 4.2.2 Synthèse par substitution benzylque

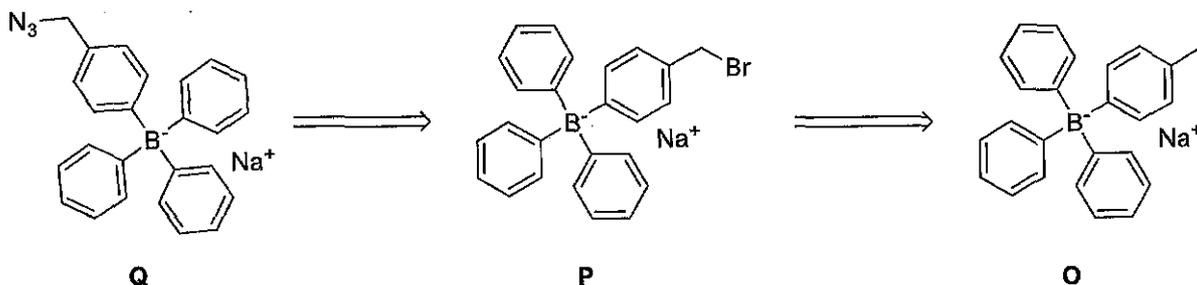


Schéma 14. Voie rétrosynthétique de la préparation d'un dérivé tétraphénylborate contenant une fonction azoture par substitution benzylque.

L'azide **Q** pourrait être produit par une substitution benzylque de **P**, cette position étant nettement plus prompte à une substitution. **P** pourrait être produit depuis **O** selon la méthode publiée dans les deux brevets décrits [97], [98]. La préparation de **O** est discutée dans le chapitre 1.

#### Préparation du composé P

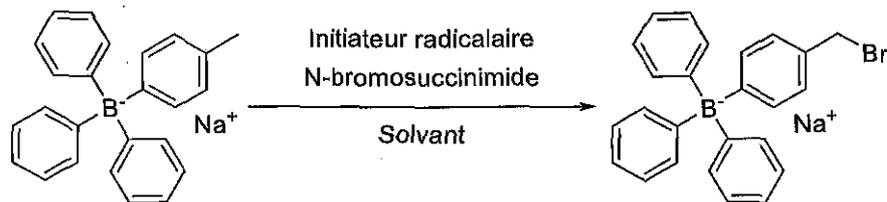


Schéma 15. Préparation du (4-bromure de benzyle)triphénylborate de sodium.

#### Synthèse en suivant un protocole décrit dans un brevet

Ces deux brevets décrivent l'obtention avec 1 mol% d'AIBN comme initiateur radicalaire, 1,9 équivalents de NBS après 8 heures de réaction à 80 degrés Celsius [97], [98] (schéma 15). Le tétrachlorure de carbone ayant une température d'ébullition de 76 °C, la réaction est réalisée en tube scellé afin d'augmenter la pression et d'obtenir une température de 80 °C. Après 24 heures, aucune conversion n'est observée et le produit de départ est récupéré, assumé par 1D <sup>1</sup>H RMN et spectrométrie de masse. Nous avons réalisé un *screening* des solvants utilisables, et vérifié la conversion par LC-MS. Les solvants chlorés ont été essayés dans un premier temps (tableau 6, entrée 2 et 3). L'ACN, le THF et le THF supplémenté en eau n'ont démontré aucune conversion (tableau 6, entrée 4 à 6).

#	Réactif	Solvant	Initiateur radicalaire	Température
1	1.9 <sub>eq</sub> NBS	CCl <sub>4</sub>	1 mol% AIBN	80 °C
2	1.9 <sub>eq</sub> NBS	DCM	1 mol% AIBN	40 °C
3	1.9 <sub>eq</sub> NBS	CHCl <sub>3</sub>	1 mol% AIBN	60 °C
4	1.9 <sub>eq</sub> NBS	ACN	1 mol% AIBN	80 °C
5	1.9 <sub>eq</sub> NBS	THF	1 mol% AIBN	66 °C
6	1.9 <sub>eq</sub> NBS	Eau/THF 1/99 (v/v)	1 mol% AIBN	66 °C

**Tableau 7 Bromation radicalaire du tolyltriphénylborate de sodium avec différents solvants. Adapté de conditions publiées [97], [98].**

Par la suite, la quantité d'initiateur radicalaire est augmentée de 1 mol% à 20 mol% avec les mêmes solvants (tableau 7, entrées 7 à 12). Aucune conversion n'a pu être observée avec ceux-ci ainsi qu'avec la majeure partie des solvants permettant ce type de réaction (tableau 7, entrées 13 à 17). La synthèse dans un réacteur à micro-ondes a été essayé sur des solvants courants (tableau 8, entrées 18 à 22). L'utilisation combinée de l'activation micro-ondes et AIBN ne fonctionne pas non plus (tableau 8, entrées 23 et 24). L'activation micro-ondes a été tentée à plus haute température pour le DMSO et mène à la dégradation du produit (tableau 8, entrées 25). Une dernière option d'activation a été essayée avec le peroxyde de benzoyle bien qu'étant oxydant et notre composé sensible à l'oxydation. Le borate se dégrade, formant un précipité noir avec 1 mol% comme 20 mol% (tableau 9, entrées 26 à 28). Le borate semble insensible aux réactions radicalaires et il semble peu probable d'obtenir une position benzylique activée par bromation radicalaire.

#	Réactif	Solvant	Initiateur radicalaire	Conditions
7	1.9 <sub>eq</sub> NBS	CCl <sub>4</sub>	20 mol% AIBN	76 °C
8	1.9 <sub>eq</sub> NBS	DCM	20 mol% AIBN	40 °C
9	1.9 <sub>eq</sub> NBS	CHCl <sub>3</sub>	20 mol% AIBN	60 °C
10	1.9 <sub>eq</sub> NBS	ACN	20 mol% AIBN	80 °C
11	1.9 <sub>eq</sub> NBS	THF	20 mol% AIBN	66 °C
12	1.9 <sub>eq</sub> NBS	Eau/THF 1/99 (v/v)	20 mol% AIBN	66 °C

#	Réactif	Solvant	Initiateur radicalaire	Conditions
13	1.9 <sub>eq</sub> NBS	MeOH	20 mol% AIBN	64 °C
14	1.9 <sub>eq</sub> NBS	DMSO	20 mol% AIBN	90 °C
15	1.9 <sub>eq</sub> NBS	DMF	20 mol% AIBN	90 °C
16	1.9 <sub>eq</sub> NBS	Et <sub>2</sub> O	20 mol% AIBN	30 °C
17	1.8 <sub>eq</sub> NBS	AcOEt	20 mol% AIBN	Reflux

Tableau 8. Bromation radicalaire de O avec différent solvants et vingt fois plus d'initiation radicalaire. Adapté de conditions publiées [97], [98].

#	Réactif	Solvant	Initiateur radicalaire	Conditions
18	1.9 <sub>eq</sub> NBS	AcOEt	Microwave 400 W	90 °C
19	1.9 <sub>eq</sub> NBS	ACN	Microwave 400 W	90 °C
20	1.9 <sub>eq</sub> NBS	MeOH	Microwave 400 W	90 °C
21	1.9 <sub>eq</sub> NBS	Eau/THF 1/99 (v/v)	Microwave 400 W	90 °C
22	1.9 <sub>eq</sub> NBS	DMSO	Microwave 400 W	90 °C
23	1.9 <sub>eq</sub> NBS	DMSO	Microwave 400 W + 20 mol% AIBN	90 °C
24	1.9 <sub>eq</sub> NBS	CCl <sub>4</sub>	Microwave 400 W + 20 mol% AIBN	90 °C
25	1.9 <sub>eq</sub> NBS	DMSO	Microwave 400 W	180 °C

Tableau 9. Bromation radicalaire de O de sodium par activation micro-onde.

#	Réactif	Solvant	Initiateur radicalaire	Conditions
26	1.9 <sub>eq</sub> NBS	CCl <sub>4</sub>	1 mol% Peroxyde de benzoyle	Reflux
27	1.9 <sub>eq</sub> NBS	CCl <sub>4</sub>	20 mol% Peroxyde de benzoyle	Reflux
28	1.8 <sub>eq</sub> NBS	AcOEt	20 mol% Peroxyde de benzoyle	Reflux

Tableau 10. Bromation radicalaire de O de sodium initiée par le peroxyde de benzoyle.

## 5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Au cours de cette étude, nous avons évalué la possibilité d'obtenir des analogues du tétraphénylborate de sodium ayant des propriétés biologiques améliorées. Nous avons émis l'hypothèse, dans un premier temps, que l'apport de modifications mineures pourrait moduler les propriétés biologiques de la molécule afin d'obtenir une plus large marge thérapeutique.

La formation, lors de l'étape finale, d'un tétraorganoborate de sodium a été achevée avec l'addition d'organomagnésien sur le triphénylborate. Le protocole mis au point est transposable à une addition sur un organotrifluoroborate de potassium ou bien un diorganotrifluoroborate de potassium. Le passage par un intermédiaire organolithien fonctionne avec des rendements comparables mais n'a été utilisé que lorsque l'organomagnésien n'était pas une solution envisageable. Une librairie de 17 organoborates a été préparée avec cette méthode. La lipophilie de chacune de ces molécules a été contrôlée afin d'établir une corrélation entre celles-ci et l'activité biologique observée.

Pour évaluer le potentiel des borates préparés au cours de ce projet en tant que nouvelles molécules antibiotiques, nous avons comparé l'activité antimicrobienne et la toxicité de plusieurs d'entre eux. L'évaluation de leur activité antimicrobienne a été réalisée en déterminant la plus petite concentration permettant d'inhiber la croissance de *Neisseria meningitidis*. Le tétraphénylborate de sodium s'est avéré bien moins efficace que la plupart des analogues préparés, ce qui pourrait s'expliquer par sa faible lipophilie. L'activité antibactérienne des borates étudiés semble être dépendante de leur lipophilie mais, bien entendu, jusqu'à un certain point car le manque de solubilité aqueuse des composés très lipophiles représente une limitation. En effet, l'hexyltriphénylborate de sodium est la molécule ayant démontré la plus importante activité antimicrobienne parmi tous les composés, bien qu'elle ne soit pas la plus lipophile. Il est intéressant de noter que plusieurs structures ont démontré une activité supérieure ou égale à l'érythromycine, un antibiotique parfois utilisé pour le traitement des *Neisseria* pathogènes. Bien que le mode d'action exact du tétraphénylborate demeure inconnu, certains indices semblent indiquer qu'il soit lié à la membrane de la bactérie. De ce fait, la toxicité sur l'érythrocyte humain a été mesurée afin d'observer l'existence d'une toxicité membranaire apparentée. Après un temps de contact court,

seules trois molécules se sont avérées toxiques, tandis qu'après un temps de contact prolongé, un lien entre la toxicité sur l'érythrocyte humain et la lipophilie de plusieurs borates a été noté. Il est aussi important de noter qu'uniquement l'octyltriphénylborate de sodium s'est avéré plus toxique que l'amphotéricine B, un composé connu pour sa toxicité sur l'érythrocyte humain, mais tout de même couramment administré en clinique. La toxicité *in vivo* a été évaluée sur le développement embryonnaire du poisson-zèbre. De façon intéressante, les composés testés ont développé des effets secondaires différents du tétraphénylborate de sodium. À lipophilie identique, le taux de mortalité s'est en général avéré supérieur pour les borates comportant une chaîne alcane. Les chaînes alcanes retardent modérément l'éclosion du poisson-zèbre tandis que les composés fluorés la retardent encore plus. Ces observations ont démontré que les modifications choisies modifient grandement les paramètres pharmacodynamiques et cinétiques. De ce fait, le comportement de chacun des borates *in vivo* présente des différences importantes, ce qui ouvre une voie vers diverses opportunités pour leur utilisation thérapeutique.

Cette première étude démontre que le tétraphénylborate de sodium est faiblement actif comparativement à d'autres molécules facilement accessibles, cependant l'ensemble de ces structures sont simples et n'apporte que peu de diversité ou d'approches innovantes possibles. Dans un second temps nous avons émis l'hypothèse que des structures connues pour leur propriété biologique avantageuse permettraient d'obtenir des molécules bien meilleures. Les deux facteurs ayant limité cette étude sont, d'une part, la méconnaissance du mécanisme d'action empêchant la conception d'une molécule "sur mesure" à la cible, et d'autre part, l'existence d'un faible nombre de moyens qui pourraient permettre de préparer ou bien de fonctionnaliser la molécule cible. Il a été montré que le borate inhibe la réactivité des fonctions chimiques. L'explication la plus probable serait que la charge négative du bore présente pourrait augmenter la barrière énergétique nécessaire à développer un état de transition chargé pour la réduction du nitrile, l'insertion du magnésium et la substitution nucléophile aromatique.

Finalement, les tétraorganoborates s'inscrivent dans une application d'intérêt et s'avèrent être faiblement toxiques sur les modèles sains testés. Ils démontrent un intérêt pour leur sélectivité et leurs modes d'action singulier qui devraient en découler. Ceci pourrait mener à une avancée majeure dans la lutte contre *Neisseria meningitidis* et *gonorrhoeae*. Cette étude démontre que des structures analogues au tétraphénylborate

de sodium ont une activité *in vitro* supérieure tout en ayant une toxicité bien différente *in vivo*. Les difficultés synthétiques soulevées par ce groupement chimique entravent le développement de nombreuses structures qui pourraient démontrer une meilleure activité biologique. Afin de pallier ce problème, il pourrait être intéressant de chercher si l'utilisation d'organométalliques moins réactifs comme les organozinciques ou bien les organocadmiens pourrait être avantageuse. Ceux-ci permettraient la préinsertion d'une fonction aldéhyde pouvant participer à de nombreuses réactions dans des conditions douces. Certaines des molécules préparées seront sélectionnées et testées sur un modèle d'infection murin dans les mois à venir afin de valider le potentiel de cette famille de molécules dans la lutte contre l'antibiorésistance.

## 6 APPENDICE 1 : PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES DES COMPOSÉS RAPPORTÉS DANS LE CHAPITRE 2

---

### General procedure

All chemicals including were purchased from commercial sources and used without further purification. Reactions were performed under an inert atmosphere of nitrogen using Schlenk techniques and solvents were dried using a solvent purification system (Pure Process Technology). NMR spectra ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , COSY, HSQC, and HMBC) were recorded using a 600 MHz Bruker Avance III NMR spectrometer (QCI cryoprobe, 3mm NMR tubes, 25°C). Chemical shifts ( $\delta$ ) and coupling constants are expressed in ppm and Hz, respectively.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  spectra were referenced to solvent resonances, and spectral assignments were confirmed by 2D experiments. It is noteworthy that due to coupling, the signals corresponding to carbons that are directly linked to boron could sometimes not be observed in the  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  spectra, but their presence could be confirmed from 2D spectra. High-resolution and high accuracy mass spectra (HR-ESI-MS) were obtained using an Exactive Orbitrap spectrometer from ThermoFisher Scientific (Department of Chemistry, McGill University). A Perkin Elmer Nexion 300X ICP mass spectrometer was used for the determination of sodium and lithium levels (Department of Chemistry, Université de Montréal). Microwave syntheses were performed using a CEM explorer SP 12 hybrid system. (benzene)ruthenium dichloride dimer was prepared according a literature procedure [142].

### Synthesis of B, lithium (4-cyanophenyl)triphenylborane

*p*-bromobenzonitrile (444 mg, 2.44 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was cooled to 84 °C (acetone/liquid N<sub>2</sub>). *n*-BuLi (1.52 mL of a 1.6 M solution, 2.44 mmol) was added dropwise to the cooled solution over about 5 min. The red solution was stirred for 40 min at -84 °C and BPh<sub>3</sub> was added (9.6 mL of a 0.25 M solution in THF) dropwise over 5 min. The solution was kept at -84 °C for 2 h and was then allowed to slowly return to room temperature overnight. 60 mL of hexanes were added, and the solution was placed in an ultrasound bath for 30 sec. The solution was decanted (5 times) over 30 min and the supernatant was removed. The resulting white precipitate was dried under vacuum (0.700 g, 58 %).  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 6.82 (tt,  $J = 7.2, 1.4$  Hz, 4H), 6.96 (t,

$J = 7.7$  Hz, 6H), 7.25 – 7.30 (m, 8H), 7.48 – 7.52 (m, 2H). HR-ESI-MS  $m/z$  (+): 390,1399 [M+2Na]<sup>+</sup> (Calc 390.1400;  $\Delta$ 1.78 ppm).

### **Synthesis of C, (4-aminophenyl)triphenylborane**

#### **Procedure for entries 1 to 6**

A solution of **B** (50 mg, 0.101 mmol) in THF (5 mL) was cooled to 0 °C. of LiBH<sub>4</sub> (5mL of a 0.02 to 0.06 M solution in THF or Et<sub>2</sub>O) were added dropwise. The mixture was heated up to 110 °C (entries 1, 2, 5 and 6) and stirred for 1–16 h in a seal vial. The reaction was following by HPLC-MS. The solution was extracted using ethyl acetate. The resulting mixture was dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent evaporated under vacuum. A residual yellow oil was obtain.

#### **Procedure for entries 7 to 10**

A solution of **B** (50 mg, 0.101 mmol), 2 mol% of Sadler's catalyst (2 mg, 2 nmol) and 0,1 eq. of a NaOH or tBuOK (5mL of a 2 mM solution in isopropanol). The mixture was heated up to 110 °C (entries 9 and 10) and stirred in a seal vial. The solution was then extracted using ethyl acetate. The resulting mixture was dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent evaporated under vacuum. A residual yellow oil was obtained, **C** wasn't observed by HPLC-MS.

#### **Procedure for entries 11 to 14**

A solution of **B** (25 mg, 0.51 mmol) and MCl<sub>2</sub> (0.51 mmol) salt in ethanol (2.5 mL) was added dropwise sodium borohydride (2.5 mL of a 1.5 M in EtOH). The solution was stirring during 6 to 24 hours and then extract using ethyl acetate, dry with MgSO<sub>4</sub> and evaporate under vaccum.

### **Synthesis of G, sodium 4-formylphenyl triphenylborate**

#### **Procedure for entry 3**

Magnesium turnings (50 mg, 0.23 mmol) were heated at 120 °C under reduced pressure for 1 h. THF (5 mL) was added followed by the addition of a small crystal of diiodine and sodium **P** (100 mg, 0.21 mmol). The reaction mixture was brought to a boil for 3 h, cooled to room temperature and DMF (168 mg, 2.30 mmol) was added. sodium carbonate (1 mL of a 0.5 M solution) solution were then added. The mixture was

extracted with ethyl acetate and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting oil was analysed by mass spectrometry.

#### **Procedure for entries 1, 2 and 4**

**P** (100 mg, 0.21 mmol) in THF (5 mL) was cooled to  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  or left at room temperature. The Grignard reagent was added dropwise (5 mL of a 0.046 M solution in THF) and the reaction mixture was stirred for 3 h, cooled to room temperature and DMF (168 mg, 2.30 mmol) was added. sodium carbonate (1 mL of a 0.5 M solution) solution were then added. The mixture was extracted with ethyl acetate and the solvent evaporated under vacuum. The resulting oil was analyzed by mass spectrometry.

#### **Synthesis of K, 1-[(1E)-[[4-bromophenyl]imino]methyl]naphthalen-2-ol**

2-hydroxy-1-naphthaldehyde (850 mg, 4.49 mmol) in ethanol (15 mL) was added p-bromobenzylamine (851 mg, 4.49 mmol) and bring to reflux for 6 h. The middle was place at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight. The yellow precipitate was filtered and washed with methanol. A yellow crystalline **K** was obtained (1300 mg, 81%) after filtration. The resulting residue was dried under reduced pressure.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, chloroform- $\text{d}_3$ )  $\delta$ : 7.12 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 7.24 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.36 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.72 – 7.75 (m, 1H), 7.83 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 8.11 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 9.35 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 15.24 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz, chloroform- $\text{d}_3$ )  $\delta$ : 168.49, 155.80, 145.22, 136.61, 133.03, 132.69, 129.43, 128.16, 127.50, 123.72, 122.13, 121.51, 119.88, 118.98, 109.03. ESI-MS  $m/z$  (+): 328  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 653  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### **Synthesis of L**

**K** (214 mg, 0.66 mmol) in THF (40 mL) was cooled to  $-94\text{ }^{\circ}\text{C}$  (acetone/liquid  $\text{N}_2$ ). nBuLi (0.82 mL of a 1.6 M solution, 1.312 mmol) was added dropwise to the cooled solution over about 5 min and turned to a transparent red solution. A solution of  $\text{BPh}_3$  (2.6 mL of a 0.25 M solution in THF) was immediately added dropwise over 5 min. The solution was kept at  $-94\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 2 h and was slowly allowed to return to room temperature overnight. 10 mL of methanol were added and the solvent evaporated under vacuum. The compound was purified by normal phase column chromatography using the following eluent: 100 % ethyl acetate to 25 MeOH/ 75 ethyl acetate (v/v). The polar

fraction was purified on a reversed phase column using the following eluent: 40% water-methanol to 100 % methanol (v/v). The collected fractions were dried under vacuum to give an orange powder (80 mg, 25 %). The nature of the counterion was determined by ICP-MS: 63.7 % sodium and 37.3 % lithium. HR-ESI-MS m/z (-): found 488.2173 [M]<sup>-</sup> (Calc 488.2191; Δ2.66 ppm); HR-ESI-MS m/z (+): 983.4515 [2M+Li]<sup>+</sup> (Calc 983.4537; Δ1.78 ppm). Elemental analysis calculated (%) for: C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>BNONa<sub>0.63</sub>Li<sub>0.37</sub> + 2 H<sub>2</sub>O: C 77.61, H 5.77, N 2.59, found (%): C 77.17, H 5.75, N 2.59. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, methanol-d<sub>4</sub>) δ: 6.78 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.88 (t, J = 7.2 Hz), 7.02 (t, J = 7.4 Hz, 6H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 6.1 Hz, 6H), 7.42 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.45 – 7.50 (m, 2H), 7.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 9.24 (s, 1H); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (151 MHz, methanol-d<sub>4</sub>) δ: 180.15, 164.62 (q, J = 49.0 Hz), 150.87, 139.57, 138.62, 137.17, 135.54, 135.05, 130.18, 129.45, 127.55, 126.49, 125.95, 123.99, 122.88, 119.82, 116.94, 108.37, 49.43.

### Synthesis of M

**K** (20 mg, 0.040 mmol) was dissolved in ACN, EtOH or DCM (5 mL), and stirred with a (benzene)ruthenium dichloride dimer (9 mg, 0.019 mmol) and 1.42 eq. of a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> or Et<sub>3</sub>N at room temperature for five hours. The reaction mixture was then filtered on celite and dried under vacuum to give a crimson powder (< 5 mg).

### Synthesis of N from aromatic substitution

**F** (100 mg, 0.21 mmol), NaN<sub>3</sub> (14 mg, 0.214 mmol), CuI (4 mg, 0.02 mmol), Potassium carbonate (6 mg, 0.04 mmol) and L-proline (5 mg, 0.04 mmol) were dissolved in DMSO (0.8 mL) under inert atmosphere. The mixture was heated at 90 °C or 150 °C. The reaction progress was followed by mass spectrometry.

### Synthesis of P

#### Procedure for entries 1 to 17 and 26 to 28.

**O** (37 mg, 0.104 mmol), N-bromosuccinimide (35 mg, 0.197 mmol) and 1 or 20 mol% of AIBN or benzoyl peroxyde were heated in sealed tube in various solvents (1 mL). The reaction progress was followed by mass spectrometry during 24 h.

Procedure for entries 18 to 25

O (37 mg, 0.104 mmol) and N-bromosuccinimide (35 mg, 0.197 mmol) were heated in a microwave reactor in various solvents (1 mL). The reaction progress was followed over 6 h.

## 7 SUPPORTING INFORMATION CHAPTER 1

---

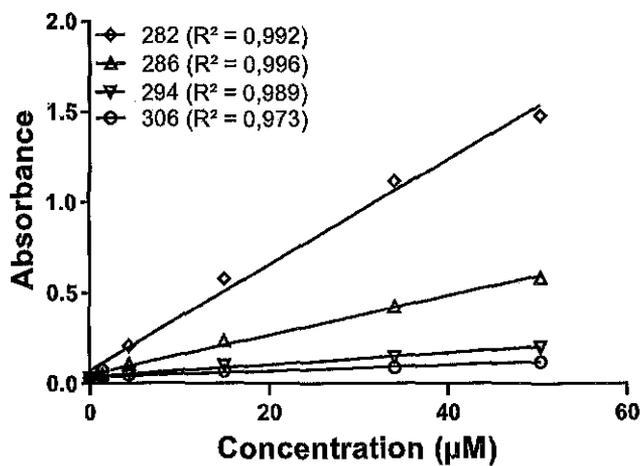
### Structure-activity relationship (SAR) study of tetraphenylborate derivatives for the design of antibiotics against *Neisseria* pathogens

*Robin Vidal, Eve Bernet, Golara Golbaghi, Mohammad Mehdi Haghdoost, Sébastien Houle, Shunmoogum A. Patten, Charles Dozois, Frédéric Veyrier,<sup>§</sup> Annie Castonguay<sup>§\*</sup>*

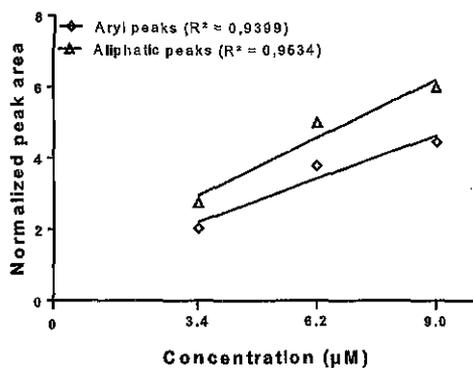
INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Quebec, Canada

#### TABLE OF CONTENT

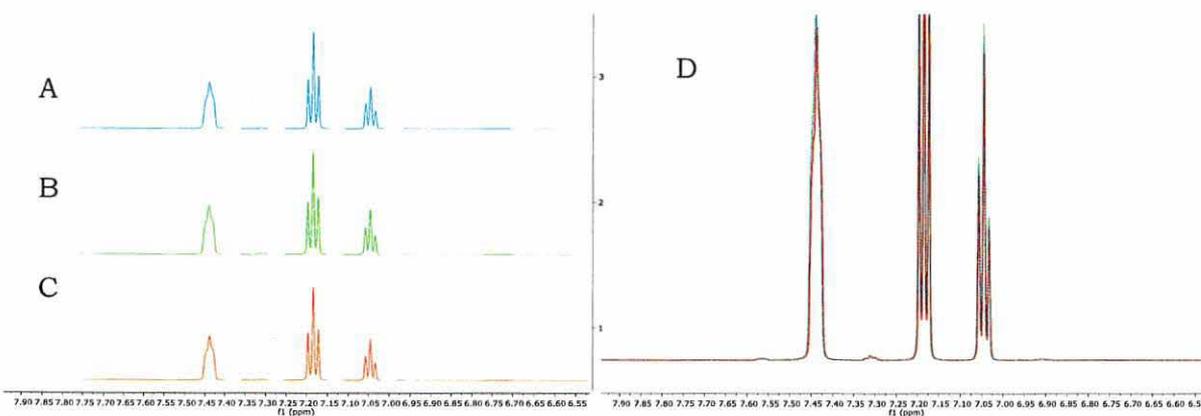
<b>Figure S1.</b> UV-vis absorbance measurement (at 322, 286, 294 and 306 nm) of solutions of NaBPh <sub>4</sub> at various concentrations (1.5 – 50 μM) in MilliQ water. ....	99
<b>Figure S2.</b> Peak area of various selected peaks (0.67-1.45 ppm and 6.63-7.26 ppm) from the <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>1g</b> recorded in DMSO-d <sub>6</sub> at various concentrations (3.4, 6.2 and 9.0 μM). Data were normalized using the residual DMSO signal. ....	99
<b>Figure S3.</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of NaBPh <sub>4</sub> recorded in D <sub>2</sub> O after (A) 1 h, (B) 48 h and (C) 70 days. Spectra D illustrates the overlap of spectra A, B and C. ....	100
1D and 2D NMR spectra .....	101



**Figure S1.** UV-vis absorbance measurement (at 322, 286, 294 and 306 nm) of solutions of NaBPh<sub>4</sub> at various concentrations (1.5 – 50 µM) in MilliQ water.



**Figure S2.** Peak area of various selected peaks (0.67-1.45 ppm and 6.63-7.26 ppm) from the <sup>1</sup>H NMR spectrum of **1g** recorded in DMSO-d<sub>6</sub> at various concentrations (3.4, 6.2 and 9.0 µM). Data were normalized using the residual DMSO signal.

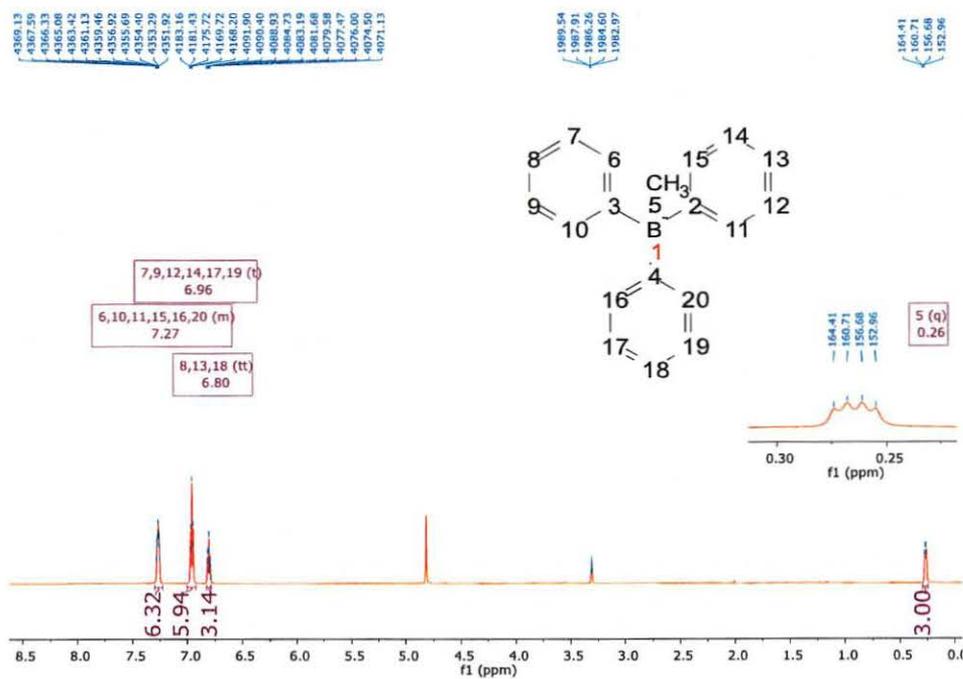


**Figure S3.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of  $\text{NaBPh}_4$  recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  after (A) 1 h, (B) 48 h and (C) 70 days. Spectrum D illustrates the overlap of spectra A, B and C.

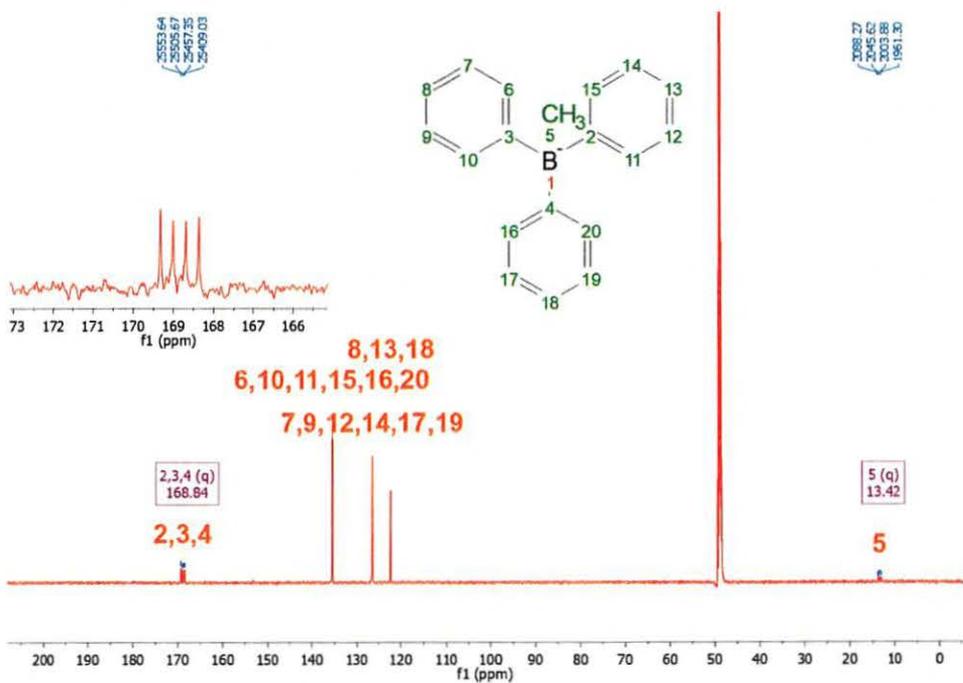
## 7.1 1D and 2D NMR spectra

### Sodium methyltriphenylborate (1a)

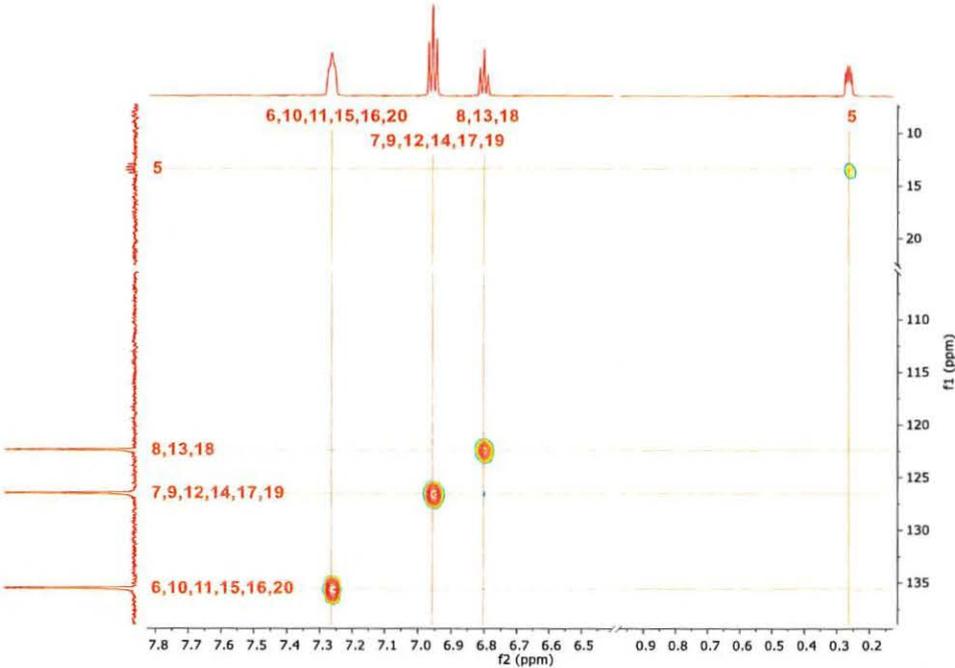
#### 1D $^1\text{H}$ NMR (Methanol $d_4$ )



#### 1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (Methanol $d_4$ )

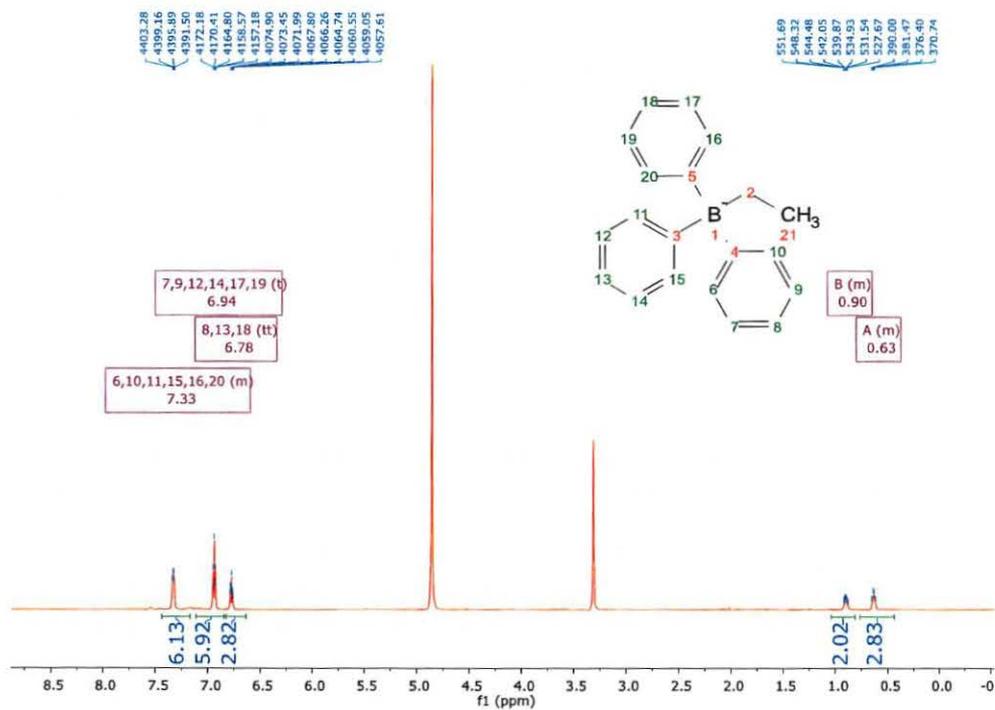


2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC (Methanol d<sub>4</sub>)

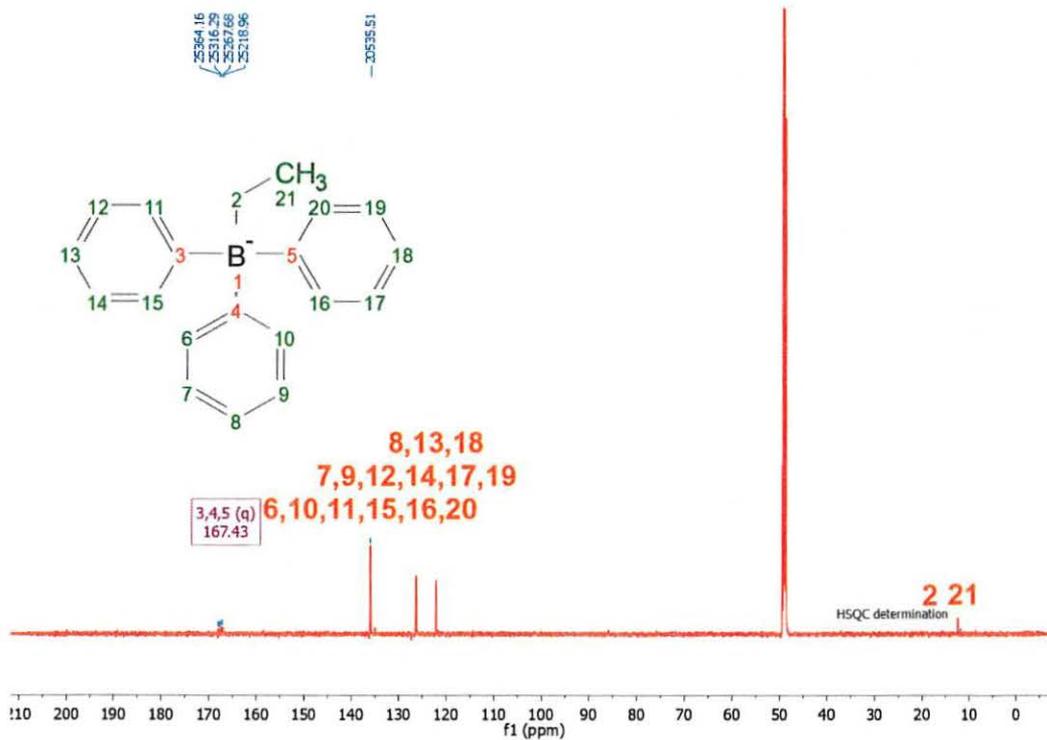


# Sodium ethyltriphenylborate (1b)

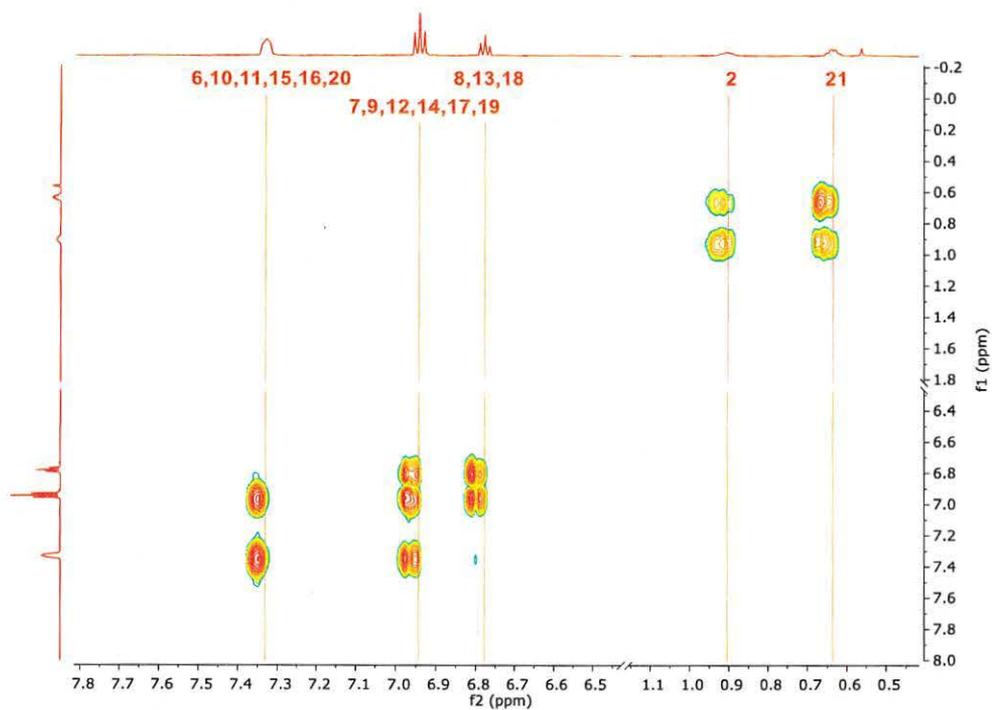
## 1D <sup>1</sup>H NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



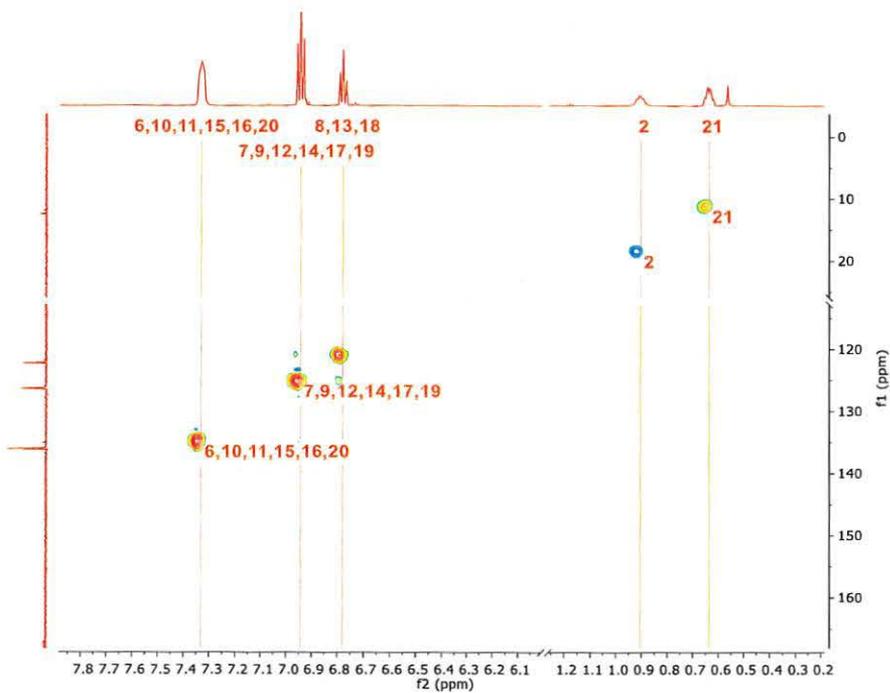
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Methanol  $\text{d}_4$ )

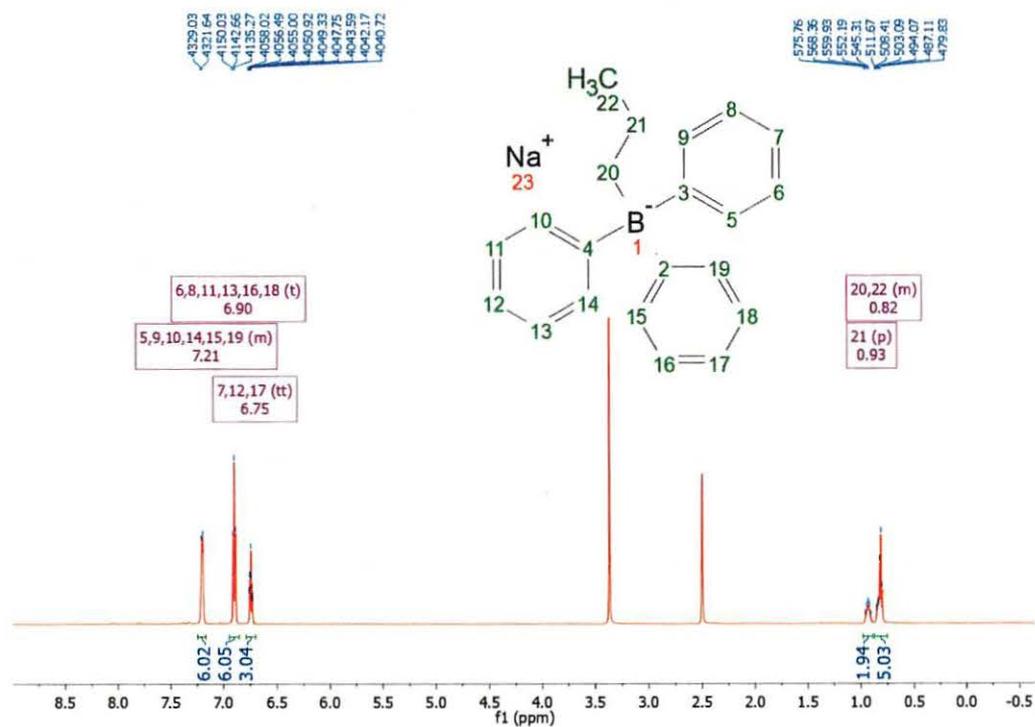


2D  $^{13}\text{C}$  - $^1\text{H}$  HSQC (Methanol  $\text{d}_4$ )

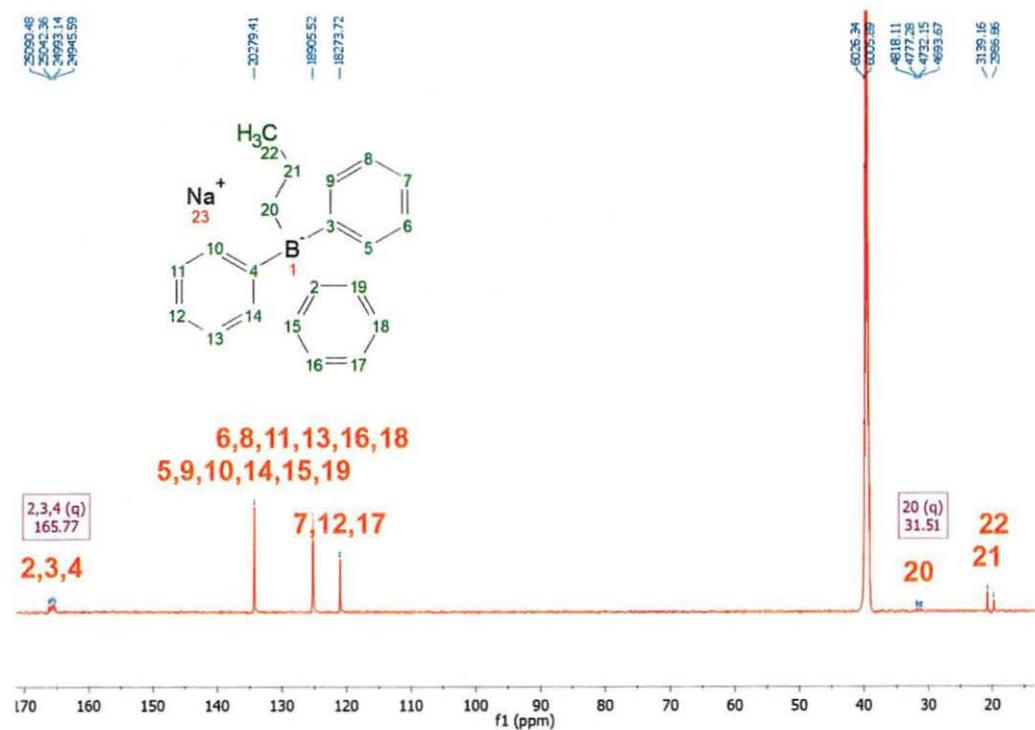


# Sodium propyltriphenylborate (1c)

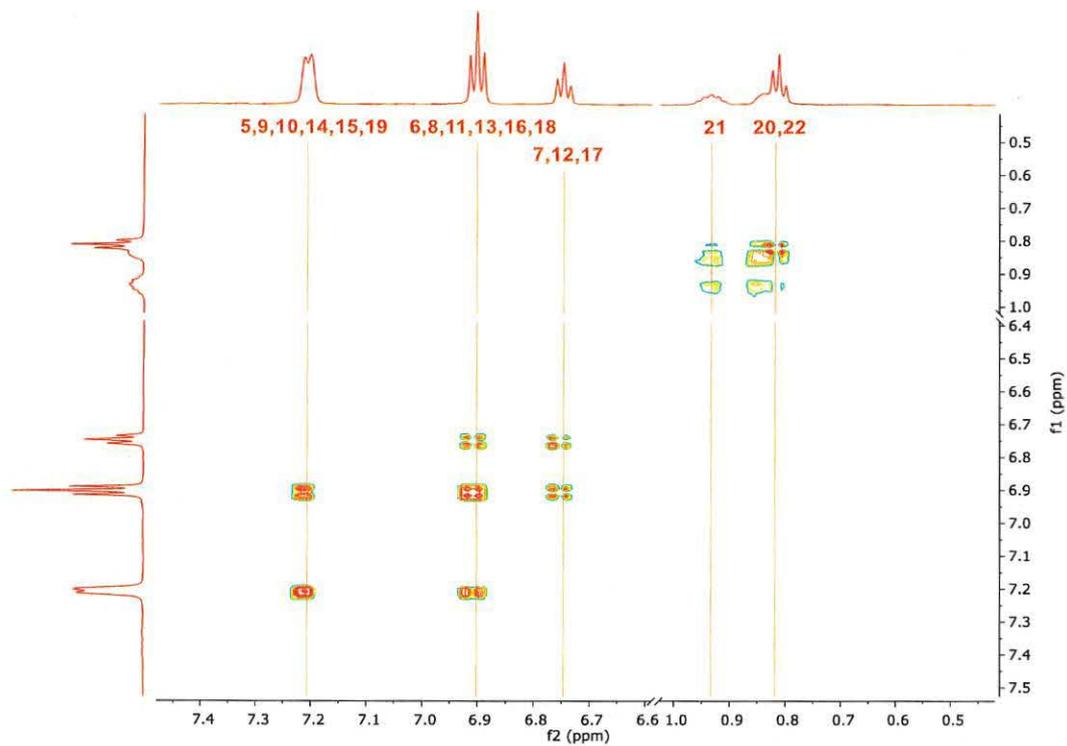
## 1D <sup>1</sup>H NMR (DMSO d<sub>6</sub>)



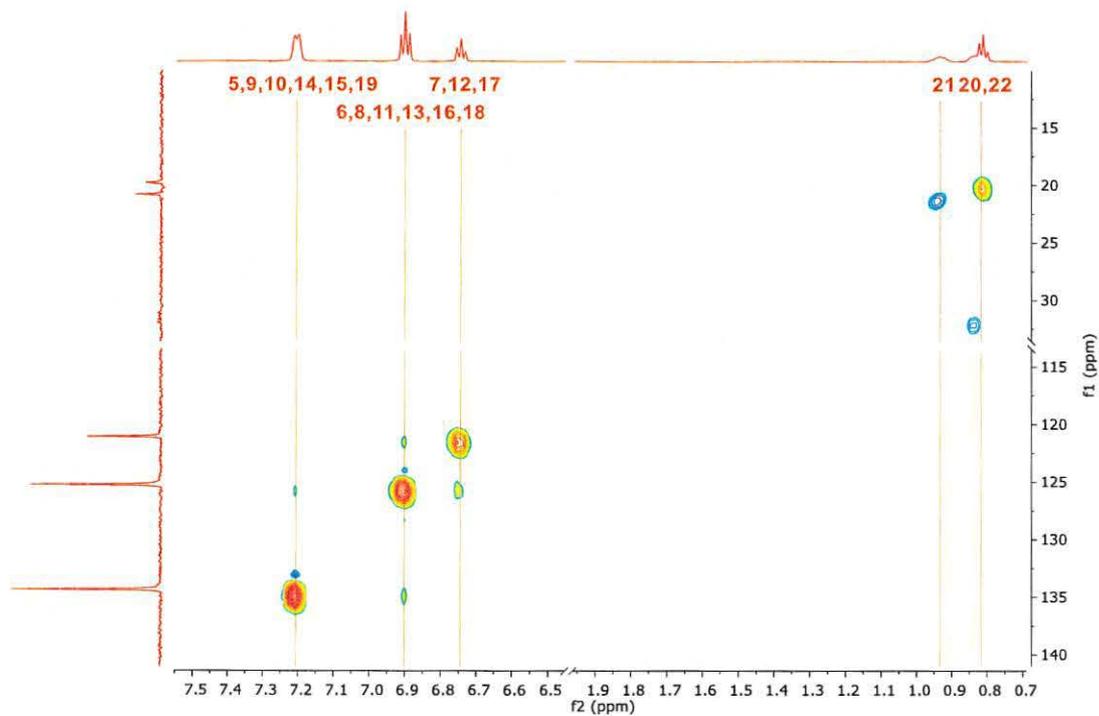
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (DMSO d<sub>6</sub>)



2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (DMSO  $d_6$ )

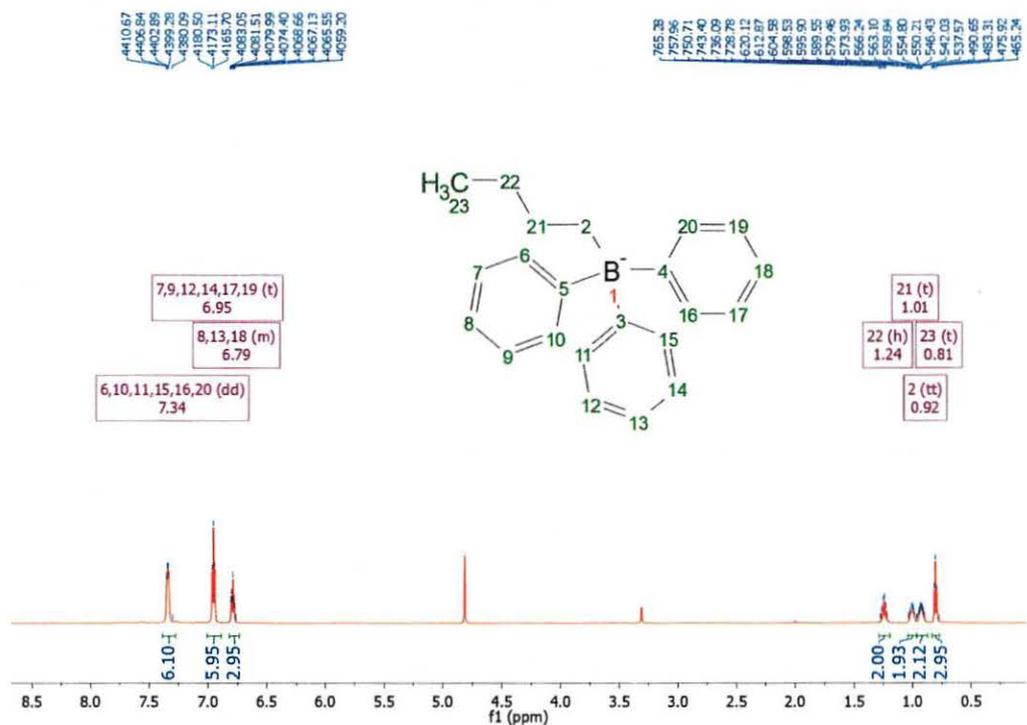


2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (DMSO  $d_6$ )

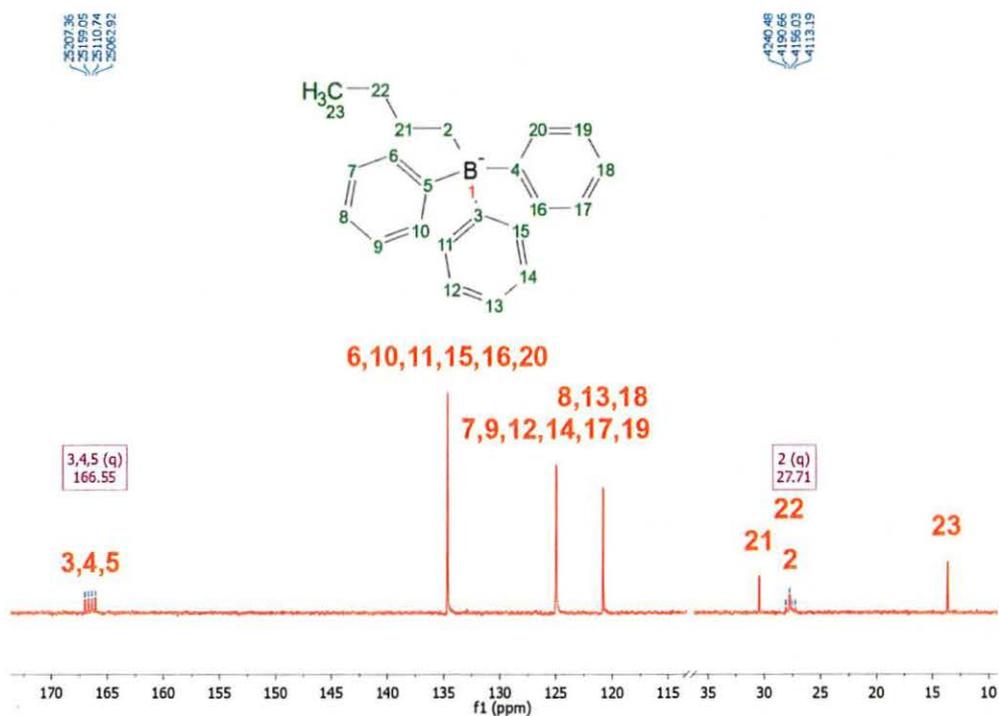


# Sodium butyltriphenylborate (1d)

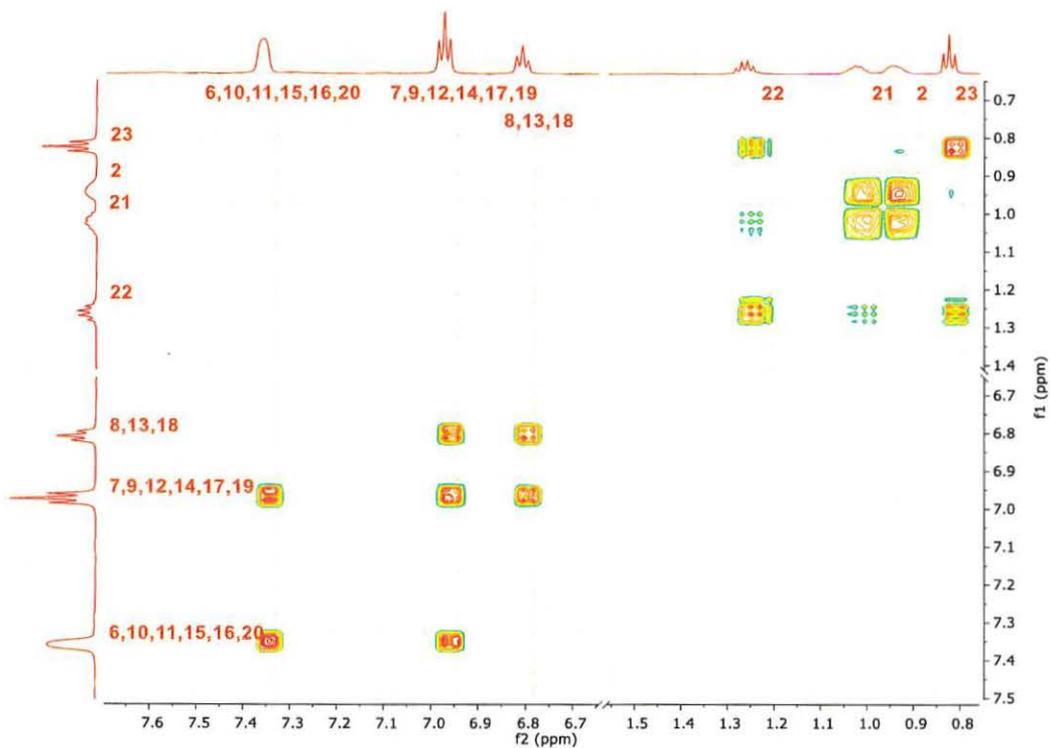
## 1D <sup>1</sup>H NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



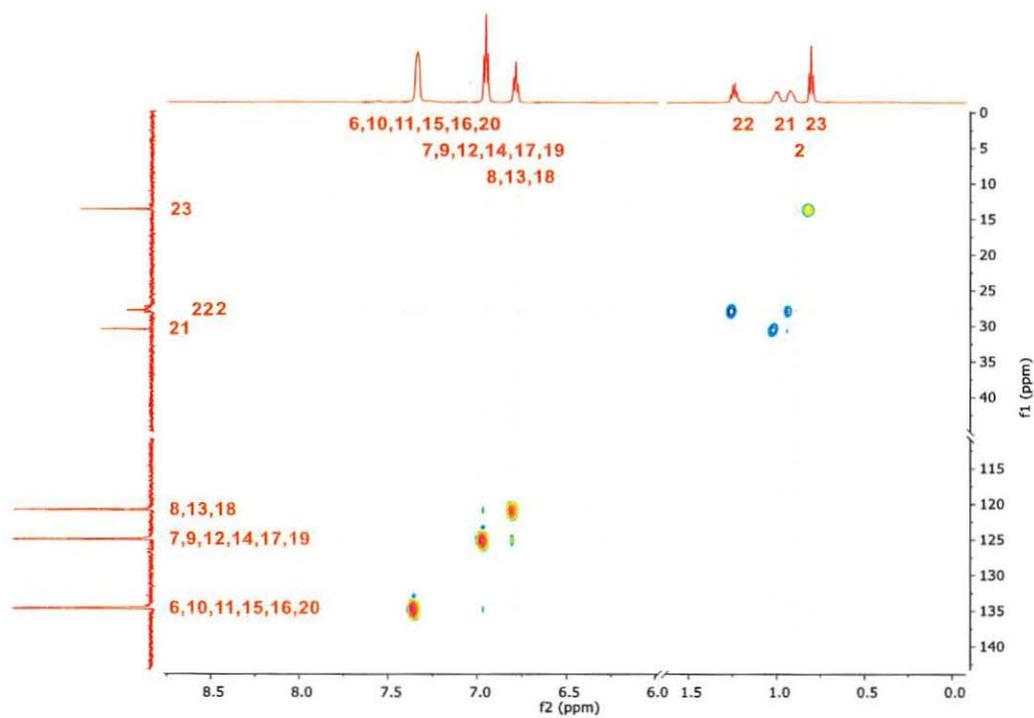
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



### 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (Methanol $\text{d}_4$ )

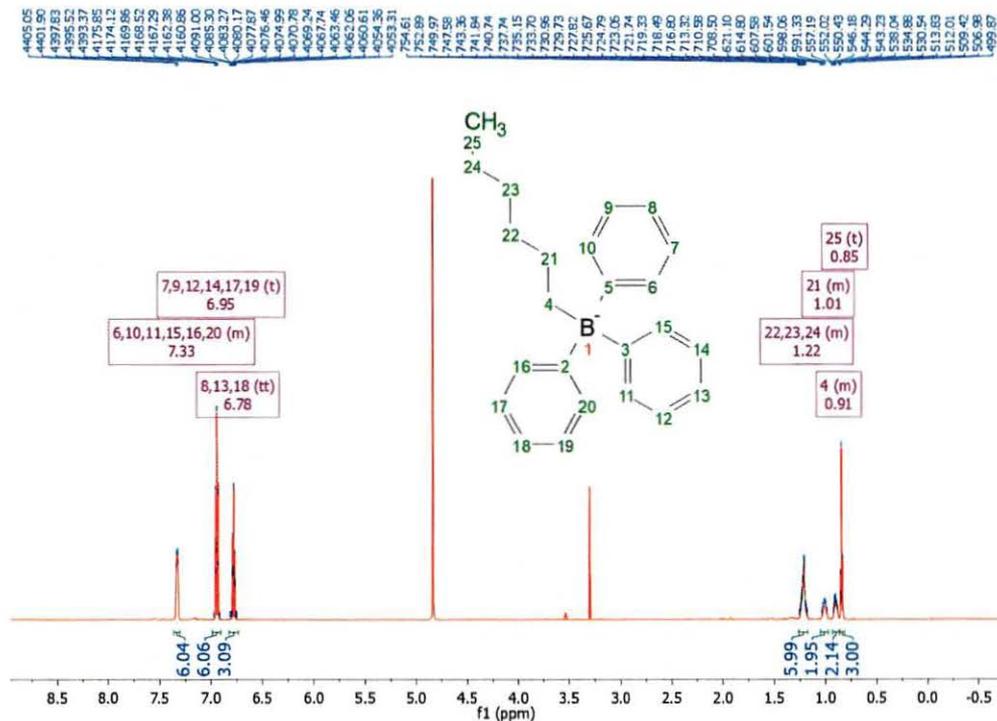


### 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HSQC (Methanol $\text{d}_4$ )

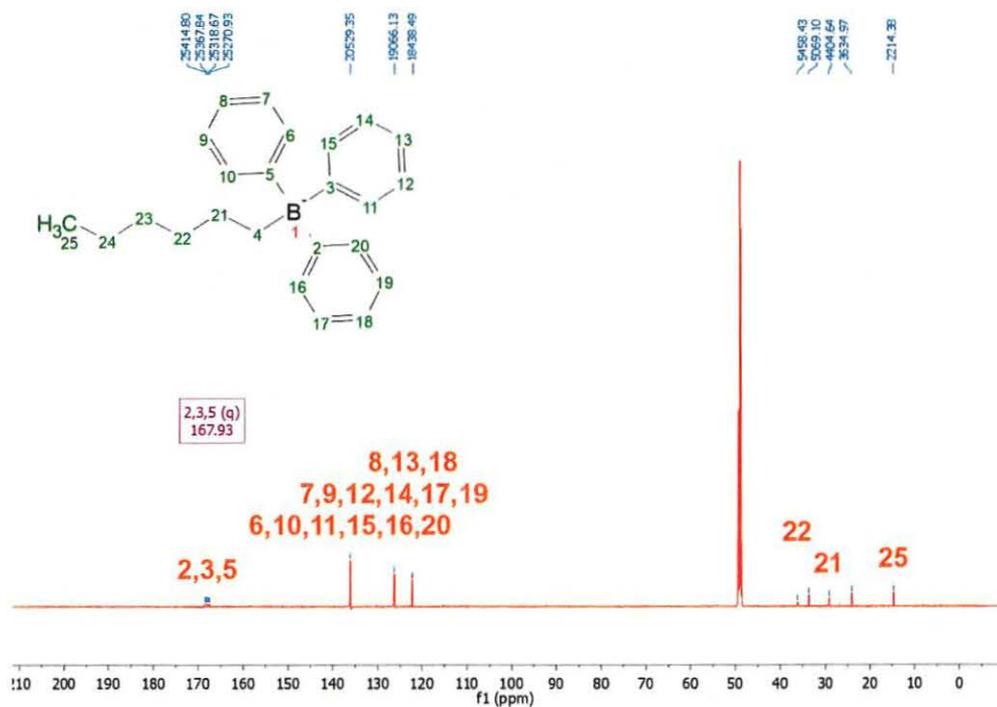


# Sodium hexyltriphenylborate (1e)

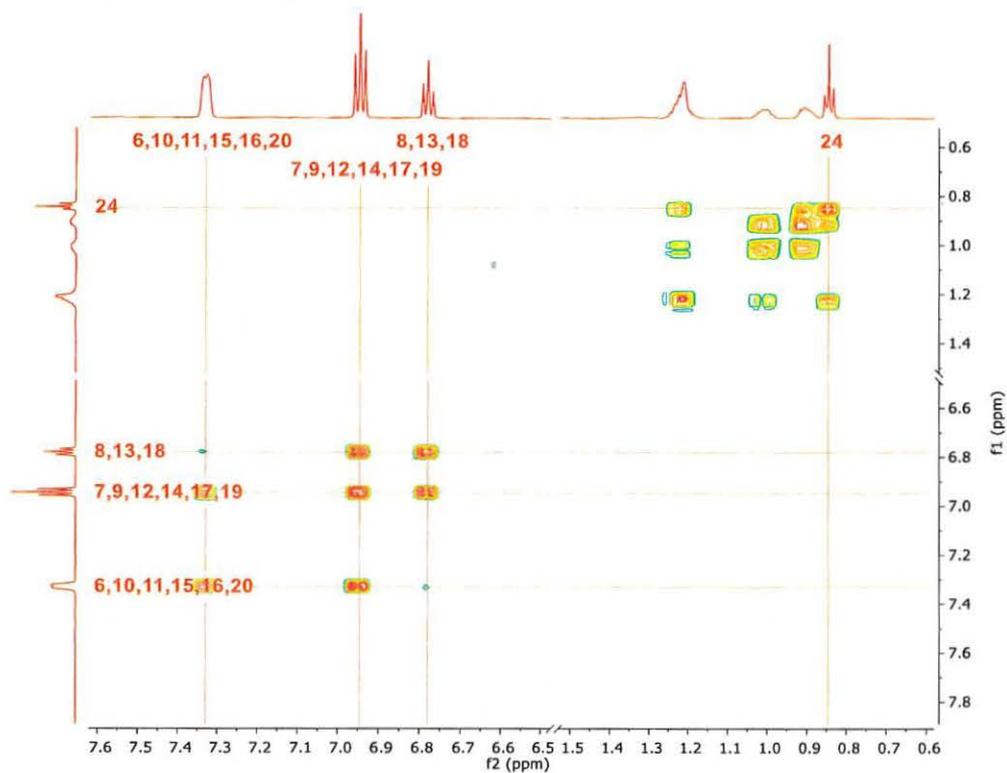
## 1D <sup>1</sup>H NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



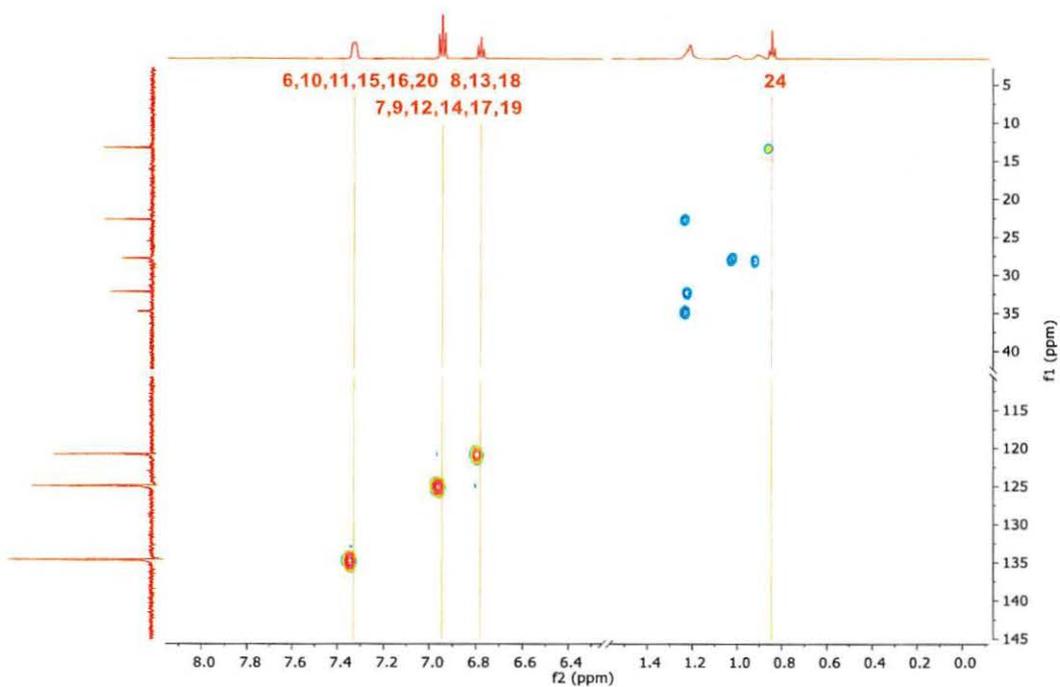
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



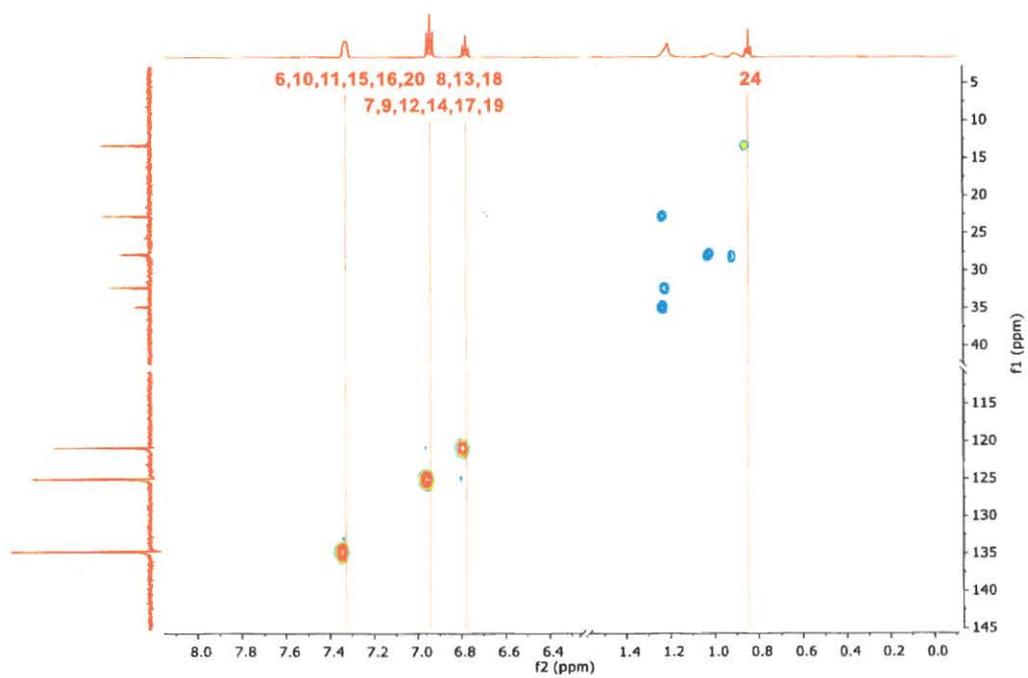
### 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (Methanol $\text{d}_4$ )



### 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HSQC (Methanol $\text{d}_4$ )

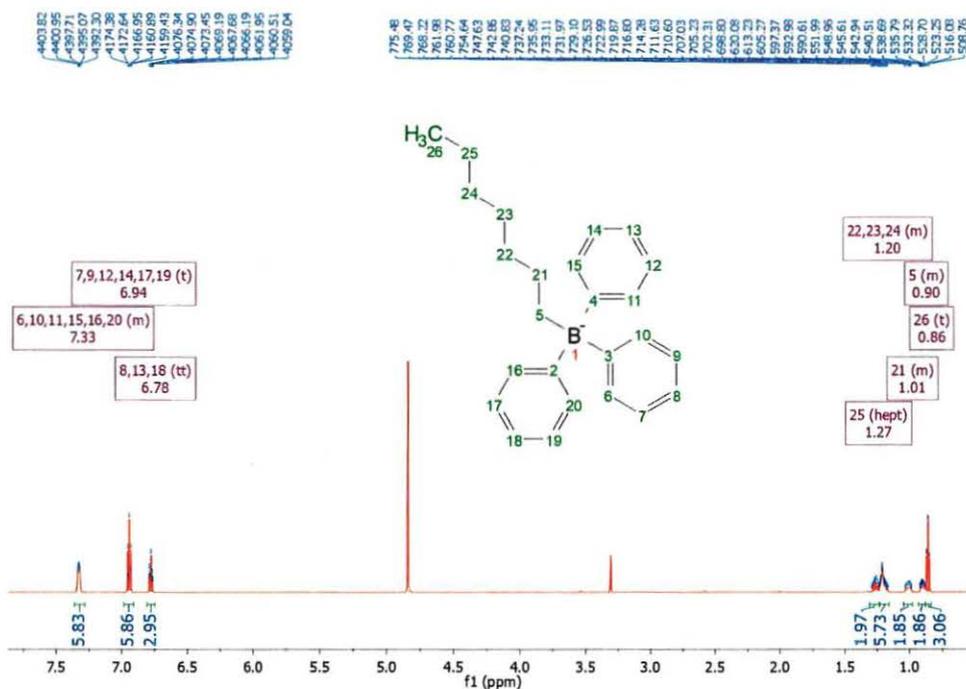


2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMBC (Methanol  $\text{d}_4$ )

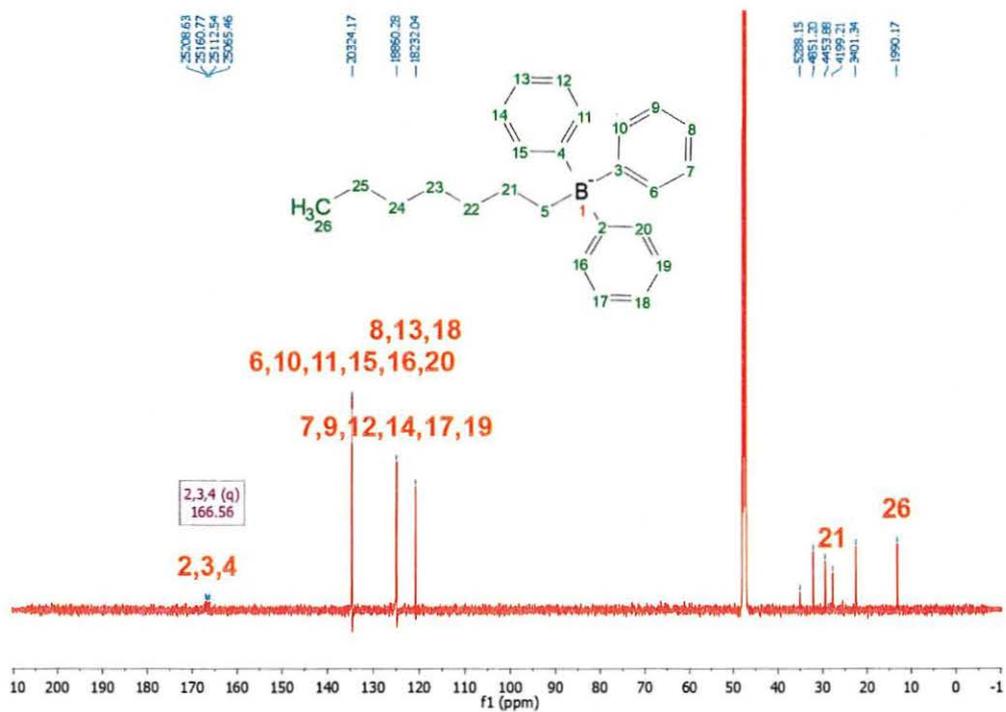


# Sodium heptyltriphenylborate (1f)

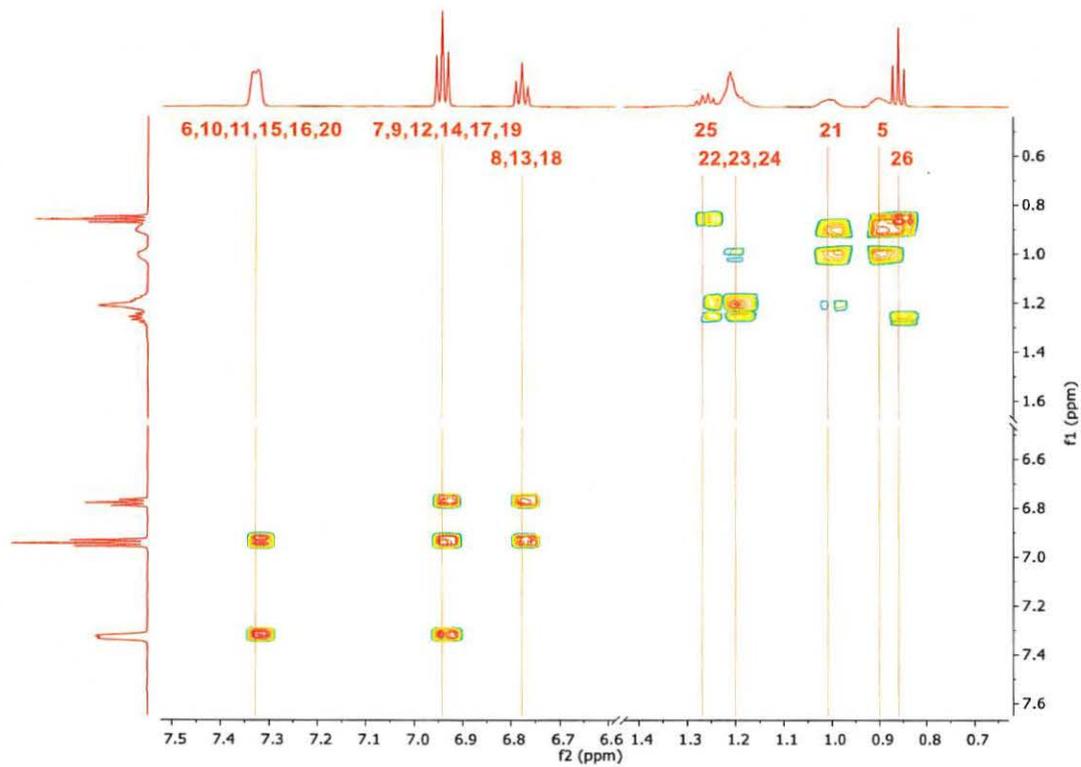
## 1D <sup>1</sup>H NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



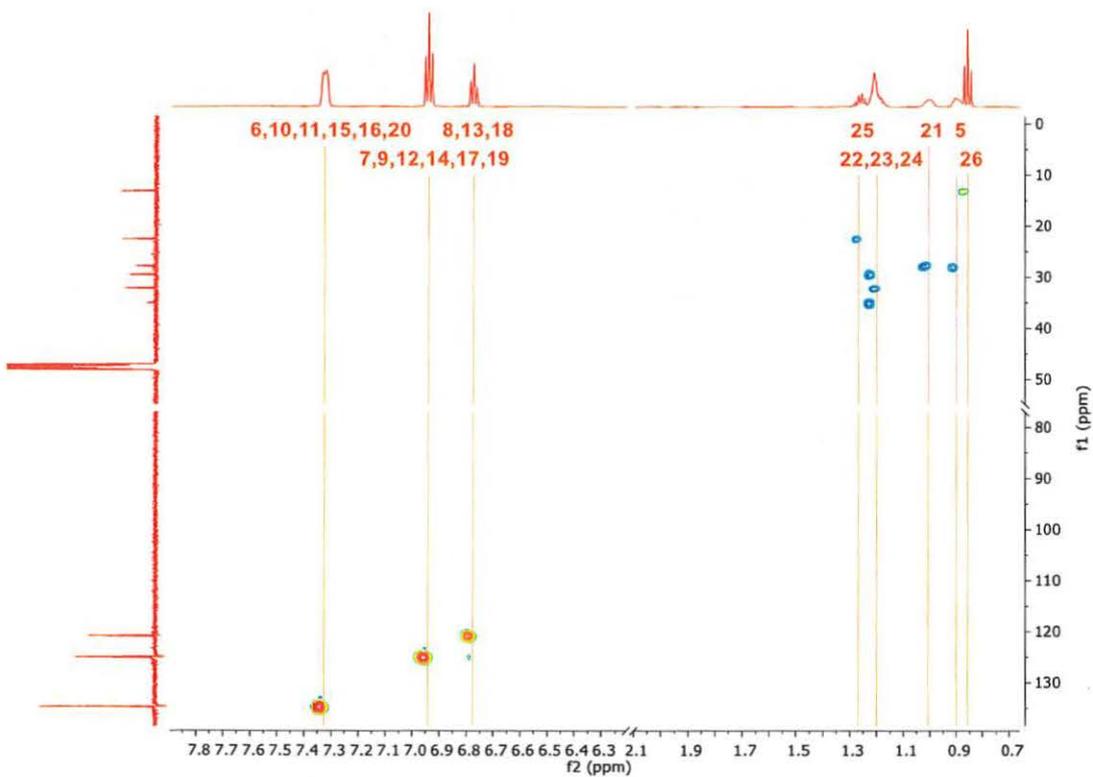
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



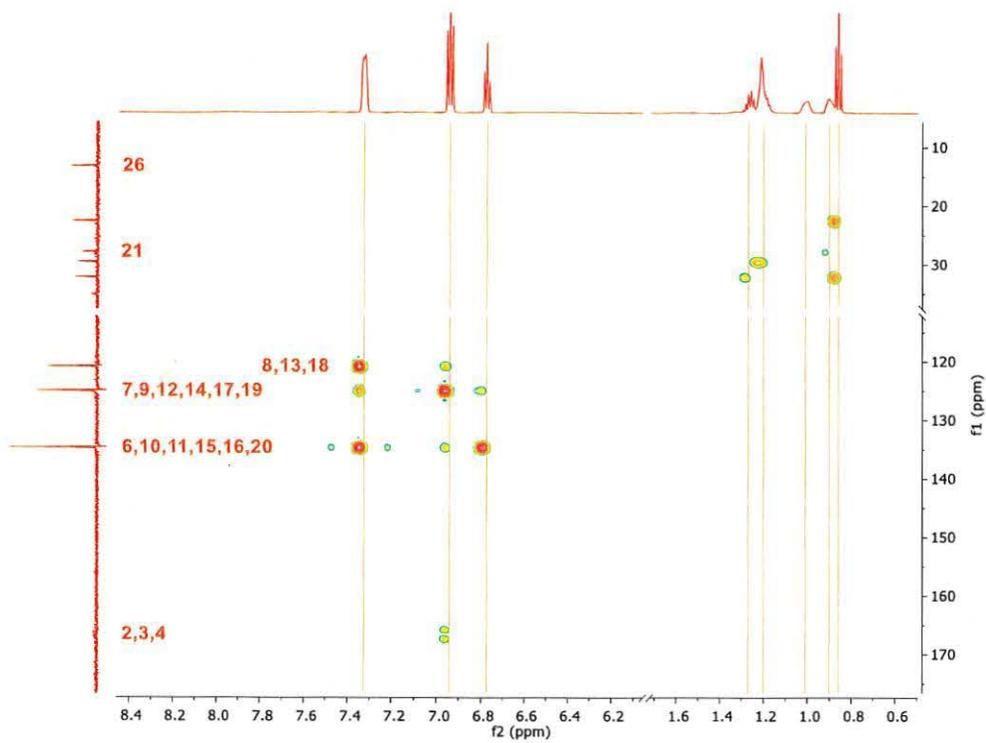
2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Methanol  $d_4$ )



2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (Methanol  $d_4$ )

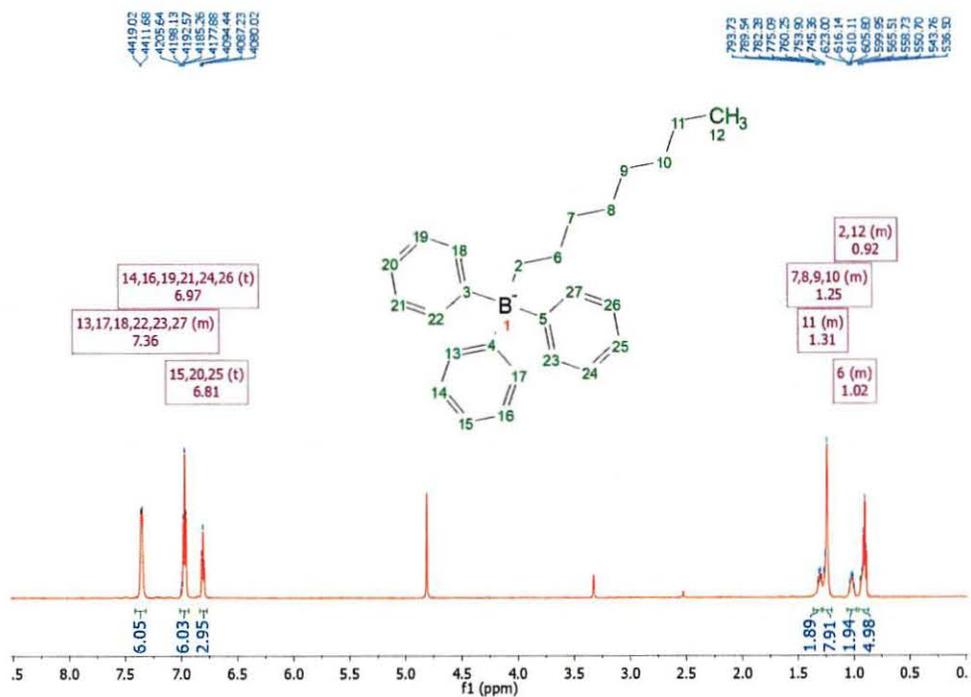


# 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HMBC (Methanol $\text{d}_4$ )

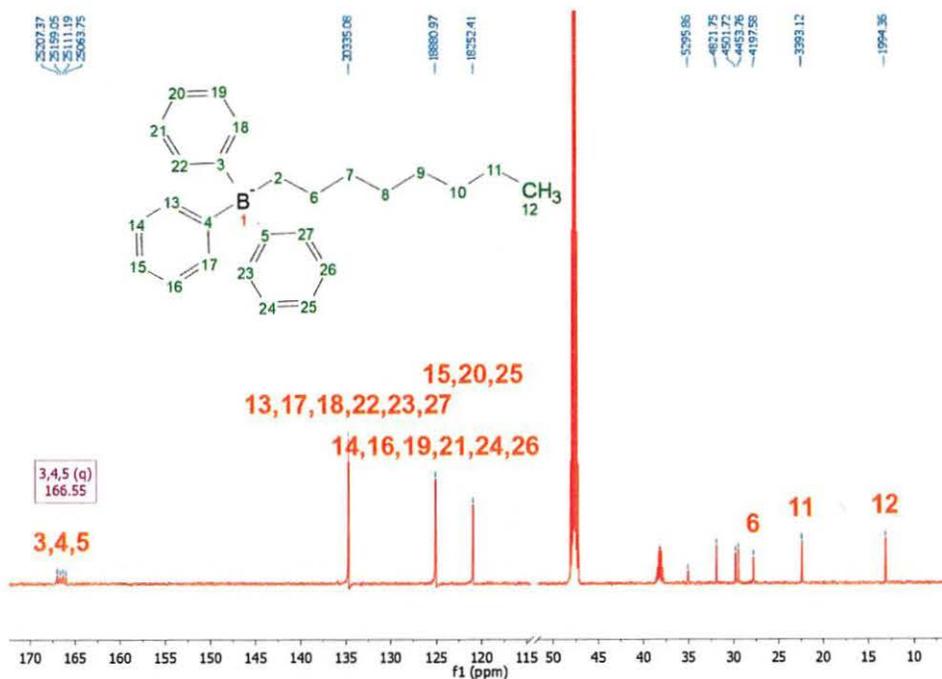


# Sodium octyltriphenylborate (1g)

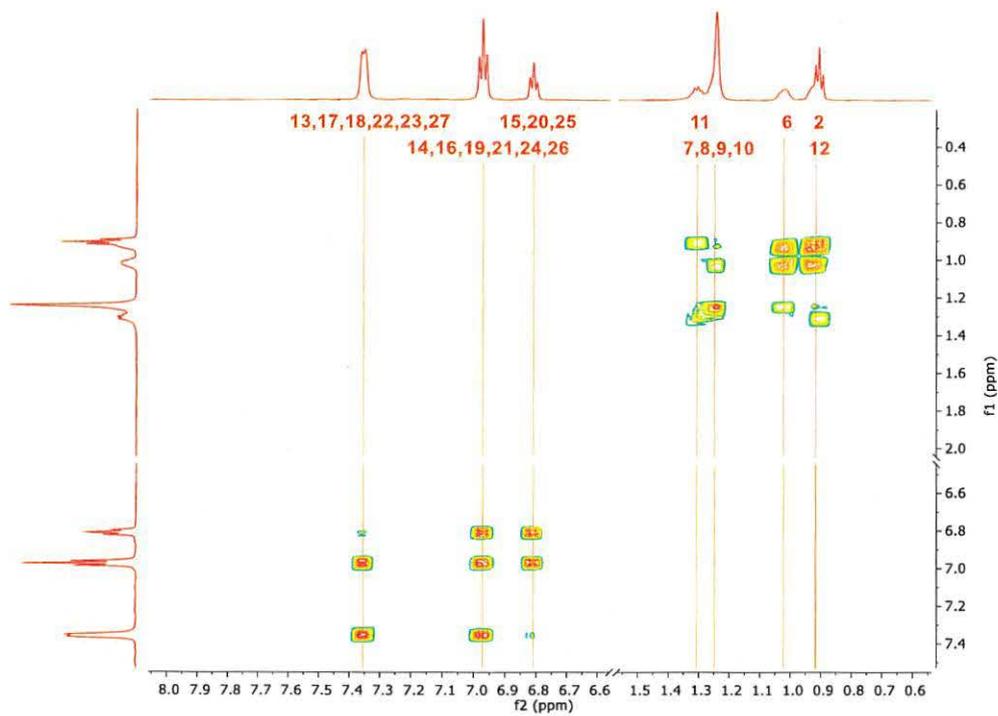
## 1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (Methanol $d_4$ )



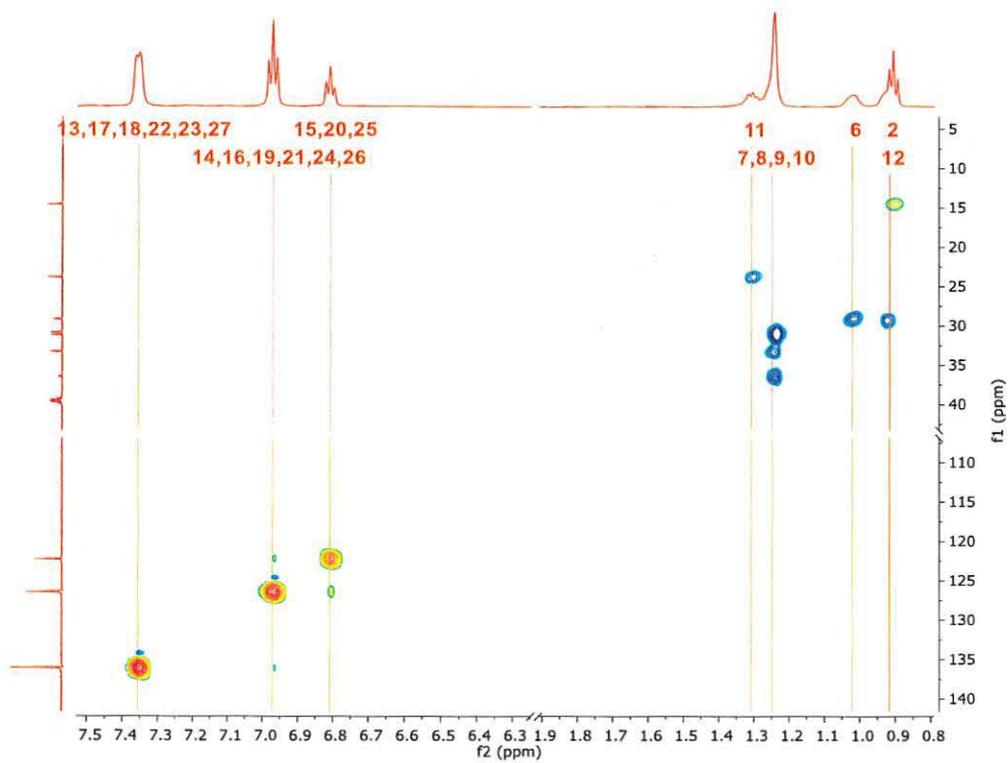
## 1D $^1\text{H}$ NMR (Methanol $d_4$ )



### 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (Methanol $\text{d}_4$ )

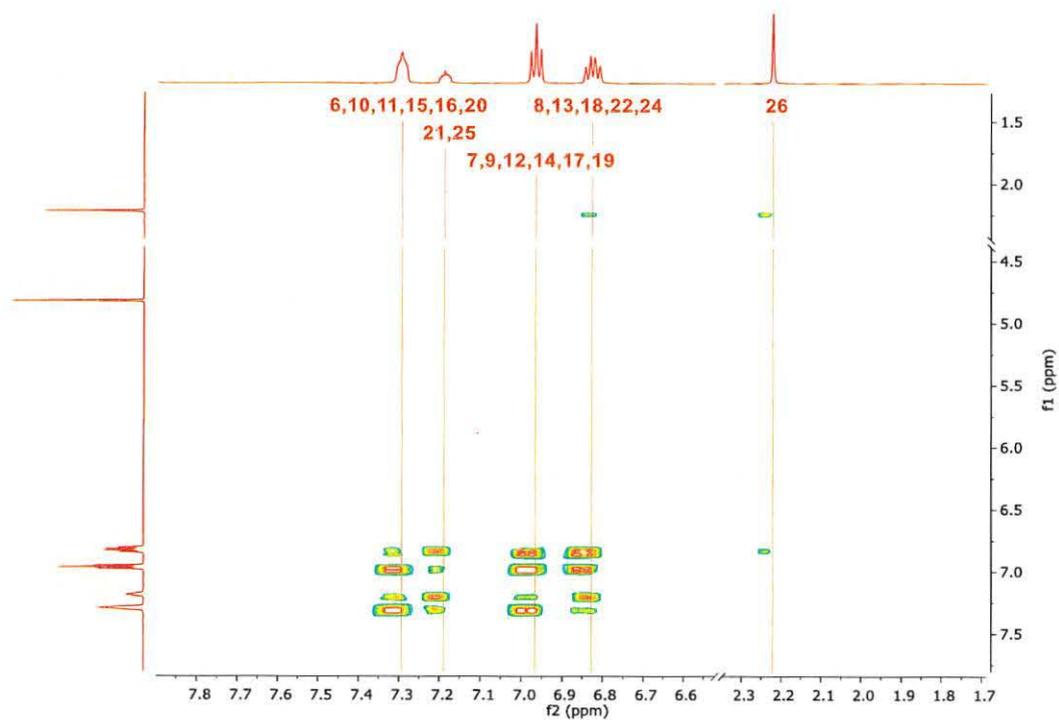


### 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HSQC (Methanol $\text{d}_4$ )

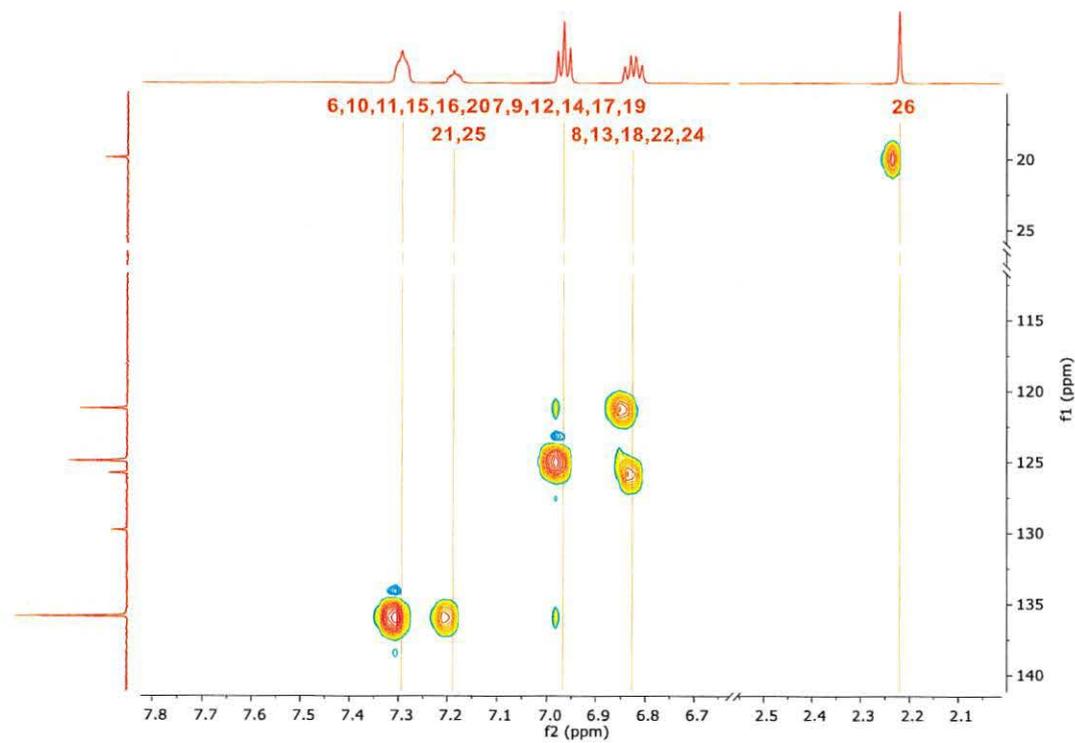




**2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Methanol  $d_4$ )**

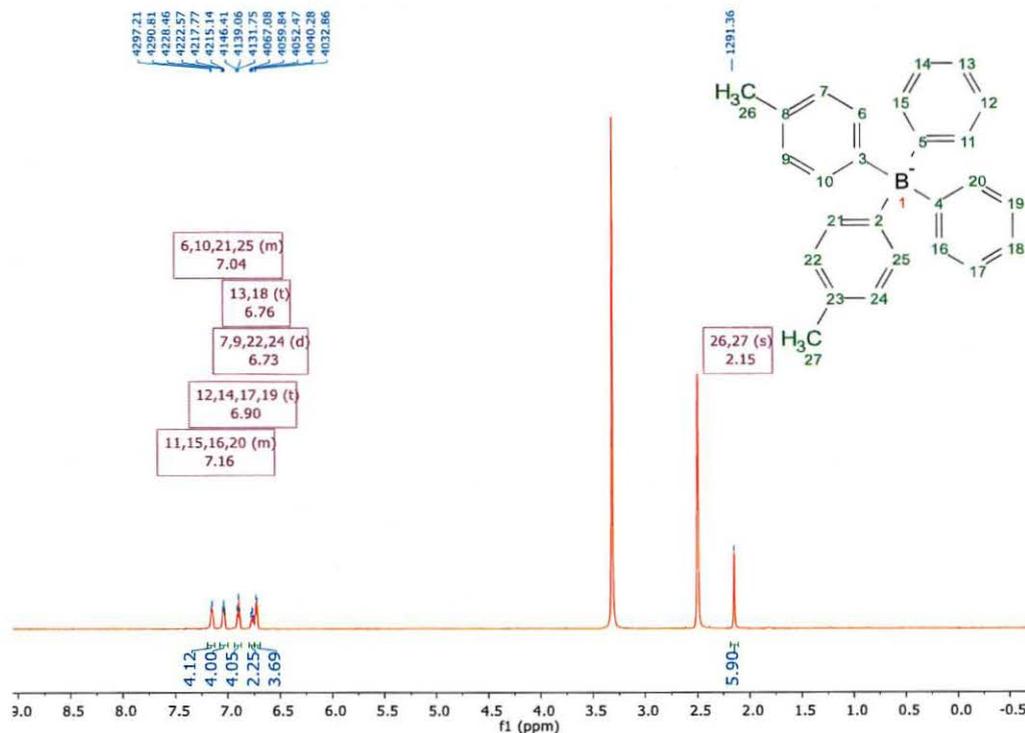


**2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (Methanol  $d_4$ )**

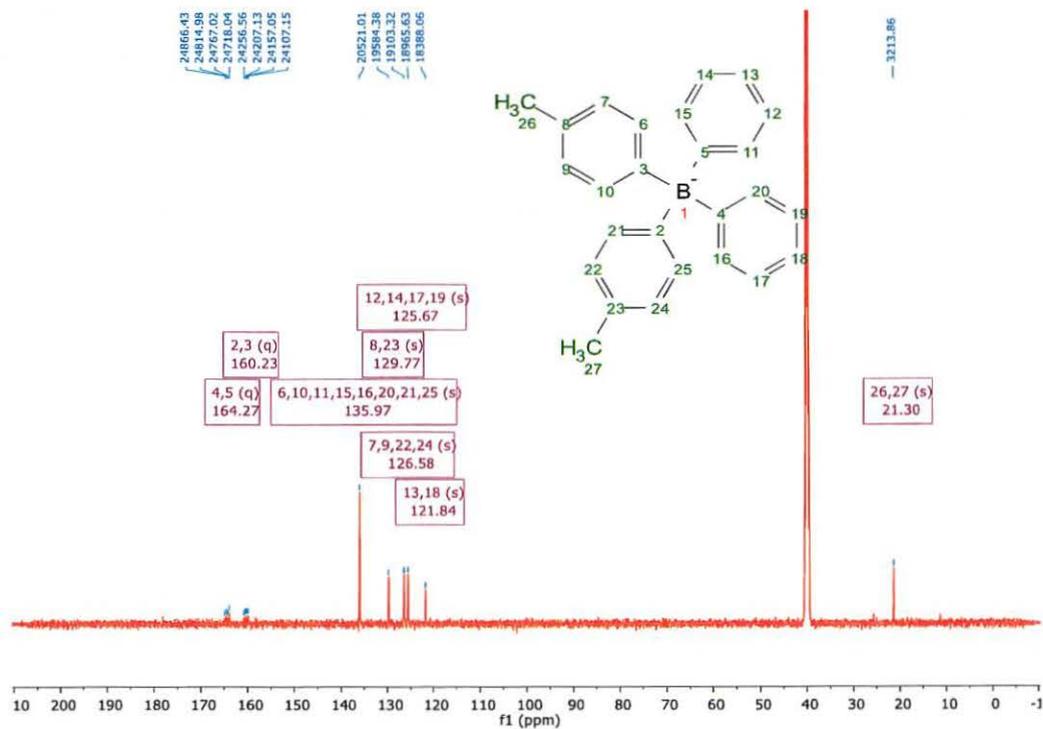


# Sodium bis(4-methylphenyl) diphenylborate (2b)

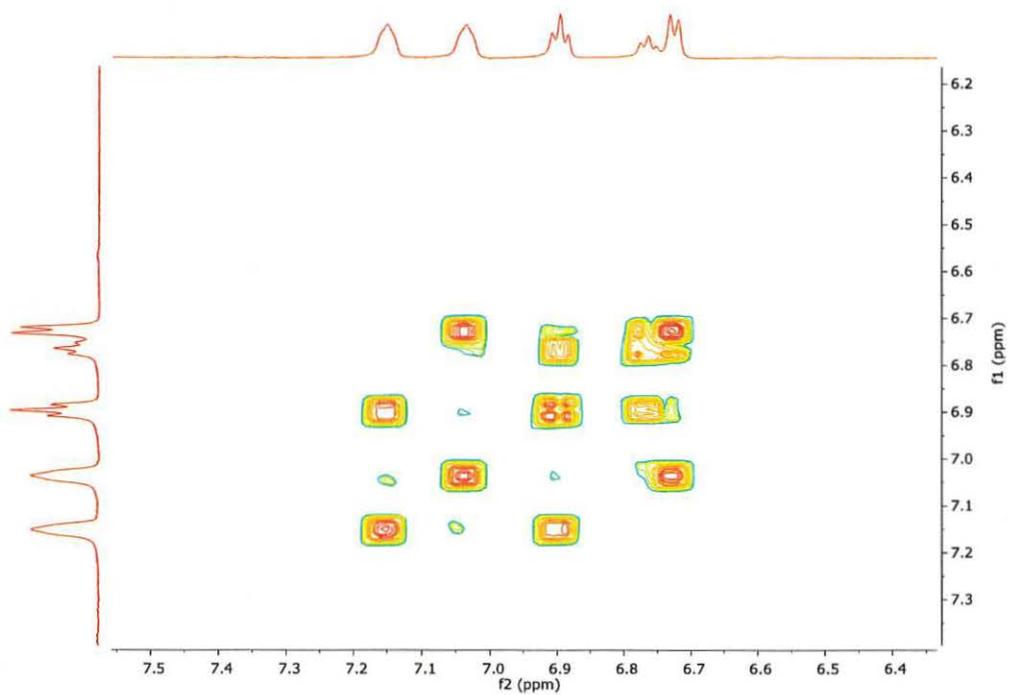
## 1D <sup>1</sup>H NMR (DMSO d<sub>6</sub>)



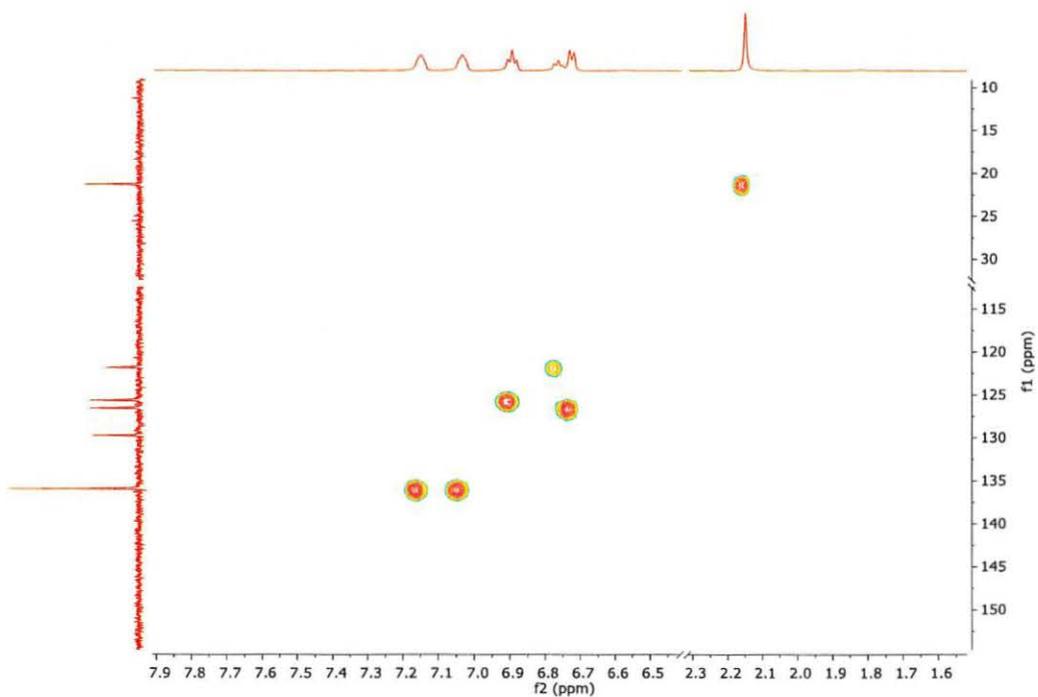
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (DMSO d<sub>6</sub>)



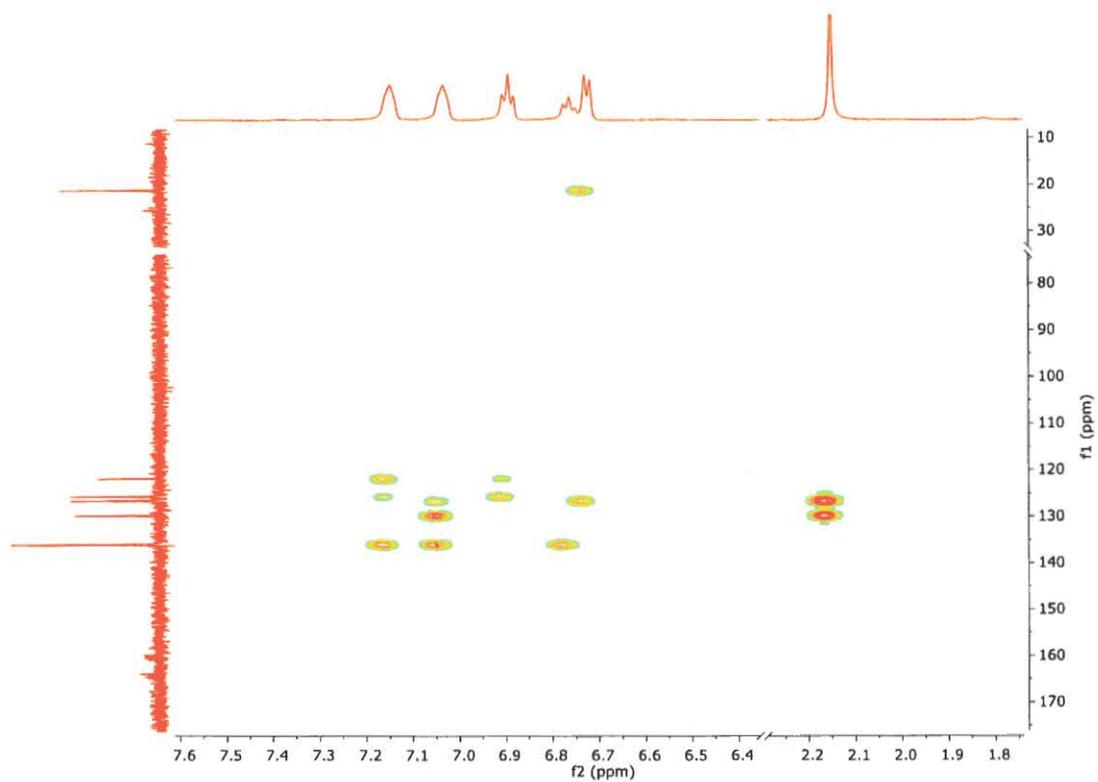
2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (DMSO  $d_6$ )



2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (DMSO  $d_6$ )

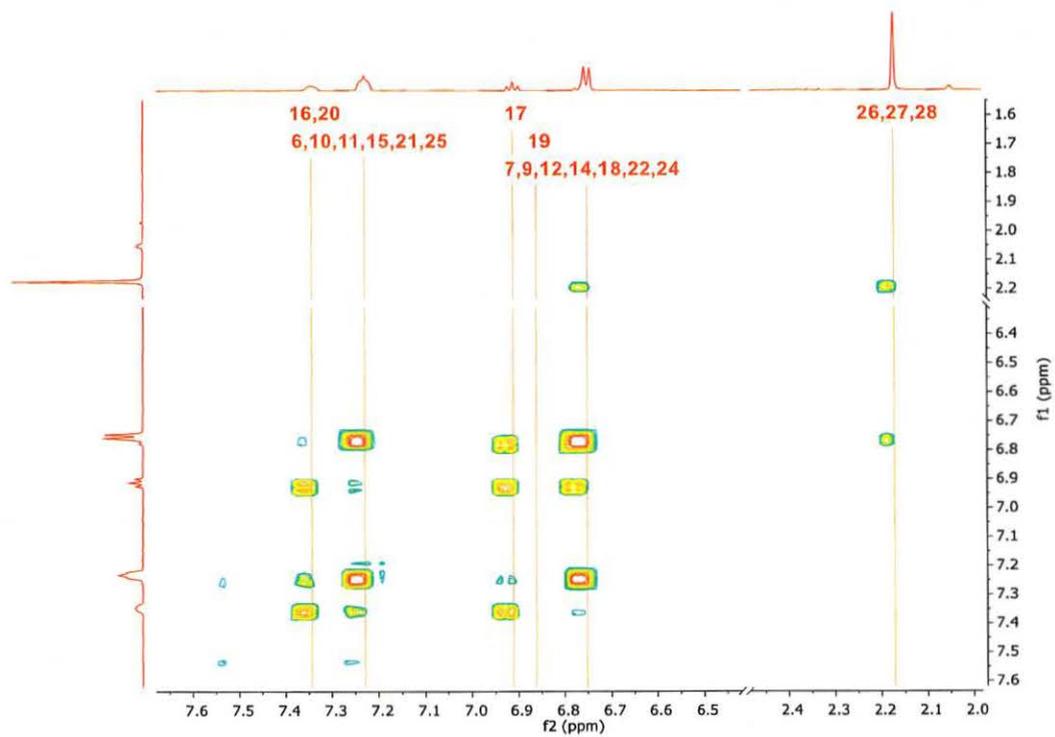


2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMBC(DMSO  $\text{d}_6$ )

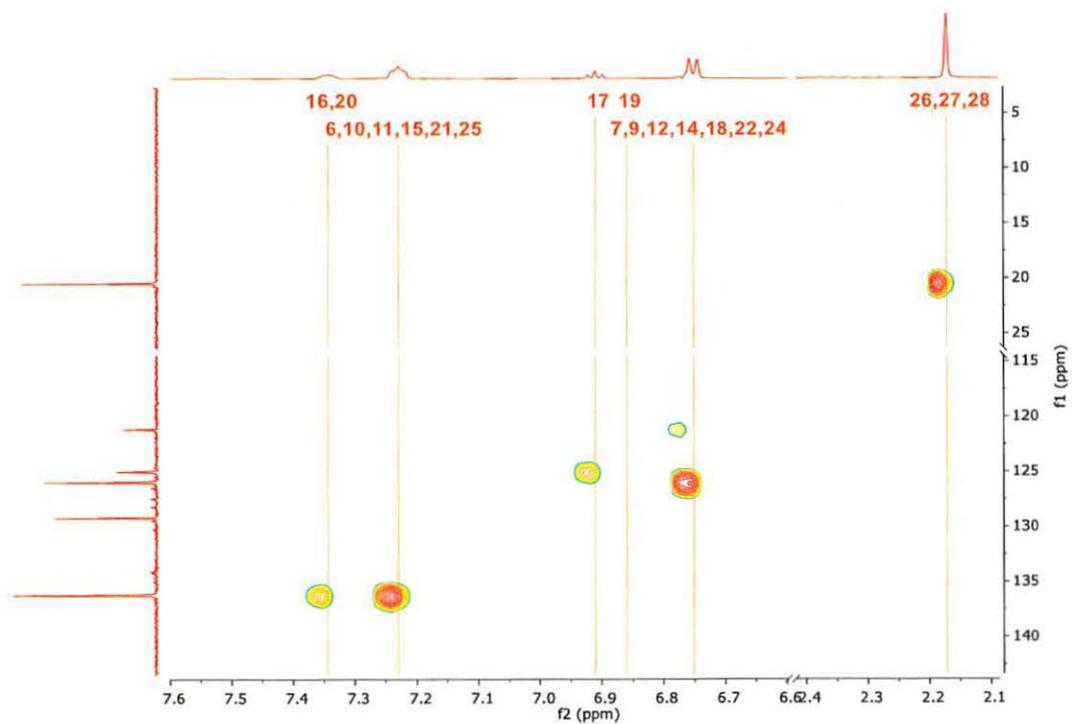




### 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (Acetone $\text{d}_6$ )

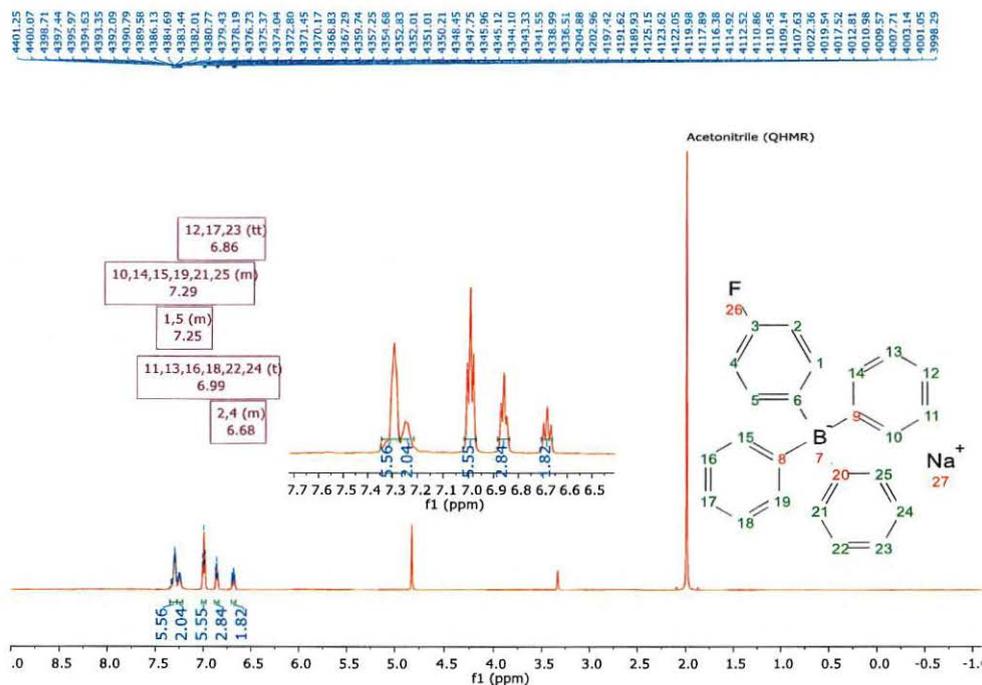


### 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HSQC (Acetone $\text{d}_6$ )

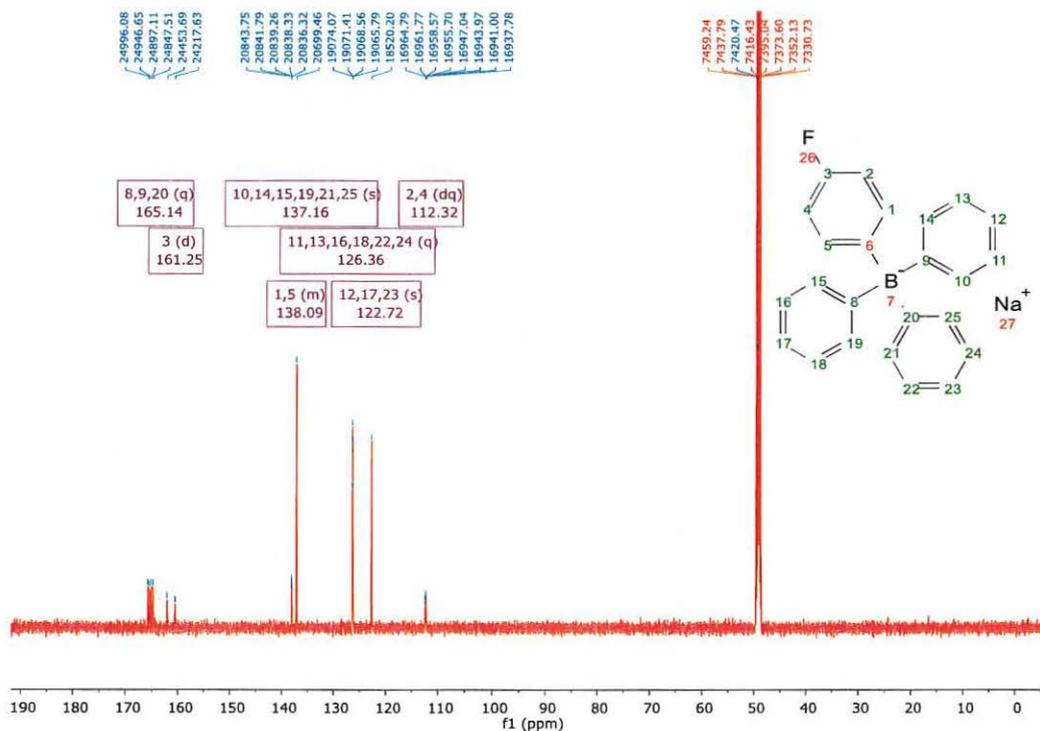


# Sodium (4-fluorophenyl)triphenylborate (3a)

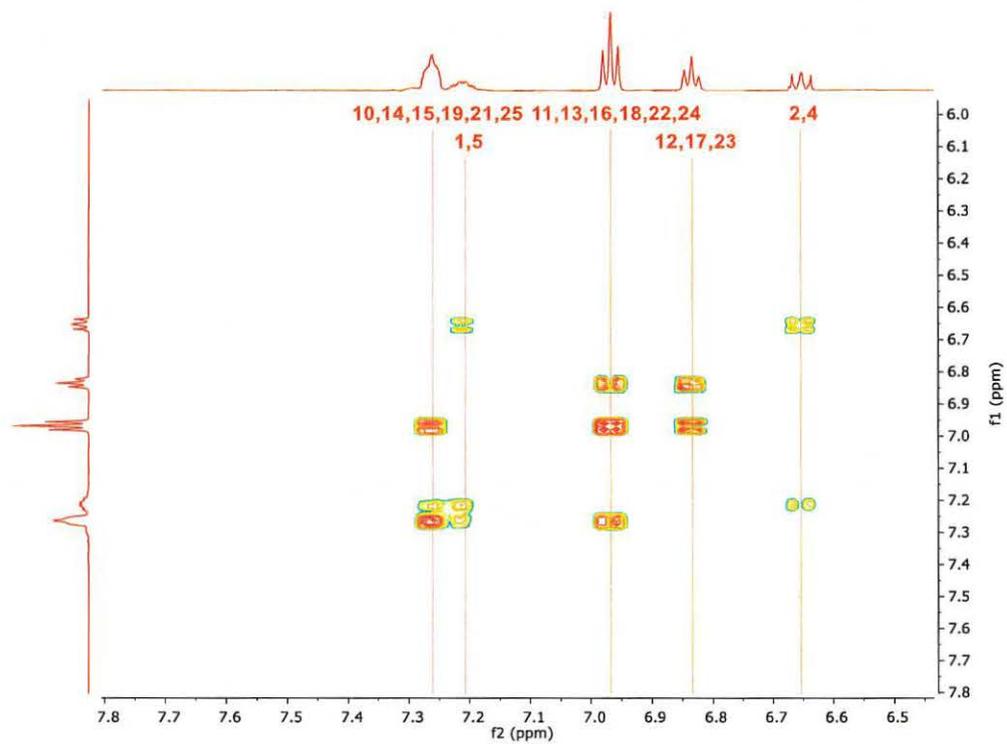
## 1D <sup>1</sup>H NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



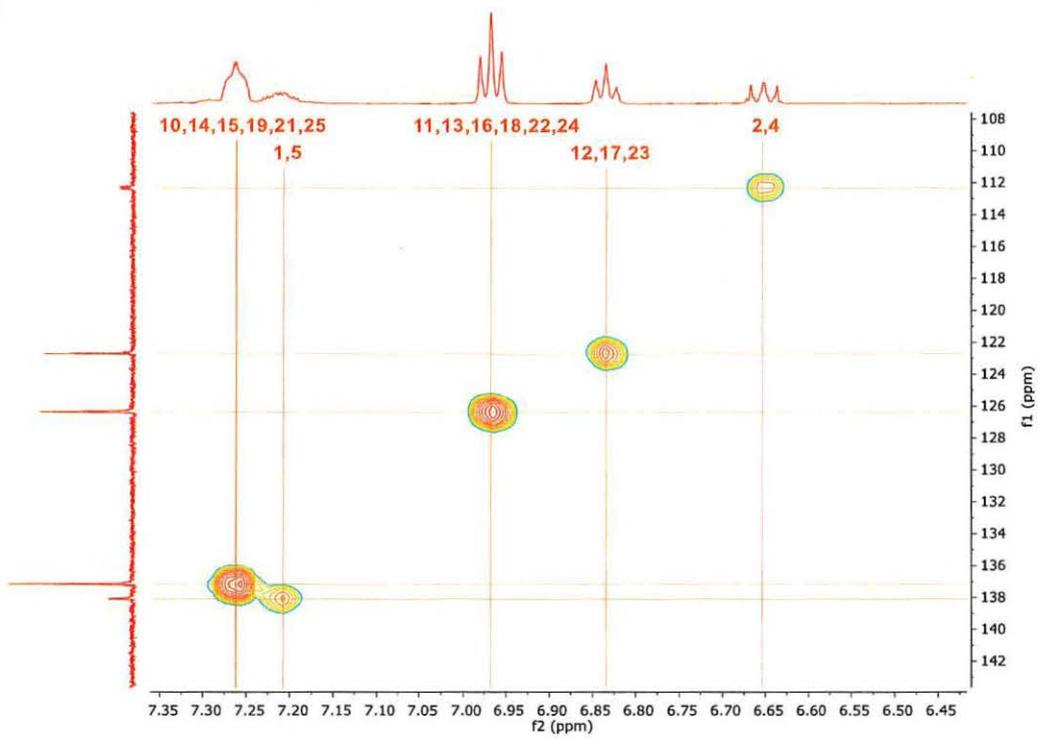
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



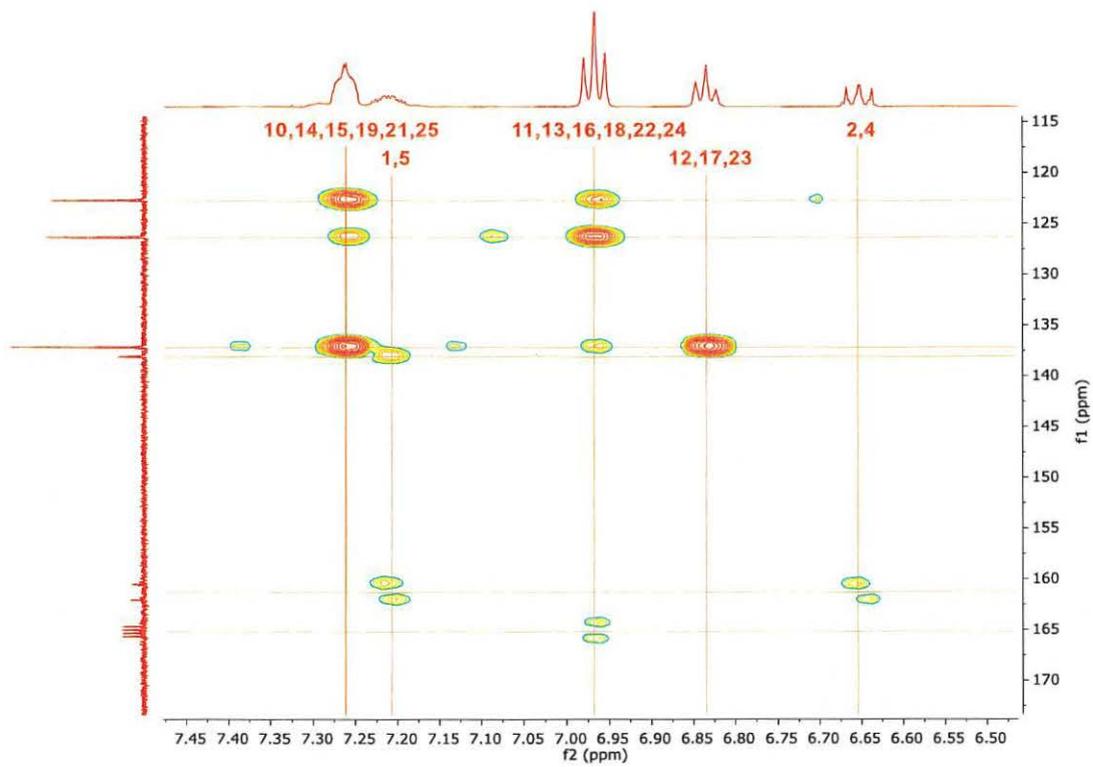
## 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (Methanol $\text{d}_4$ )



## 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HSQC (Methanol $\text{d}_4$ )

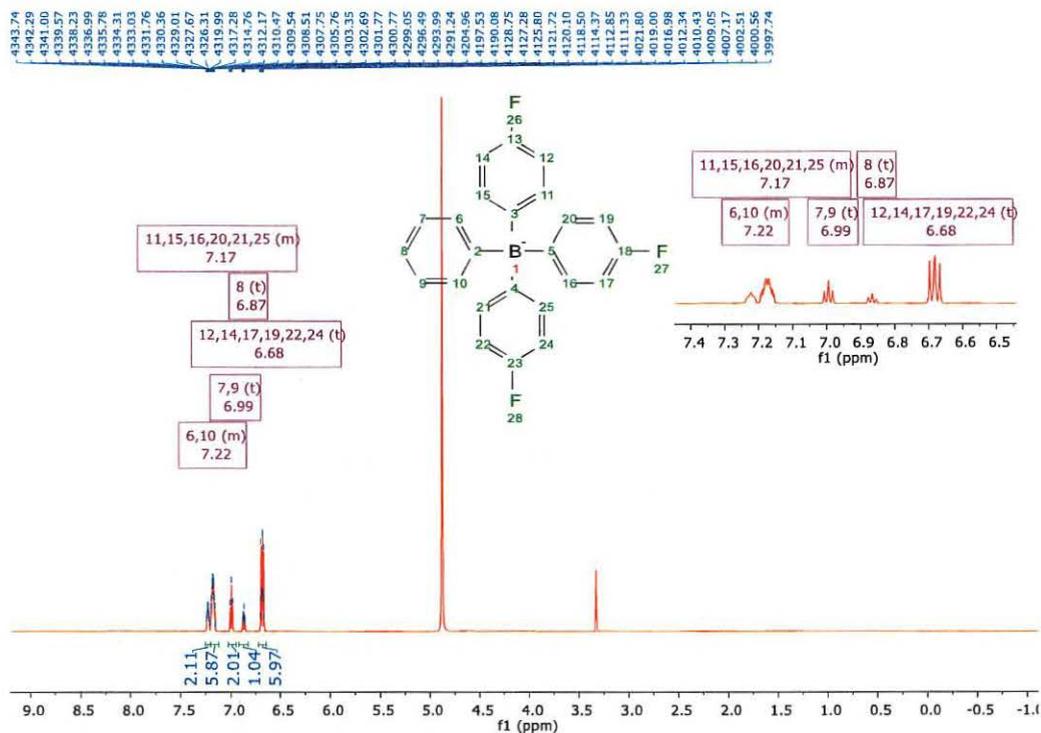


2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMBC (Methanol  $\text{d}_4$ )

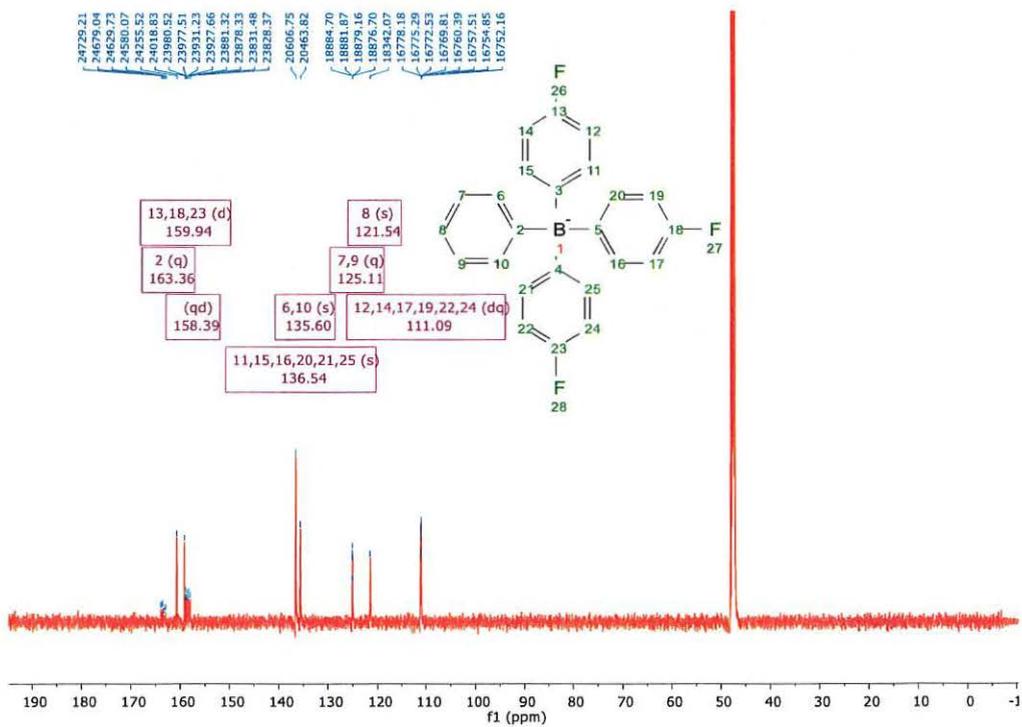


# Sodium tris(4-fluorophenyl)(phenyl)borate (3c)

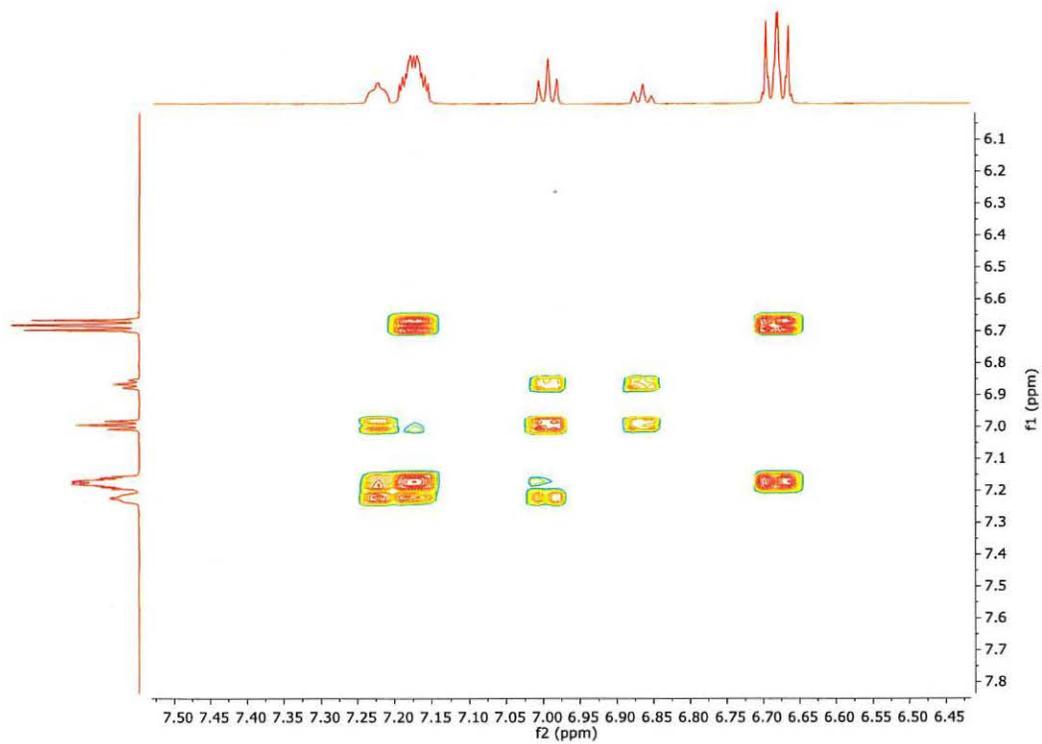
## 1D <sup>1</sup>H NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



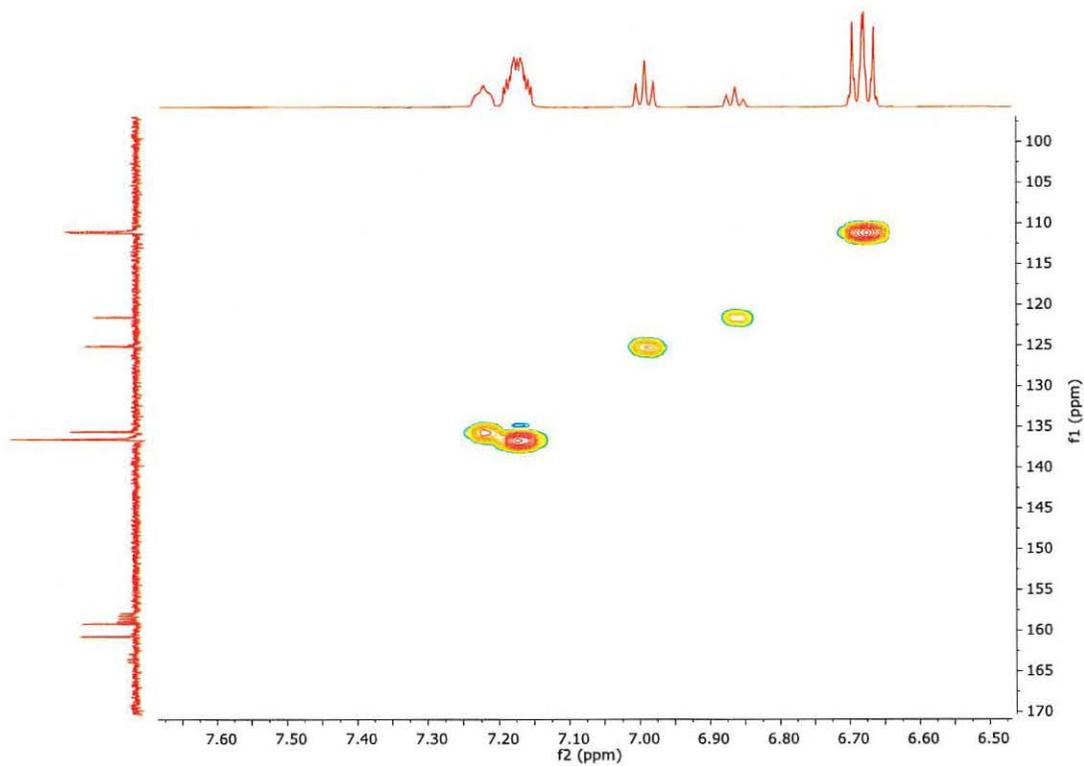
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



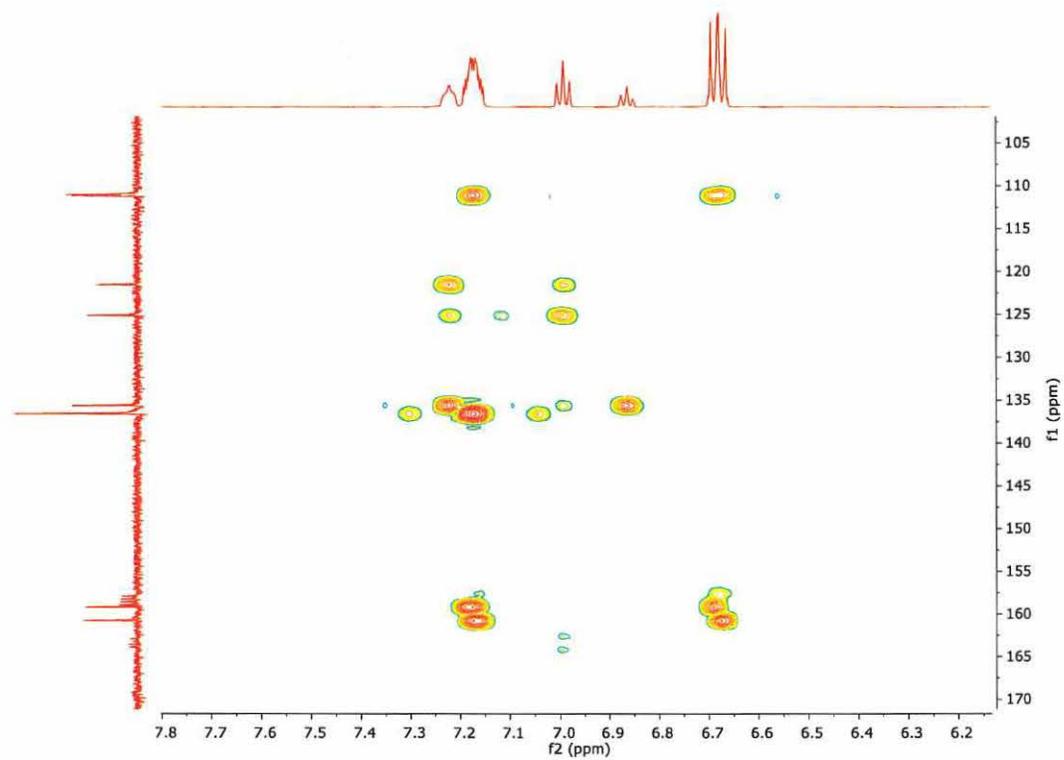
**2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Methanol  $\text{d}_4$ )**



**2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (Methanol  $\text{d}_4$ )**



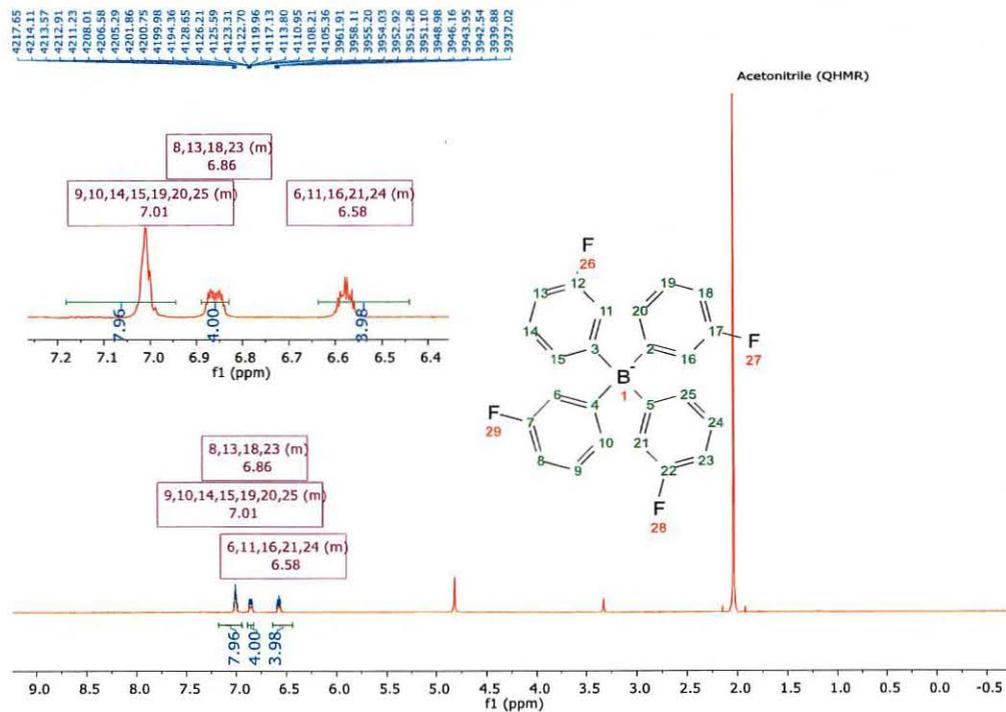
### 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HMBC (Methanol $\text{d}_4$ )



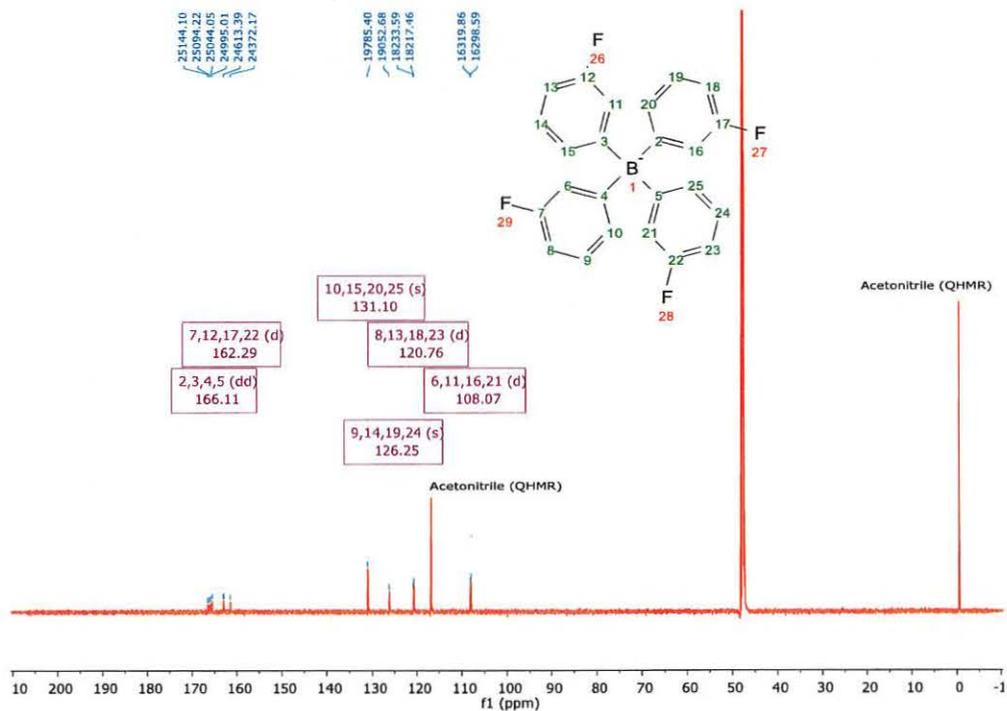


# Sodium tetra(3-fluorophenyl) borate (3e)

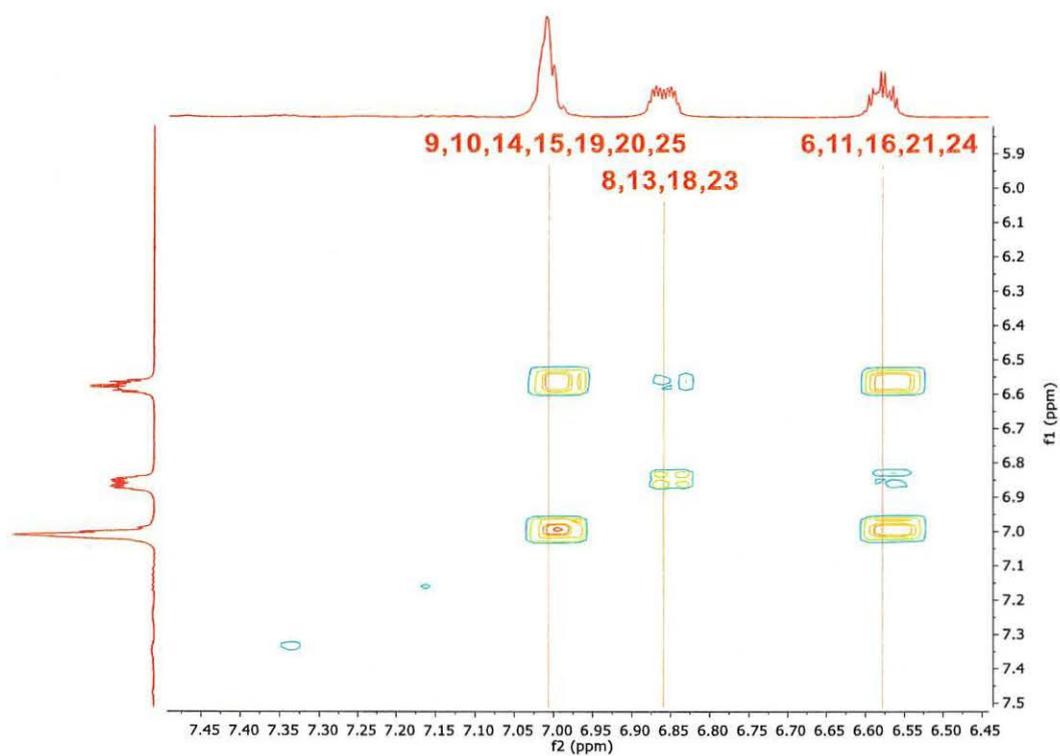
## 1D <sup>1</sup>H NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



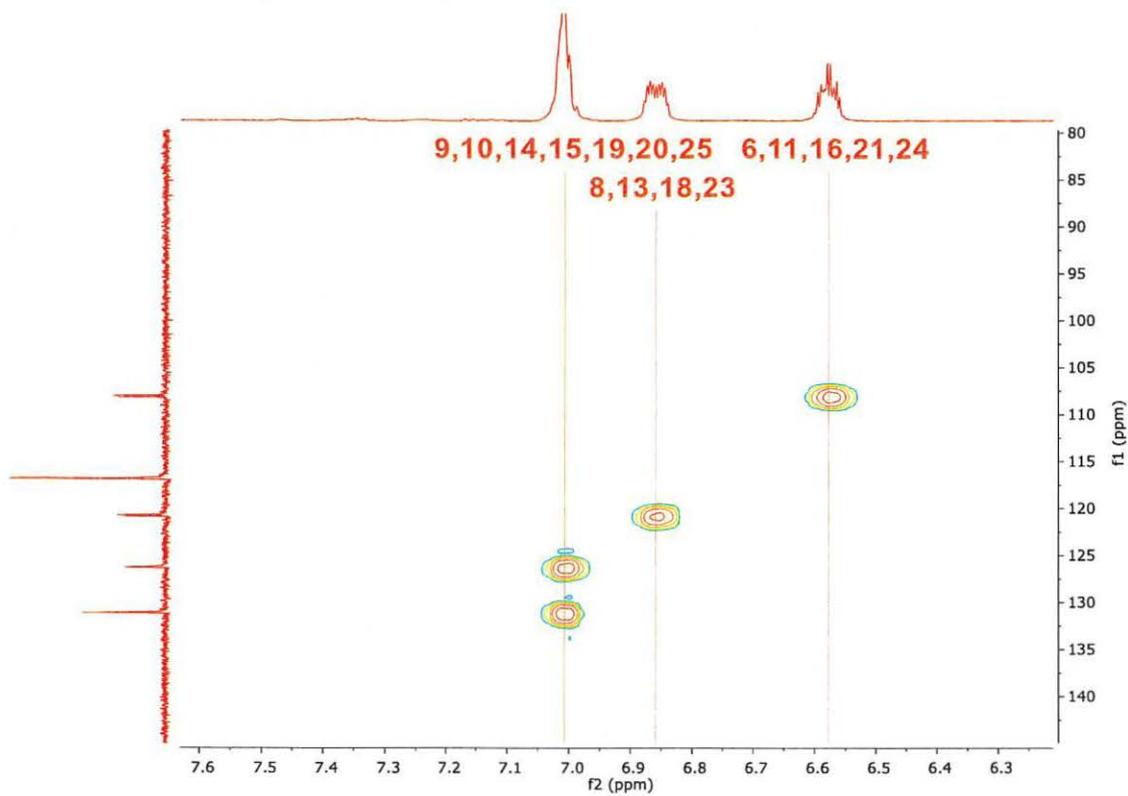
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (Methanol d<sub>4</sub>)



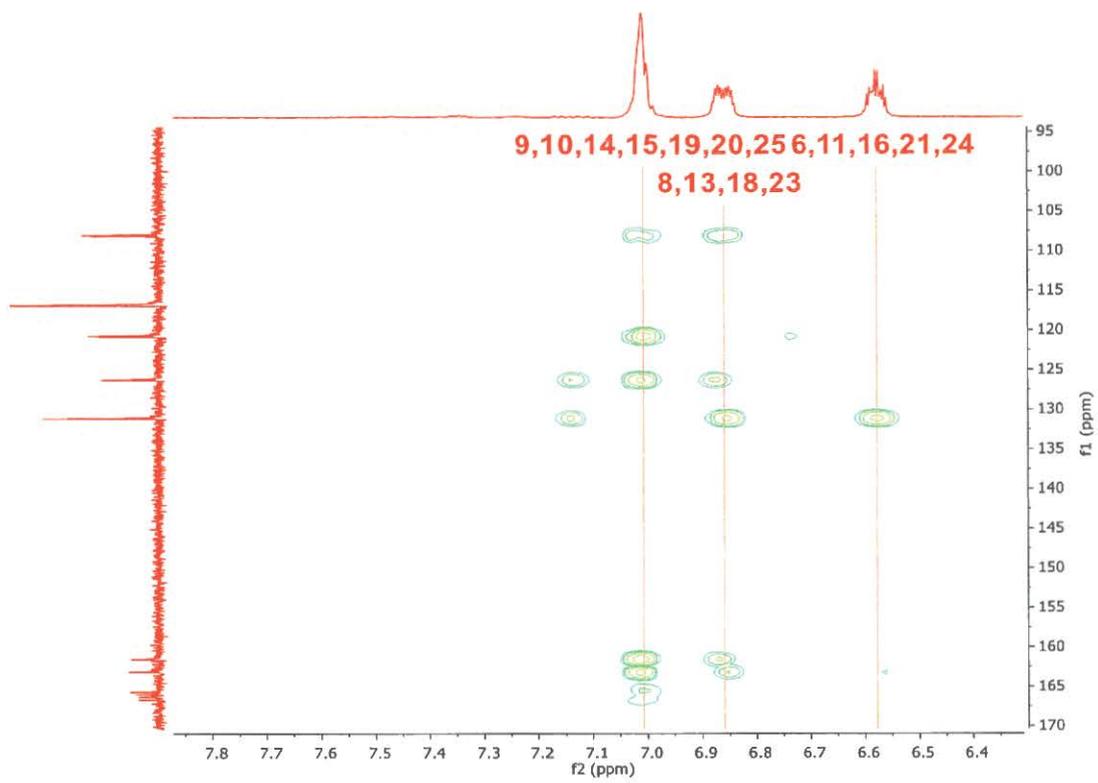
## 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Methanol d<sub>4</sub>)



**2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC (Methanol  $\text{d}_4$ )**



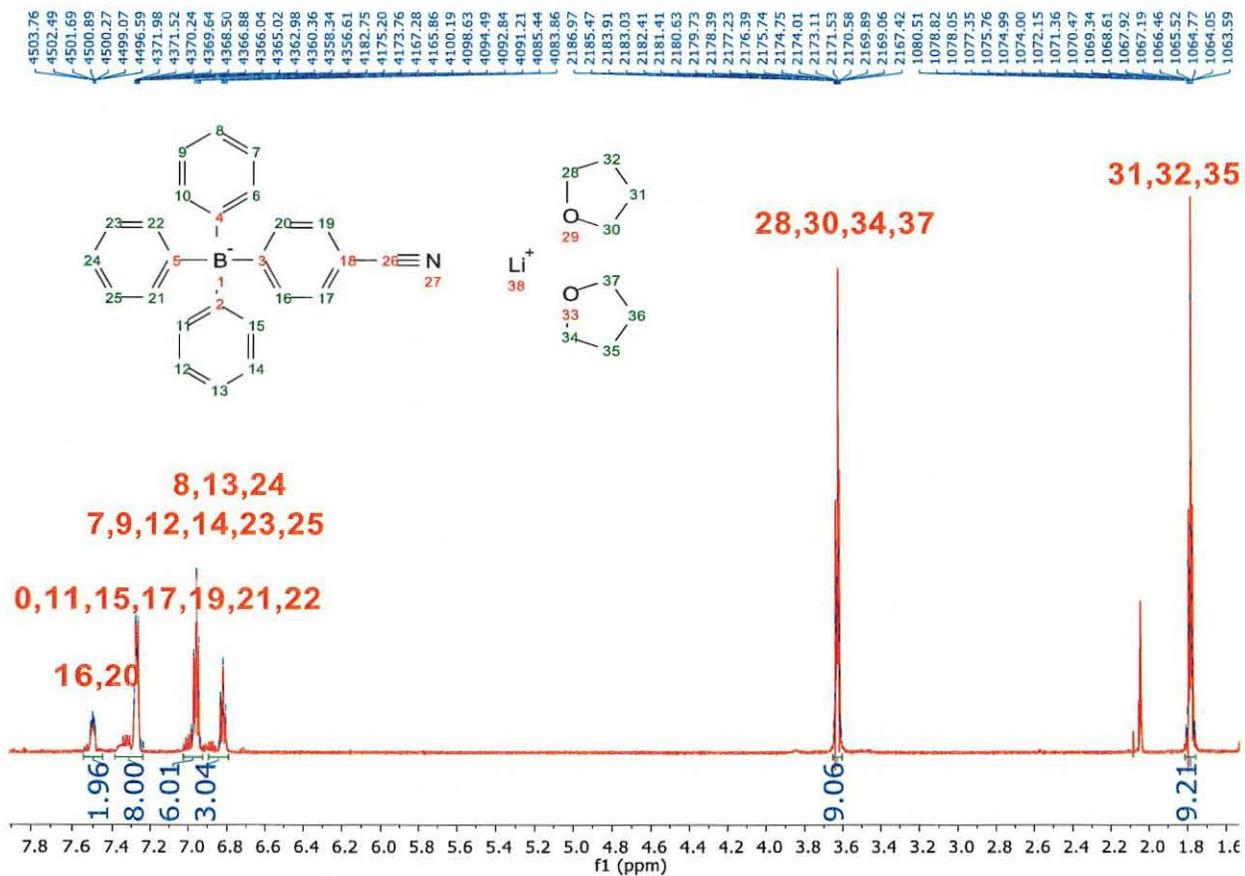
**2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMBC (Methanol  $\text{d}_4$ )**



## 8 SUPPORTING INFORMATION CHAPTER 2

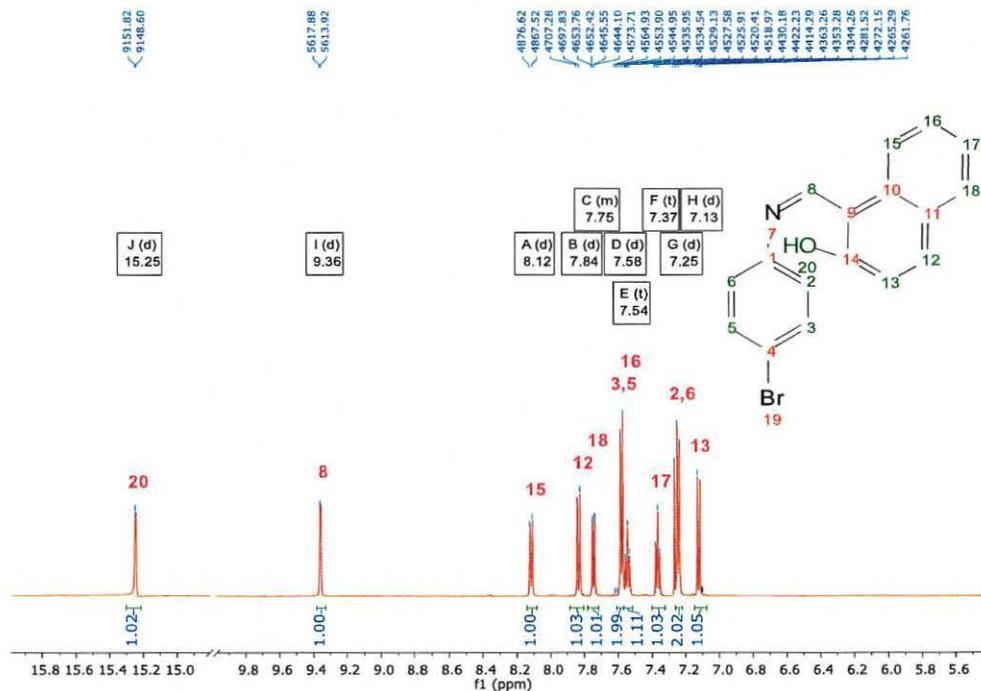
### Characterization of B, Lithium (4-cyanophenyl) triphenyl borate

#### 1D $^1\text{H}$ NMR (acetone $d_6$ )

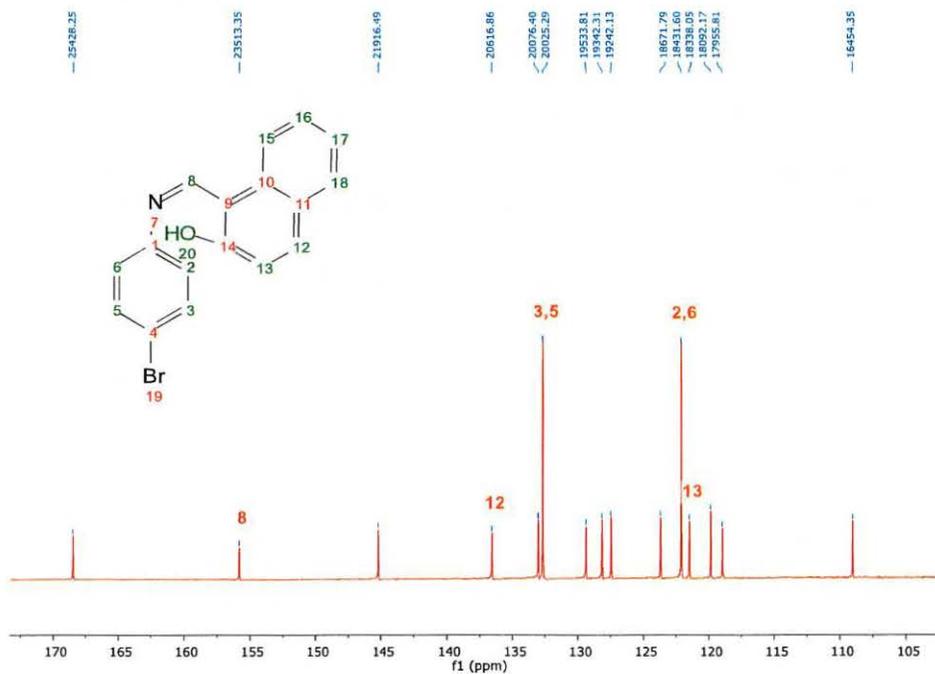


**Characterization of K, {4-[(E)-[(2-hydroxynaphthalen-1-yl)methylidene]amino]phenyl}triphenylborate**

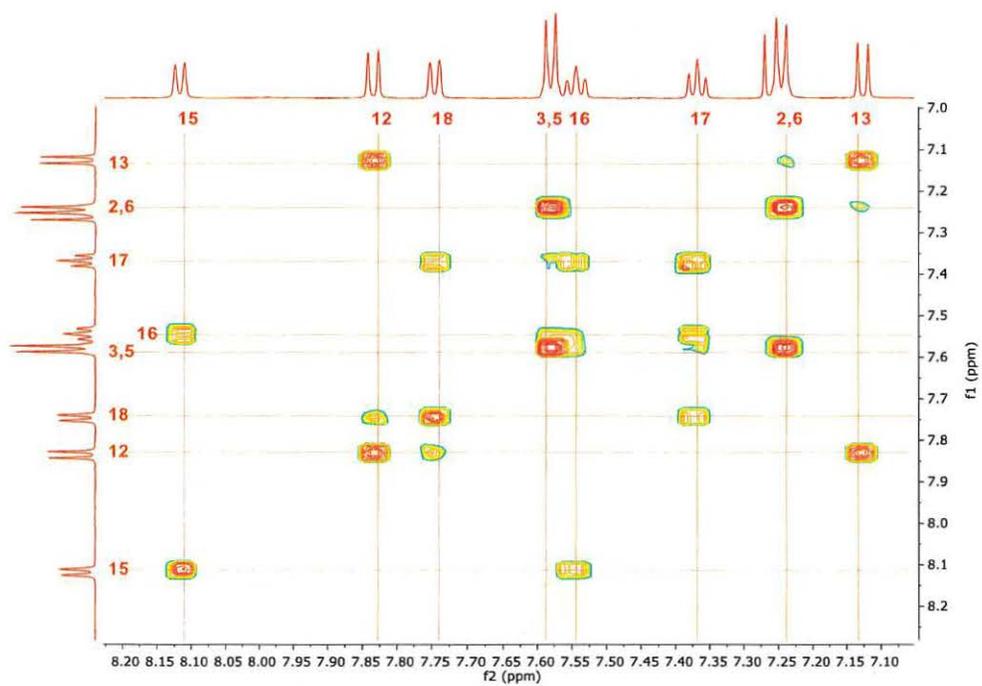
**1D <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)**



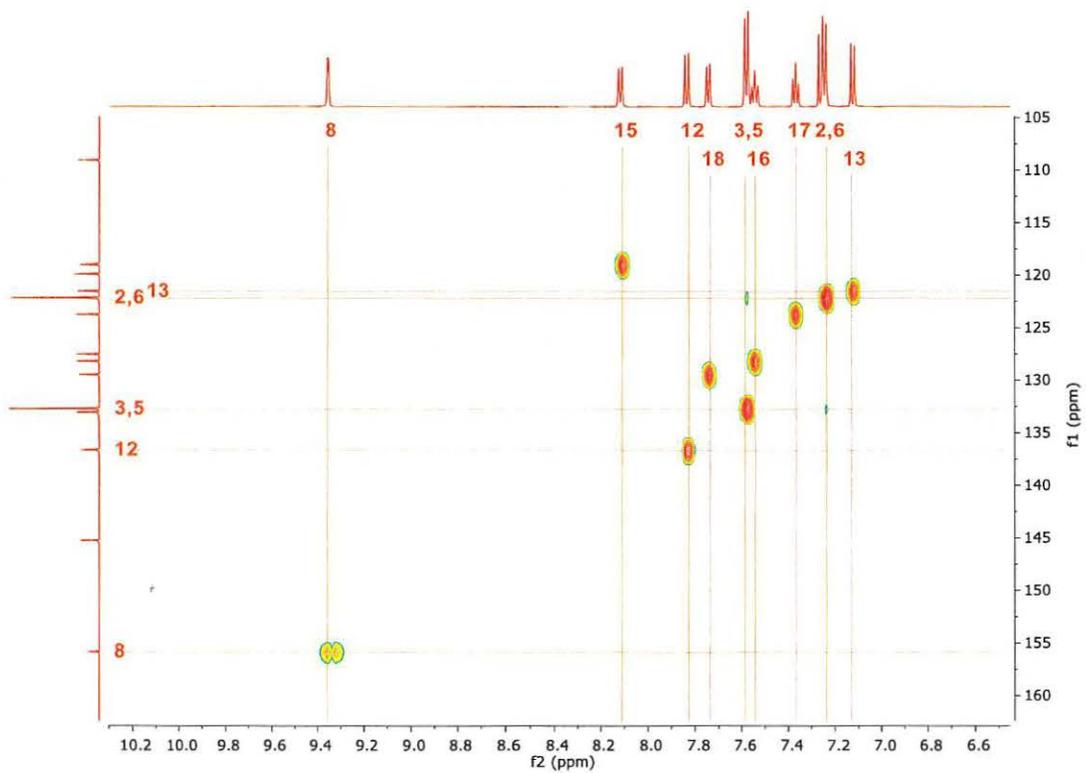
**1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (CDCl<sub>3</sub>)**



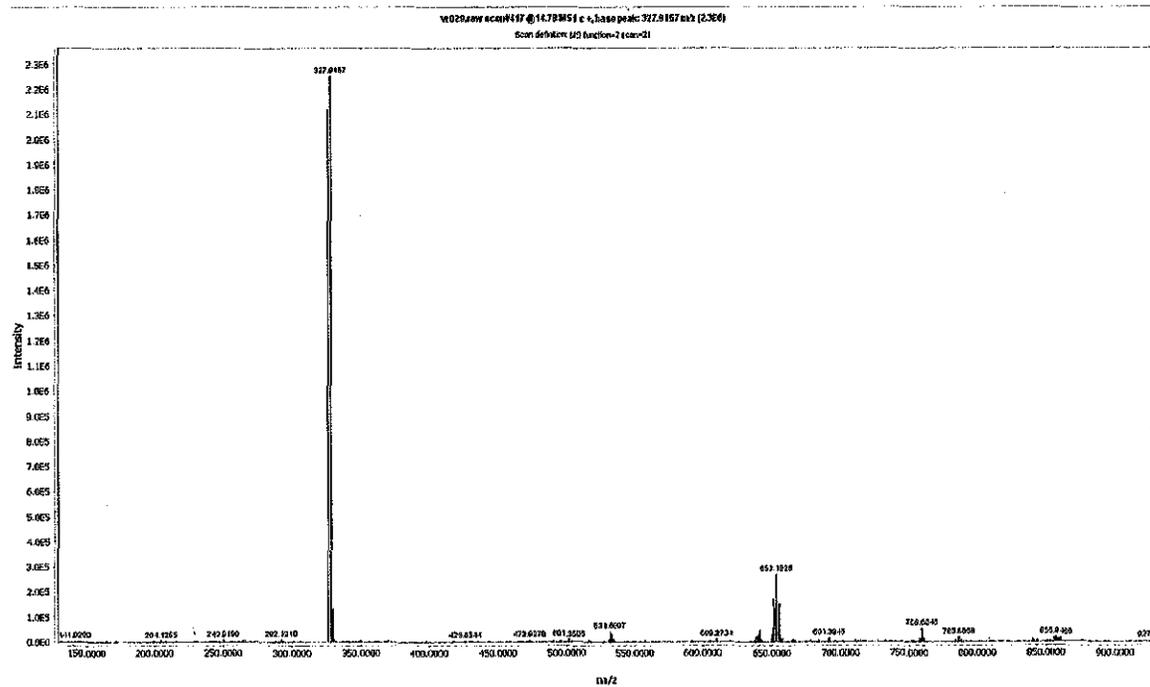
**2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (CDCl<sub>3</sub>)**



**2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC ( $\text{CDCl}_3$ )**

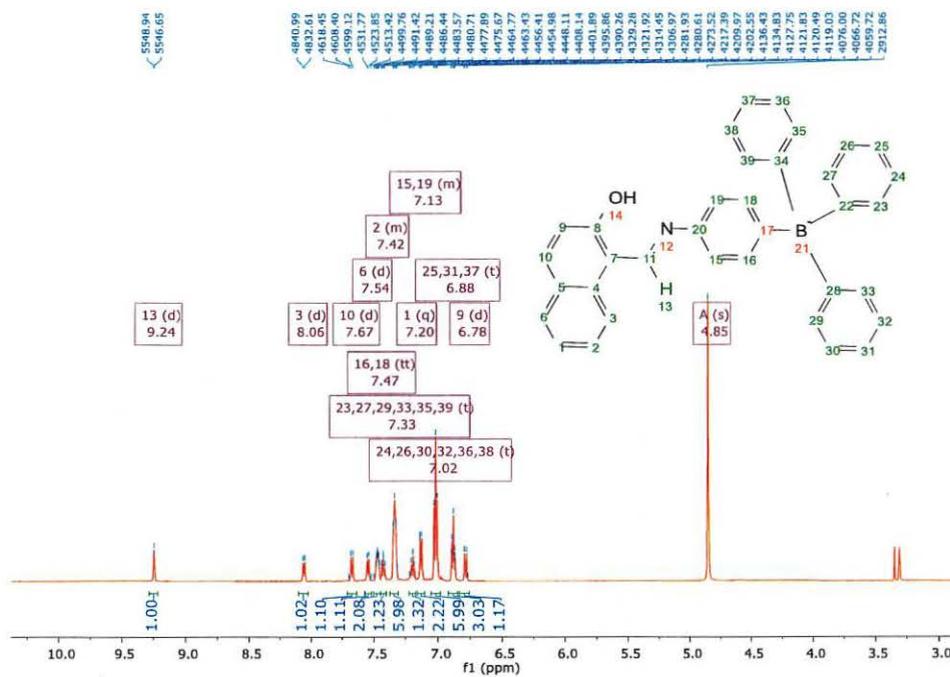


# HRMS spectra

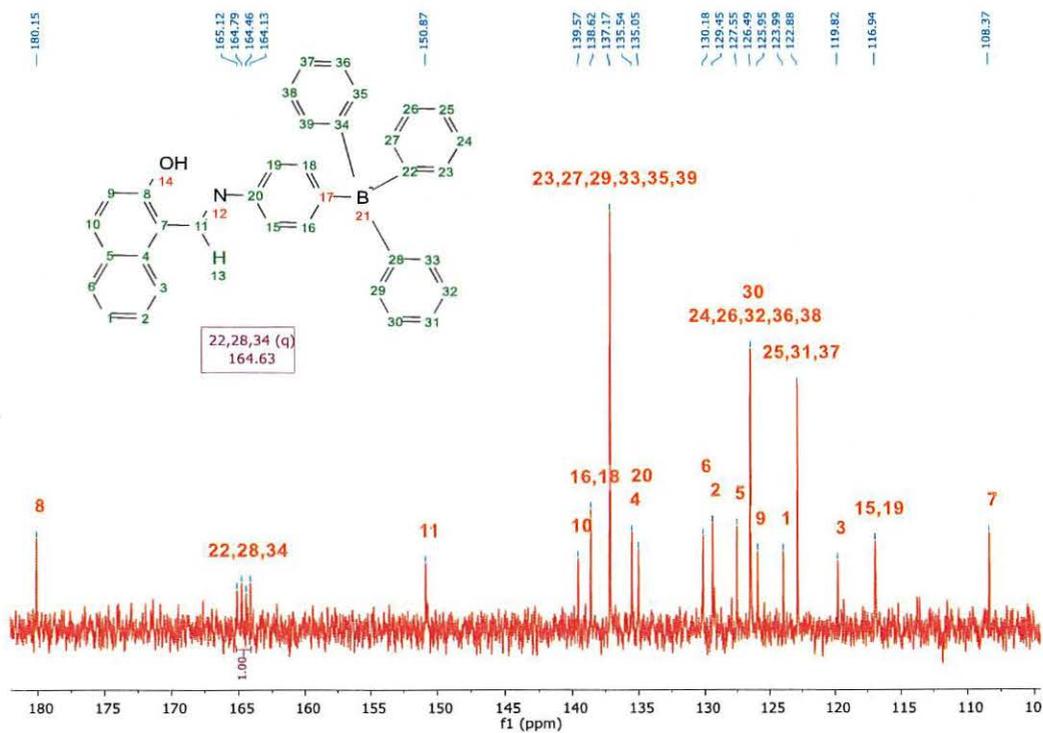


# Characterization of L, Sodium {4-[(E)-(2-hydroxynaphthalen-1-yl)methylidene]amino} phenyl} triphenyl borate

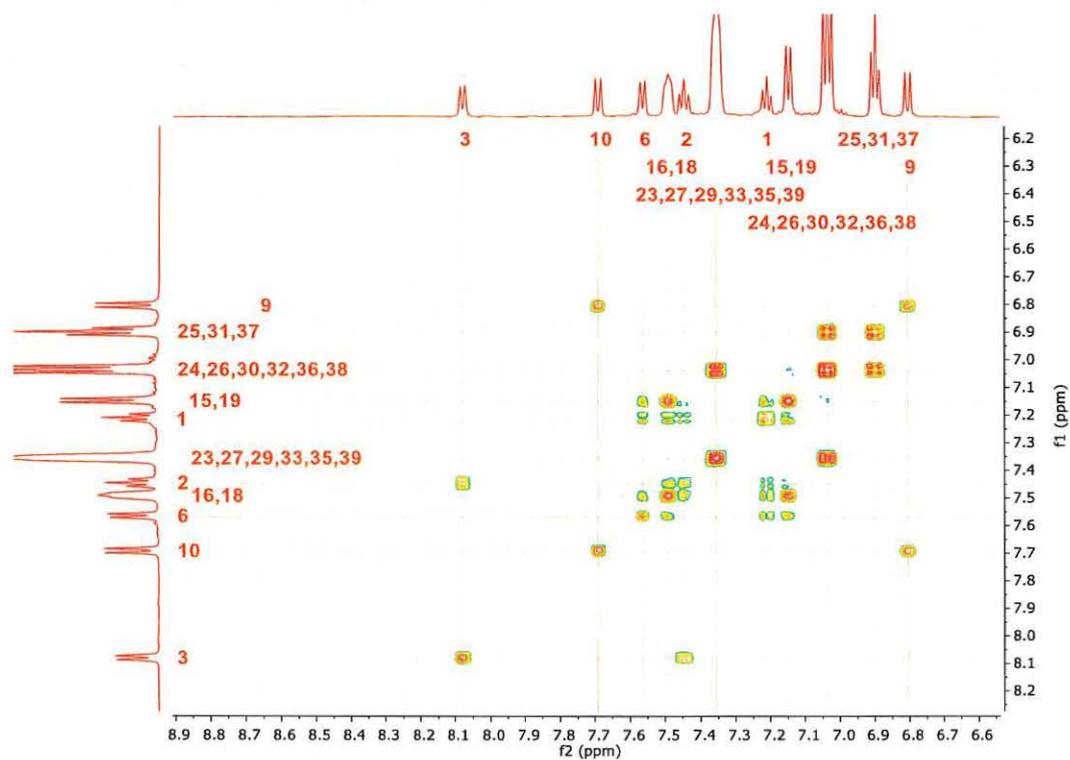
## 1D <sup>1</sup>H NMR (methanol d<sub>4</sub>)



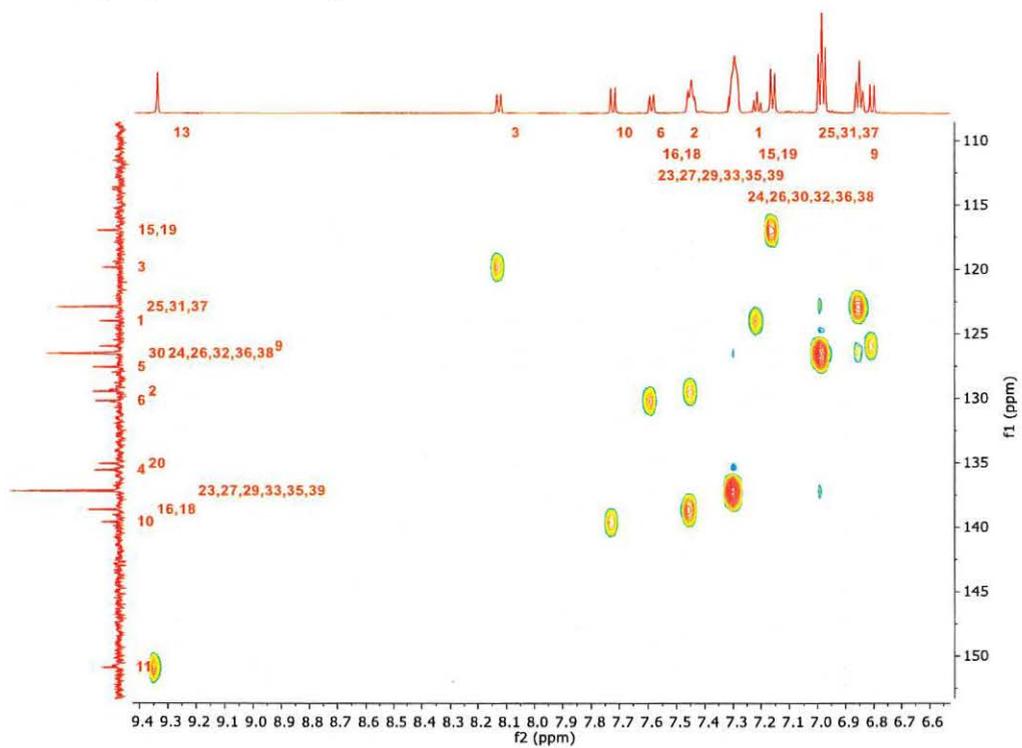
## 1D <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (methanol d<sub>4</sub>)



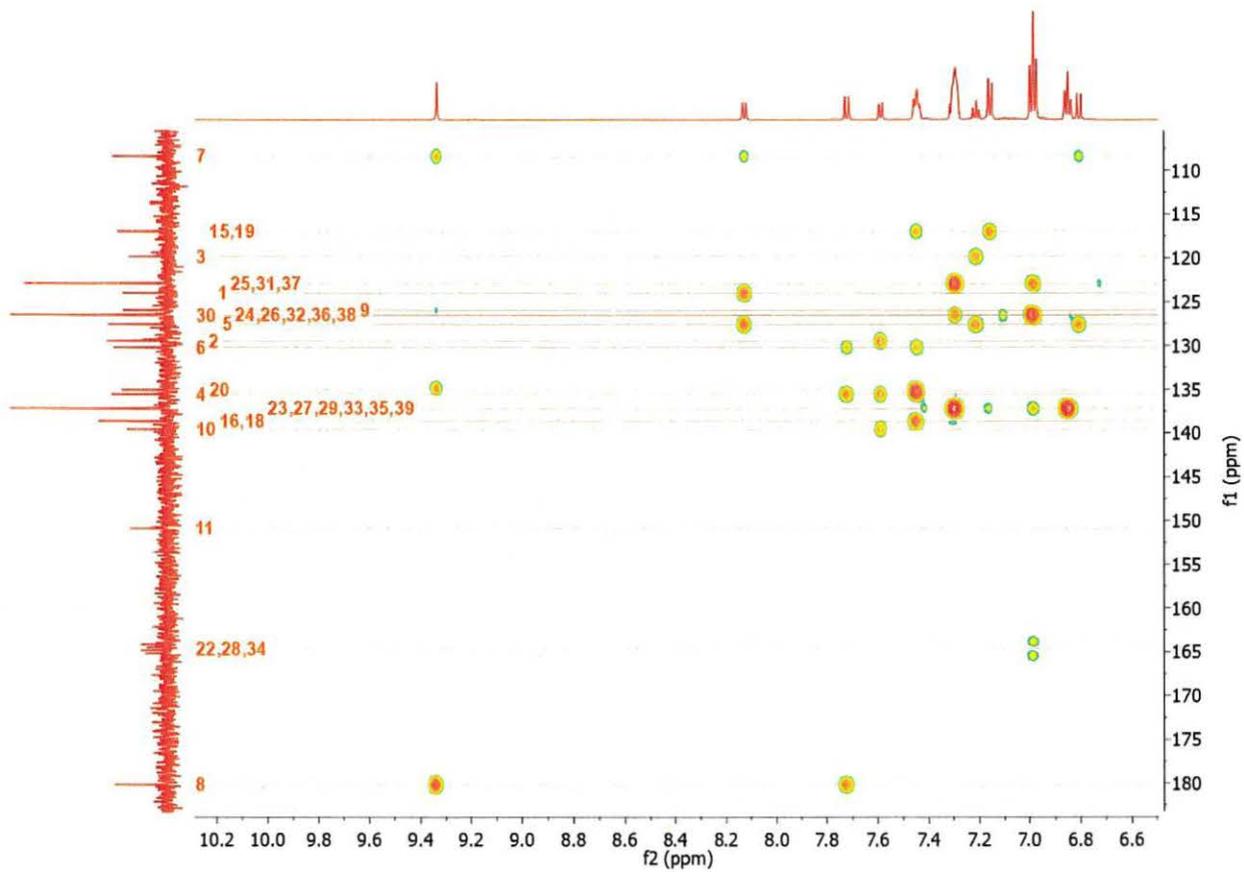
### 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (methanol $d_4$ )



### 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ HSQC (methanol $d_4$ )



2D <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HMBC (methanol d<sub>4</sub>)



## 9 BIBLIOGRAPHIE

---

- [1] S. Falkow, "Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity.," *Rev. Infect. Dis.*, vol. 10 Suppl 2, no. August, pp. 274–276, 1988.
- [2] M. S. Dodd *et al.*, "Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates," *Nature*, vol. 543, no. 7643, pp. 60–64, 2017.
- [3] D. Papp, "Histoire des antibiotiques.," pp. 124–138, 2018.
- [4] D. Davenport, "The war against bacteria: How were sulphonamide drugs used by Britain during World War II?," *Med. Humanit.*, vol. 38, no. 1, pp. 55–58, 2012.
- [5] D. Acemoglu and S. Johnson, "Disease and Development : The Effect of Life Expectancy on Economic Growth Daron Acemoglu and Simon Johnson," *J. Polit. Econ.*, vol. 115, no. 6, pp. 925–985, 2007.
- [6] E. Chain, H. Florey, and D. Control, "Aipm-14-56," vol. 14, no. 2, pp. 56–57, 2016.
- [7] E. P. Abraham and E. Chain, "An Enzyme from Bacteria able to," *Nature*, vol. 146, p. 837, 1940.
- [8] T. Watanabe, "Infective heredity of multiple drug resistance," *Bacteriol. Rev.*, vol. 27, no. 1, p. 87, 1963.
- [9] E. Culotta, "Funding crunch hobbles antibiotic resistance research," *Science (80-. )*, vol. 264, no. 5157, pp. 362–363, 1994.
- [10] R. Bax, "Antibiotic resistance - a view from the pharmaceutical industry," *Pharmacochem. Libr.*, vol. 29, no. C, pp. 237–241, 1998.
- [11] M. L. Cohen, "of infectious disease," vol. 406, no. August, 2000.
- [12] S. H. Podolsky, "The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018)," *Palgrave Commun.*, vol. 4, no. 1, 2018.
- [13] S. B. LEVY, "Antibiotic Use for Growth Promotion in Animals: Ecologic and Public Health Consequences," *J. Food Prot.*, vol. 50, no. 7, pp. 616–620, 1987.
- [14] S. Reviews and N. J. Aug, "Summary Report on Worldwide Antibiotic Resistance : International Task Forces on Antibiotic Use Author ( s ): John P . Burke and Stuart B . Levy Published by: Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4453681> Accessed : 27-04-2016 ," vol. 7, no. 4, pp. 560–564.
- [15] S. B. MILLER, R. V. et LEVY, "Gene transfer in the environment.," 1989.
- [16] S. B. LEVY, "Antibiotic resistance," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 4, no. 4,

pp. 195–197.

- [17] S. B. LEVY, “ANTIBIOTICS Threat vs Benefit,” *Antimicrob. Newsl.*, vol. 1, no. 2, pp. 11–14, 1984.
- [18] S. B. (2013) Levy, *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*. 2013.
- [19] B. Tim, “NIH retreat from controversy India embraces Shcharanskii release triggers hopes,” vol. 31920, no. February, p. 31920, 1986.
- [20] R. I. Aminov, “A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future,” *Front. Microbiol.*, vol. 1, no. DEC, pp. 1–7, 2010.
- [21] M. S. Arcilla *et al.*, “Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 16, no. 2, pp. 147–149, 2016.
- [22] M. Gasser, W. Zingg, A. Cassini, and A. Kronenberg, “Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in Switzerland,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 19, no. 1, pp. 17–18, 2019.
- [23] W. C Reygaert, “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria,” *AIMS Microbiol.*, vol. 4, no. 3, pp. 482–501, 2018.
- [24] A. M. Egorov, M. M. Ulyashova, and M. Y. Rubtsova, “Bacterial enzymes and antibiotic resistance,” *Acta Naturae*, vol. 10, no. 4, pp. 33–48, 2018.
- [25] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovola, and N. Kalogerakis, “Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A,” *Talanta*, vol. 80, no. 5, pp. 2057–2062, 2010.
- [26] A. Bridier, D. Le Coq, F. Dubois-Brissonnet, V. Thomas, S. Aymerich, and R. Briandet, “The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in Situ imaging,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011.
- [27] H. C. Flemming and J. Wingender, “The biofilm matrix,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 9, pp. 623–633, 2010.
- [28] L. Qi *et al.*, “Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. APR, pp. 1–10, 2016.
- [29] R. J. Reeser, R. T. Medler, S. J. Billington, B. H. Jost, and L. A. Joens, “Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1908–1913, 2007.
- [30] J. H. Lee and J. Lee, “Indole as an intercellular signal in microbial communities,”

- FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 34, no. 4, pp. 426–444, 2010.
- [31] H. H. Lee, M. N. Molla, C. R. Cantor, and J. J. Collins, “Bacterial charity work leads to population-wide resistance,” *Nature*, vol. 467, no. 7311, pp. 82–85, 2010.
- [32] J. I. Tietz, “The Problem with Pathogen-Selective Antibiotics,” no. May, pp. 105–138, 2019.
- [33] K. J. Molohon *et al.*, “Plantazolicin Is an Ultranarrow-Spectrum Antibiotic That Targets the *Bacillus anthracis* Membrane,” *ACS Infect. Dis.*, vol. 2, no. 3, pp. 207–220, 2016.
- [34] E. D. Brown and G. D. Wright, “Antibacterial drug discovery in the resistance era,” *Nature*, vol. 529, no. 7586, pp. 336–343, 2016.
- [35] W. J. Kim *et al.*, “Commensal *Neisseria* Kill *Neisseria gonorrhoeae* through a DNA-Dependent Mechanism,” *Cell Host Microbe*, pp. 228–239, 2019.
- [36] R. Franco-Duarte *et al.*, “Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 5, 2019.
- [37] N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, and J. S. Viridi, “MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. AUG, pp. 1–16, 2015.
- [38] R. J. Melander, D. V. Zurawski, and C. Melander, “Narrow-spectrum antibacterial agents,” *Medchemcomm*, vol. 9, no. 1, pp. 12–21, 2018.
- [39] B. Y. G. G. Copeland, “Blindness of the Newborn—A preventable Disease,” *Can Med Assoc J*, 1917.
- [40] ECDC, “Gonorrhoea-Annual Epidemiological Report for 2017.,” *Eur. Cent. Dis. Prev. Control*, 2016.
- [41] J. W. H. Eyre and B. H. Stewart, “the Treatment of *Gonococcus* Infections By Vaccines.,” *Lancet*, vol. 174, no. 4480, pp. 76–81, 1909.
- [42] L. A. S. Snyder, S. McGowan, M. Rogers, E. Duro, E. O’Farrell, and N. J. Saunders, “The repertoire of minimal mobile elements in the *Neisseria* species and evidence that these are involved in horizontal gene transfer in other bacteria,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, no. 12, pp. 2802–2815, 2007.
- [43] M. K. Taha *et al.*, “Evolutionary events associated with an outbreak of meningococcal disease in men who have sex with men,” *PLoS One*, vol. 11, no. 5, pp. 1–11, 2016.
- [44] L. A. S. Snyder and N. J. Saunders, “The majority of genes in the pathogenic

- Neisseria species are present in non-pathogenic *Neisseria lactamica*, including those designated as 'virulence genes," *BMC Genomics*, vol. 7, pp. 1–11, 2006.
- [45] D. Hanman, "Meningitis caused by *Neisseria lactamica*," *N Engl J Med*, vol. 299, p. 491, 1978.
- [46] D. W. Denning and S. S. Gill, "*Neisseria lactamica* meningitis following skull trauma," *Rev. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 2, pp. 216–218, 1991.
- [47] F. J. Veyrier *et al.*, "Common Cell Shape Evolution of Two Nasopharyngeal Pathogens," *PLoS Genet.*, vol. 11, no. 7, pp. 1–23, 2015.
- [48] W. Vollmer, D. Blanot, and M. A. De Pedro, "Peptidoglycan structure and architecture," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 32, no. 2, pp. 149–167, 2008.
- [49] A. J. Dijkstra and W. Keck, "Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport," *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 19, pp. 5555–5562, 1996.
- [50] D. S. Stephens, B. Greenwood, and P. Brandtzaeg, "Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*," *Lancet*, vol. 369, no. 9580, pp. 2196–2210, 2007.
- [51] H. I. Zgurskaya, C. A. López, and S. Gnanakaran, "Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches to Bypass It," *ACS Infect. Dis.*, vol. 1, no. 11, pp. 512–522, 2016.
- [52] D. KAHLER, Charlene M. et STEPHENS, "Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin).," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 24, no. 4, pp. 281–334, 1998.
- [53] C. M. Kahler, A. Datta, Y. L. Tzeng, R. W. Carlson, and D. S. Stephens, "Inner core assembly and structure of the lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis*: Capacity of strain NMB to express all known immunotype epitopes," *Glycobiology*, vol. 15, no. 4, pp. 409–419, 2005.
- [54] D. Perkins-balding and I. Stojiljkovic, "Iron Transport Systems in," *Society*, vol. 68, no. 1, pp. 154–171, 2004.
- [55] C. Kleanthous and J. P. Armitage, "The bacterial cell envelope," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 370, no. 1679, pp. 1–17, 2015.
- [56] Y. Hooda, H. E. Shin, T. J. Bateman, and T. F. Moraes, "Neisserial surface lipoproteins: Structure, function and biogenesis," *Pathog. Dis.*, vol. 75, no. 2, pp. 1–14, 2017.
- [57] Joseph F Alicino, "Tetraphenylboron derivatives of tetracycline antibiotics,"

US3277172A, 1964.

- [58] J. H. Davis, "Boronium-ion-based ionic liquids and methods of use thereof," US7709635B2, 2006.
- [59] X. Chen, K. Bastow, B. Goz, L. Kucera, S. L. Morris-Natschke, and K. S. Ishaq, "Boronic acid derivatives targeting HIV-1," *Antivir. Chem. Chemother.*, vol. 7, no. 2, pp. 108–114, 1996.
- [60] S. Jagannath *et al.*, "A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma," *Br. J. Haematol.*, vol. 127, no. 2, pp. 165–172, 2004.
- [61] R. Smoum, A. Rubinstein, V. M. Dembitsky, and M. Srebnik, "Boron containing compounds as protease inhibitors," *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 7, pp. 4156–4220, 2012.
- [62] W. Moreira, S. Santhanakrishnan, B. W. Dymock, and T. Dick, "Bortezomib warhead-switch confers dual activity against mycobacterial caseinolytic protease and proteasome and selectivity against human proteasome," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. APR, pp. 6–11, 2017.
- [63] C. T. Supuran, "Bortezomib inhibits bacterial and fungal  $\beta$ -carbonic anhydrases," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 24, no. 18, pp. 4406–4409, 2016.
- [64] S. J. Hecker *et al.*, "Discovery of a cyclic boronic acid  $\beta$ -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 9, pp. 3682–3692, 2015.
- [65] T. Akama *et al.*, "Discovery and structure-activity study of a novel benzoxaborole anti-inflammatory agent (AN2728) for the potential topical treatment of psoriasis and atopic dermatitis," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 8, pp. 2129–2132, 2009.
- [66] A. Nocentini *et al.*, "Benzoxaboroles as Efficient Inhibitors of the  $\beta$ -Carbonic Anhydrases from Pathogenic Fungi: Activity and Modeling Study," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 8, no. 11, pp. 1194–1198, 2017.
- [67] V. Alterio *et al.*, "Benzoxaborole as a new chemotype for carbonic anhydrase inhibition," *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 80, pp. 11983–11986, 2016.
- [68] D. Ding *et al.*, "Discovery of novel benzoxaborole-based potent antitrypanosomal agents," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 1, no. 4, pp. 165–169, 2010.
- [69] Z. Qiao *et al.*, "Chalcone-benzoxaborole hybrid molecules as potent antitrypanosomal agents," *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 7, pp. 3553–3557, 2012.

- [70] R. T. Jacobs *et al.*, "Scyx-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human african trypanosomiasis," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 6, 2011.
- [71] A. Brzozowska *et al.*, "Benzosiloxaboroles: Silicon Benzoxaborole Congeners with Improved Lewis Acidity, High Diol Affinity, and Potent Bioactivity," *Organometallics*, vol. 34, no. 12, pp. 2924–2932, 2015.
- [72] H. J. Cluley, "The determination of potassium by precipitation as potassium tetraphenylboron and its application to silicate analysis," *Analyst*, vol. 80, no. 950, pp. 354–364, 1955.
- [73] B. T. Loughrey, P. C. Healy, P. G. Parsons, and M. L. Williams, "Selective cytotoxic Ru(II) arene Cp\* complex salts [R-PhRuCp\*]<sup>+</sup>X<sup>-</sup> for X = BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, and BPh<sub>4</sub><sup>-</sup>," *Inorg. Chem.*, vol. 47, no. 19, pp. 8589–8591, 2008.
- [74] G. Golbaghi *et al.*, "Organoruthenium(II) Complexes Bearing an Aromatase Inhibitor: Synthesis, Characterization, in Vitro Biological Activity and in Vivo Toxicity in Zebrafish Embryos," *Organometallics*, vol. 38, no. 3, pp. 702–711, 2019.
- [75] M. M. Haghdoost, G. Golbaghi, J. Guard, S. Sielanczyk, S. A. Patten, and A. Castonguay, "Synthesis, characterization and biological evaluation of cationic organoruthenium(ii) fluorene complexes: Influence of the nature of the counteranion," *Dalt. Trans.*, vol. 48, no. 35, pp. 13396–13405, 2019.
- [76] L. L. Grinius *et al.*, "Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles," *BBA - Bioenerg.*, vol. 216, no. 1, pp. 1–12, 1970.
- [77] *et al.* BAKEEVA, L. E., GRINIUS, L. L., JASAITIS, A. A., "Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria," *BBA - Bioenerg.*, vol. 216, no. 1, pp. 13–21, 1970.
- [78] J. Oliver, "Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. III. Chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 216, no. 1, pp. 22–29, 1970.
- [79] T. Aiuchi, Y. Shirane, H. Kinemuchi, Y. Arai, K. Nakaya, and Y. Nakamura, "Enhancement by tetraphenylboron of inhibition of mitochondrial respiration induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>)," *Neurochem. Int.*, vol. 12, no. 4, pp. 525–531, 1988.

- [80] A. Hunziker, F. W. Orme, and R. I. Macey, "Transport of hydrophobic ions in erythrocyte membrane: I. Zero membrane potential properties," *J. Membr. Biol.*, vol. 84, no. 2, pp. 147–156, 1985.
- [81] F. J. V. Eve Bernet, Marthe Lebughe, Antony T. Vincent, Mohammad Mehdi Haghdoost, Golara Golbaghi, Steven Laplante, Annie Castonguay, "Sodium tetraphenylborate displays selective bactericidal activity against *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae* and is effective to reduce bacterial infection load.," *Submitt. to Antimicrob. Agents Chemother.*, 2020.
- [82] F. Castonguay, A.; Veyrier, "Compounds and methods for the treatment of pathogenic *Neisseria*," WO 2020/051701, 2020.
- [83] F. C. & S. V Criado MT, "Studies on the implication of surface hydrophobicity in the adherence of *Neisseria meningitidis* to buccal epithelial cells.," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 1, no. 175, pp. 27–34, 1986.
- [84] M. Rosenberg, "Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 262, no. 2, pp. 129–134, 2006.
- [85] R. Anulewicz-Ostrowska, T. Kliś, D. Krajewski, B. Lewandowski, and J. Serwatowski, "Synthesis of some halogenated tetraarylborates," *Tetrahedron Lett.*, vol. 44, no. 39, pp. 7329–7331, 2003.
- [86] K. Fujiki *et al.*, "Syntheses and lipophilicities of tetraarylborate ions substituted with many trifluoromethyl groups," *J. Fluor. Chem.*, vol. 57, no. 1–3, pp. 307–321, 1992.
- [87] J. VANDKBERG, "Studies in the tetraarylborates: The preparation and reagent properties of sodium tetrakis (p-trifluoromethylphenyl) borate and sodium tetrakis (m-fluorophenyl) borate," *Anal. Chim. Acta*, vol. 44, no. 1, pp. 175–183, 1969.
- [88] H. Nishida, N. Takada, M. Yoshimura, T. Sonoda, and H. Kobayashi, "Tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate. Highly Lipophilic Stable Anionic Agent for Solvent-extraction of Cations," *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 57, no. 9. pp. 2600–2604, 1984.
- [89] A. J. Martínez-Martínez and A. S. Weller, "Solvent-free anhydrous Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> salts of [B(3,5-(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, [BArF<sub>4</sub>]<sup>-</sup>. Improved synthesis and solid-state structures," *Dalt. Trans.*, vol. 48, no. 11, pp. 3551–3554, 2019.
- [90] H. C. Brown, N. G. Bhat, and V. Somayaji, "Organoboranes. 30. Convenient

- Procedures for the Synthesis of Alkyl- and Alkenylboronic Acids and Esters,” *Organometallics*, vol. 2, no. 10, pp. 1311–1316, 1983.
- [91] W. D. OLLIS, *Comprehensive Organic Chemistry: The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*. 1979.
- [92] H. C. Brown and U. S. Racherla, “Ultrasonics in organoborane chemistry, rapid synthesis of triorganylboranes via a modified organometallic route,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 26, no. 36, pp. 4311–4314, 1985.
- [93] H. C. Brown and U. S. Racherla, “Organoboranes. 43. A Convenient, Highly Efficient Synthesis of Triorganylboranes via a Modified Organometallic Route,” *J. Org. Chem.*, vol. 51, no. 4, pp. 427–432, 1986.
- [94] T. Klis, A. Libura, and J. Serwatowski, “Formation of arylboron compounds from arylmagnesium reagents and trialkoxyboranes,” *Main Gr. Met. Chem.*, vol. 25, no. 8, pp. 479–484, 2002.
- [95] F. Liguori, S. Coiai, E. Passaglia, and P. Barbaro, “Strong cation exchange with innocence: Synthesis and characterization of borate containing resins and macroporous monoliths,” *Macromolecules*, vol. 46, no. 14, pp. 5423–5433, 2013.
- [96] B. M. Berven, R. O. Oviasuyi, R. J. Klassen, M. Idacavage, E. R. Gillies, and P. J. Ragogna, “Self-crosslinking borate anions for the production of tough UV-cured polyelectrolyte surfaces,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 51, no. 3, pp. 499–508, 2013.
- [97] A. Shiraishi, “Photosensitive resin composition with excellent curability,” JP2015-111022, 2016.
- [98] A. Shiraishi, “Borate salts for thermosetting resin and photocurable resin compositions with excellent storage stability and solubility,” 2016.
- [99] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, “Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 40, no. 11, pp. 2004–2021, 2001.
- [100] C. Richet, “On the relationship between the toxicity and the physical properties of substances,” *Compt Rendus Seances Soc Biol*, vol. 9, pp. 775–776, 1893.
- [101] H. Meyer, “Zur Theorie der Alkoholnarkose - 3. Mittheilung: Der Einfluss wechselnder Temperatur auf Wirkungsstärke und Theilungscoefficient der Narcotica,” *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie*, vol. 46, no. 5–6, pp. 338–346, 1901.

- [102] D. B. Lipinski CA, Lombardo F and F. PJ., "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 23, no. 3, pp. 3–25, 1997.
- [103] M. J. Waring, "Lipophilicity in drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, no. 3, pp. 235–248, 2010.
- [104] K. Valkó, "Chromatographic hydrophobicity index by fast-gradient RP-HPLC: A high-throughput alternative to log P/log D," *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 12, pp. 2022–2029, 1997.
- [105] T. Pieńko, M. Grudzień, P. P. Taciak, and A. P. Mazurek, "Cytisine basicity, solvation, log P, and log D theoretical determination as tool for bioavailability prediction," *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 63, pp. 15–21, 2016.
- [106] I. P. Román, A. Mastromichali, K. Tyrovola, A. Canals, and E. Psillakis, "Rapid determination of octanol-water partition coefficient using vortex-assisted liquid-liquid microextraction," *J. Chromatogr. A*, vol. 1330, pp. 1–5, 2014.
- [107] S. Amézqueta, X. Subirats, E. Fuguet, M. Rosés, and C. Ràfols, "Octanol-Water Partition Constant," *Liq. Extr.*, pp. 183–208, 2020.
- [108] E. W. Chappelle and G. V Levin, "Use of the Firefly Bioluminescent and Counting of Reaction Bacteria," *Biochem. Med.*, vol. 52, no. 1, pp. 41–52, 1968.
- [109] S. Van Nevel *et al.*, "Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring," *Water Res.*, vol. 113, pp. 191–206, 2017.
- [110] E. Brodl, A. Winkler, and P. Macheroux, "Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 16, pp. 551–564, 2018.
- [111] M. K. W. I. Y. Y *et al.*, "Engineering the luxCDABE genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn 5 constructs," vol. 163, pp. 193–202, 1998.
- [112] S. De Oliveira and C. Saldanha, "An overview about erythrocyte membrane," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 44, no. 1, pp. 63–74, 2010.
- [113] J. Vinhal Costa Orsine *et al.*, "The Acute Cytotoxicity and Lethal Concentration (LC50) of *Agaricus sylvaticus* Through Hemolytic Activity on Human Erythrocyte," *Int. J. Nutr. Metab.*, vol. 4, no. 11, pp. 19–23, 2012.
- [114] M. Pagano and C. Faggio, "The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 33, no. 6, pp. 351–355, 2015.

- [115] Hamilton, "Integrated Taxonomic Information System." 1822.
- [116] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling, "Stages of embryonic development of the zebrafish," *Dev. Dyn.*, vol. 203, no. 3, pp. 253–310, 1995.
- [117] R. C. van Wijk, E. H. J. Krekels, T. Hankemeier, H. P. Spaink, and P. H. van der Graaf, "Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae," *Drug Discov. Today Dis. Model.*, vol. 22, no. 2016, pp. 27–34, 2016.
- [118] Jan M. Spitsbergen, "The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research—Advantages and Current Limitations," *Toxicol Pathol.*, vol. 31, pp. 62–87, 2003.
- [119] K. Howe *et al.*, "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome," *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 498–503, 2013.
- [120] L. Mhadhbi and R. Beiras, "Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*)," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 223, no. 9, pp. 5917–5930, 2012.
- [121] N. E. Todd and M. Van Leeuwen, "Effects of Sevin (carbaryl insecticide) on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 53, no. 2, pp. 267–272, 2002.
- [122] S. Bourrachot, O. Simon, and R. Gilbin, "The effects of waterborne uranium on the hatching success, development, and survival of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 90, no. 1, pp. 29–36, 2008.
- [123] K. S. Saili *et al.*, "Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish," *Toxicology*, vol. 291, no. 1–3, pp. 83–92, 2012.
- [124] S. P. Y. Li, C. T. S. Lau, M. W. Louie, Y. W. Lam, S. H. Cheng, and K. K. W. Lo, "Mitochondria-targeting cyclometalated iridium(III)-PEG complexes with tunable photodynamic activity," *Biomaterials*, vol. 34, no. 30, pp. 7519–7532, 2013.
- [125] M. Ali *et al.*, "Anticancer agents: Does a phosphonium behave like a Gold(I) phosphine complex? Let a 'smart' probe answer!," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 11, pp. 4521–4528, 2015.
- [126] L. Senerovic *et al.*, "Synthesis and evaluation of series of diazine-bridged dinuclear platinum(II) complexes through in vitro toxicity and molecular modeling:

- Correlation between structure and activity of pt(II) complexes," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 3, pp. 1442–1451, 2015.
- [127] M. M. Haghdoost, G. Golbaghi, J. Guard, S. Sielanczyk, S. A. Patten, and A. Castonguay, "of the counteranion †," 2019.
- [128] E. J. van den Brandhof and M. Montforts, "Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 73, no. 8, pp. 1862–1866, 2010.
- [129] C. J. van Leeuwen, D. M. M. Adema, and J. Hermens, "Quantitative structure-activity relationships for fish early life stage toxicity," *Aquat. Toxicol.*, vol. 16, no. 4, pp. 321–334, 1990.
- [130] Y. Li, W. Huang, S. Huang, J. Du, and C. Huang, "Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 422, no. 1, pp. 85–90, 2012.
- [131] N. A. Ducharme *et al.*, "Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133 chemicals from zebrafish developmental toxicity studies," *Reprod. Toxicol.*, vol. 41, pp. 98–108, 2013.
- [132] A. Prakash and D. Adhikari, "Application of Schiff bases and their metal complexes-A review," *Int. J. ChemTech Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 1891–1896, 2011.
- [133] R. Kant, V. Singh, G. Nath, S. K. Awasthi, and A. Agarwal, "Design, synthesis and biological evaluation of ciprofloxacin tethered bis-1,2,3-triazole conjugates as potent antibacterial agents," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 124, pp. 218–228, 2016.
- [134] D. Haddenham, L. Pasumansky, J. DeSoto, S. Eagon, and B. Singaram, "Reductions of aliphatic and aromatic nitriles to primary amines with diisopropylaminoborane," *J. Org. Chem.*, vol. 74, no. 5, pp. 1964–1970, 2009.
- [135] S. H. Lee and G. I. Nikonov, "Transfer hydrogenation of ketones, nitriles, and esters catalyzed by a half-sandwich complex of ruthenium," *ChemCatChem*, vol. 7, no. 1, pp. 107–113, 2015.
- [136] S. T. Murphy *et al.*, "The synthesis and biological evaluation of novel series of nitrile-containing fluoroquinolones as antibacterial agents," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 8, pp. 2150–2155, 2007.
- [137] K. Soai and A. Ookawa, "Mixed Solvents Containing Methanol as Useful Reaction Media for Unique Chemoselective Reductions with Lithium Borohydride," *J. Org. Chem.*, vol. 51, no. 21, pp. 4000–4005, 1986.

- [138] L. H. Amundsen and L. S. Nelson, "Reduction of Nitriles to Primary Amines with Lithium Aluminum Hydride," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73, no. 1, pp. 242–244, 1951.
- [139] D. B. Bagal and B. M. Bhanage, "Recent advances in transition metal-catalyzed hydrogenation of nitriles," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 357, no. 5, pp. 883–900, 2015.
- [140] et al. CLAYDEN, Jonathan, GREEVES, Nick, WARREN, Stuart, *Organic chemistry*. 2001.
- [141] Y. A. Cho, D. S. Kim, H. R. Ahn, B. Canturk, G. A. Molander, and J. Ham, "Preparation of potassium azidoaryltrifluoroborates and their cross-coupling with aryl halides," *Org. Lett.*, vol. 11, no. 19, pp. 4330–4333, 2009.
- [142] A. K. Bennett, M. A.; Smith, "Arene Ruthenium ( II ) Complexes formed by Dehydrogenation of Cyclo-," *J. C. S. Dalt.*, no. 2, pp. 233–241, 1974.