

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MÉTALLO-DENDRIMÈRES DÉRIVÉS DE L'ACIDE GALLIQUE À USAGE
ANTIBACTÉRIEN

THESE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA THESE DE DOCTORAT EN CHIMIE

PAR

ALY EL RIZ

AOÛT 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le professeur Mircea Alexandru Mateescu, pour m'avoir offert l'opportunité d'appartenir à son équipe de recherche et de pouvoir effectuer ma recherche en chimie médicinale. Je le remercie également pour son soutien personnel tout au long de cette période où il a pu être mon directeur de recherche, mais également la personne dont je pouvais toujours compter.

Je souhaite exprimer mes remerciements pour Pr. Sylvain Canesi, Pr. Mathieu Frenette et Pr. L'Hocine Yahia d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur René Roy pour m'avoir donné l'opportunité de travailler en chimie de synthèse pendant mon master.

Je tiens à remercier la Dre. Pompilia Ispas-Szabo pour sa gentillesse et ses conseils judicieux

Je remercie également Dr. Cahn Tien Le pour sa gentillesse et ses conseils judicieux.

Un grand Merci à la Dre Armelle Tchoumi Neree, à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, pour sa collaboration, ses conseils, sa disponibilité et pour tout ce que j'ai appris avec elle en microbiologie.

Je voudrais remercier aussi tous les membres du département de Chimie, Mmes Mylène Lacharité et Pascale Beauchemin. À Dr. Alexandre Arnold pour son aide, à Isabelle

Cloutier qui m'a aidé à obtenir un évaporateur rotatif, et à M. Rondeau de la bibliothèque UQAM pour son aide précieuse.

Un grand merci également à la Dre Mariela Gomez Perez pour sa collaboration.

Merci à tous les membres de l'équipe!

Je tiens finalement à remercier les membres de ma famille et en particulier ma femme qui m'a soutenu tout au long de mon doctorat.

DÉDICACE

Je dédie ce travail

À mes parents,

Qui ont éclairé mon chemin de leur amour inconditionnel,

J'aurais tant souhaité qu'ils soient présents

Pour partager ce moment,

La vie les a emportés mais leur présence demeure dans chaque souffle de ma vie.

À ma femme et à mes enfants,

Pour leur soutien indéfectible, leur patience et leur amour tout au long de ce parcours,

Un grand merci pour cet accompagnement avec tant de patience et de bienveillance
pendant toutes ces années.

À toute ma famille

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiii
RÉSUMÉ	xvi
ABSTRACT	xvii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Infections bactériennes et traitements antibiotiques.....	1
1.1.1 Infections bactériennes	1
1.1.2 Les antibiotiques.....	1
1.1.3 Mécanismes de l'activité antibactérienne des antibiotiques.....	2
1.1.3.1 Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire	2
1.1.3.2 Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes.....	3
1.1.3.3 Interférence avec la réplication et la transcription de l'ADN	4
1.1.3.4 Inhibition du métabolisme de l'acide folique.....	4
1.1.4 La résistance aux antibiotiques.....	6
1.1.4.1 Modification ou mutation de la cible	6
1.1.4.2 Réduction de la perméabilité membranaire.....	7
1.1.4.3 Efflux.....	9
1.1.4.4 Inactivation enzymatique	11
1.1.5 Attentes et solutions à la résistance aux antibiotiques.....	12
1.1.6 Développement de nouveaux antibiotiques	13

1.1.7 Thérapie combinée	13
1.1.8 Nanomatériaux comme systèmes d'administration de médicaments.....	14
1.1.9 Structure des dendrimères	15
1.1.10 Synthèse des dendrimères.....	17
1.1.10.1 Stratégie de synthèse divergente	17
1.1.10.2 Stratégie de synthèse convergente	18
1.1.11 La chimie click	19
1.1.12 Application des dendrimères	20
1.1.13 Les dendrimères et chimie des carbohydrates	21
1.1.13.1 Concept de multivalence	21
1.1.13.2 Les glycoconjugués.....	23
1.1.13.3 Les glycoconjugués.....	24
1.1.14 Dendrimères et métaux.....	24
1.1.14.1 Nanoparticules métalliques	24
1.1.14.2 Les métallo-dendrimères.....	25
1.1.15 Les dendrimères amphiphiles	25
 CHAPITRE 2 PROJET DE THÈSE	 27
2.1 Schéma du projet de thèse	27
2.2 Contexte général	28
2.3 Problématique.....	30
2.4 Approche	30
2.5 Objectifs de la recherche	31
2.6 Hypothèse	32
2.7 Réalisations.....	33
 CHAPITRE 3 METALLO-GLYCODENDRIMERIC MATERIALS AGAINST ENTEROTOXIGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i>	 34
3.1 Résumé	35
3.2 Abstract.....	36
3.3 Introduction	37
3.4 Materials and Methods	40
3.4.1 Materials	40
3.4.2 Methods.....	40
3.5 Results and Discussion	48
3.5.1 Synthesis of the Core structure.....	48

3.5.2 Synthesis of the Carbohydrate for Core Branching.....	50
3.5.3 Synthesis of Mannosylated Glycodendrimer.....	51
3.5.4 Characterization of Nanoparticles of Cu- and Ag-Loaded Glycodendrimers	
52	
3.5.5 Bactericidal Activity of Metal-Glycodendrimers	53
3.6 Conclusions	60
3.7 Acknowledgments	60
3.8 Supplementary data	61
 CHAPITRE 4 AMPHIPHILIC METALLO-DENDRIMERIC MATERIALS WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY	 69
4.1 Résumé	70
4.2 Abstract.....	71
4.3 Introduction	71
4.4 Materials and Methods	73
4.4.1 Materials	73
4.4.2 Methods	74
4.5 Results and discussion.....	81
4.5.1 Synthesis of the lipid-based structures	81
4.5.2 Synthesis of the hydrophilic moiety	82
4.5.3 Synthesis of the amphiphilic dendrimer	82
4.5.4 Bactericidal Activity of metal loaded amphiphilic-dendrimers.....	84
4.6 Conclusions	88
4.7 Supplementary data	89
 CHAPITRE 5 DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	 94
5.1 DISCUSSIONS	94
5.2 CONCLUSIONS	101
 BIBLIOGRAPHIE	 103

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Présentation schématique de mécanisme de résistance des bactéries aux antibiotiques par modification ou mutation de la cible	7
Figure 1.2 Présentation schématique du Mécanisme de résistance aux antibiotiques associé à la modification OMPs.....	8
Figure 1.3 Présentation schématique des principales familles de pompes à efflux.. ..	10
Figure 1.4 Représentation schématique des mécanismes de résistance aux antibiotiques par les enzymes de résistance bactérienne..	12
Figure 1.5 Composition structurelle d'un dendrimère [tiré et réadapté (Singh, J. <i>et al.</i> , 2016)]. G0 (génération 0 ou cœur), G1 (génération 1), G2 (génération 2), G3 (génération 3).	16
Figure 1.6 Stratégie de synthèse des dendrimères selon la méthode divergente	18
Figure 1.7 Stratégie de synthèse des dendrimères selon la méthode convergente	19
Figure 1.8 Classification des dendrimères.	21
Figure 1.9 Exemple d'interactions récepteur-ligand monovalentes.....	22
Figure 1.10 Exemple d'interactions récepteur-ligand multivalentes.	22

Figure 2.1 Présentation graphique du projet de thèse.	27
Figure 3.1 Synthesis of the key dendritic pentaerythritol scaffold harboring four gallic acid residues covered with 12 propargyl functions used for the preparation of multivalent mannosylated dendrimer by a copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC).	49
Figure 3.2 Synthesis of the peracetylated mannosylated azide precursor 9	50
Figure 3.3 Synthesis of mannosylated glycodendrimer 11 which is endowed with 12 α -D-mannopyranoside residues at the periphery. The synthesis was accomplished according to the well-established “click chemistry” (CuAAC) between the propargylated core 5 and the mannosylated sugar azide 9 , followed by a selective Zemplén reaction.	52
Figure 3.4 Effect of metal-glycodendrimers on ETEC:F4 bacteria..	54
Figure 3.5 Diffusimetric profile of the Anti-ETEC:F4 materials.	55
Figure 3.6 Quantification of released bioactive ETEC:F4 contents..	57
Figure 3.7 Metal-glycodendrimers inhibit the formation of biofilm by enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> fimbriae 4 (ETEC:F4) was treated with 0.005 mg/mL of glycodendrimer (D), glycodendrimer loaded with copper (D:Cu) and glycodendrimer loaded with silver (D:Ag)..	59
Figure 3.8 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 5	61
Figure 3.9 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 5	62

Figure 3.10 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 10	63
Figure 3.11 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 10	64
Figure 3.12 ^1H NMR (300 MHz, D_2O) of compound 11	65
Figure 3.13 ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) of compound 11	66
Figure 3.14 Biofilm production capabilities of <i>E. coli</i> enterotoxigenic fimbriae 4 (ETEC:F4) in the absence or presence of bactericidal agents by crystal violet Assay.	67
Figure 4.1 Synthesis of the lipid-based structures using the gallic acid	82
Figure 4.2 Synthesis of the hydrophilic part using 3-amino-1-propanol.....	82
Figure 4.3 Synthesis of the terminal ester amphiphilic dendrimer via a one-pot modified Staudinger reaction between the azide on the hydrophilic compound 10 and the acids on the lipid compounds 5-6 (i) Bu3P, DCM, HOBT, DIC, 24 h; (ii) EtOH, KOH, 4 h.....	83
Figure 4.4 Effect of metal loaded on D14 amphiphilic-dendrimers on ETEC:F4 bacteria.	85
Figure 4.5 Diffusimetric profile of the Anti-ETEC:F4 materials	86
Figure 4.6 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 8.....	89
Figure 4.7 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 8.....	89

Figure 4.8 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 9	90
Figure 4.9 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 9	90
Figure 4.10 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 10	91
Figure 4.11 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 10	91
Figure 4.12 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 11	92
Figure 4.13 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 11	92
Figure 4.14 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 12	93
Figure 4.15 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 12	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1 Mode d'action de différentes classes d'antibiotiques	5
Tableau 3.1 Antibiotics effect on ETEC:F4.....	68
Tableau 4.1 Average diffusion diameters as growth inhibition of bacteria	87

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ABC	Transporteurs à cassette de liaison liant l'ATP
Ac ₂ O	Anhydride acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
Bu ₃ P	Tributylphosphine
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
COSY	Correlated Spectroscopy
CRh6G	Calcozine Red 6G
CuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée par le cuivre
CuSO ₄	Copper sulfate
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sulfate de cuivre (II) pentahydraté
DCC	N, N-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
δ	Déplacement chimique
D12	Dendrimère (chaîne à 12 carbones)

D14	Dendrimère (chaîne à 14 carbones)
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
D ₂ O	Oxyde de deutérium
DMAP	(Diméthylamino)pyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HSQC	Spectroscopie de cohérence hétéronucléaire Single-Quantum
Hz	Hertz
HOBt	Hydroxybenzotriazole
K ₂ CO ₃	Carbonate de potassium
MATE	Protéine d'extrusion de composés toxiques et de médicaments
MDP	Muramyl dipeptide
MeOH	Méthanol
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NaN ₃	Azoture de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaOMe	Méthanolate de sodium
PAMAM	Poly(amidoamine)
OMP	Protéines de la membrane externe

RMN ^1H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ^{13}C	Résonance magnétique nucléaire du carbone

RÉSUMÉ

Les infections bactériennes représentent un fléau pour la santé publique mondiale au niveau humain et animal. Depuis le siècle précédent, les antibiotiques ont été utilisés comme traitement de cette maladie. Les traitements antibiotiques se sont avérés efficaces hormis certains effets secondaires indésirables associés à leur utilisation. Cependant au fil du temps, l'utilisation excessive des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a conduit au développement d'une résistance bactérienne qui a abouti à l'échec du traitement. De plus, cette résistance aux antibiotiques est une source de mortalité élevée chez les êtres humains et les animaux. La résistance aux antibiotiques est alarmante et préoccupante; par conséquent, des approches thérapeutiques alternatives sont primordiales pour traiter de manière efficaces les infections et pour remédier à la résistance aux antibiotiques. Les métallodendrimères apparaissent comme une nouvelle classe d'agents thérapeutiques efficaces et qui n'induisent pas une résistance antibactérienne. Dans la première partie cette étude, des métallo-glycodendrimères ont été développés avec succès. Les glucides sont particulièrement intéressants en tant que ligands, car ils permettent la synthèse de glycomimétiques bien définis pour l'étude des interactions glucide-protéines. Les glycodendrimères greffés avec des nanoparticules d'argent et de cuivre ont montré une activité antimicrobienne significative contre les bactéries *Escherichia coli*. La seconde partie de cette thèse porte sur la synthèse de dendrimères amphiphiles innovants, intégrant une partie lipidique hydrophobe et une partie hydrophile et greffés avec des métaux de cuivre et d'argent.

Mots-clés : Dendrimères ; glycodendrimères ; dendrimères amphiphiles ; métallo-dendrimères ; chimie click

ABSTRACT

Bacterial infections are a global public health scourge at the human and animal levels. Since the previous century, antibiotics have been used as a treatment for these diseases. Antibiotic treatments have been effective, except for some adverse side effects associated with their use. However, over time, the excessive use of antibiotics in human and veterinary medicine led to the development of bacterial resistance which resulted in treatment failure. In addition, antibiotic resistance is a source of high mortality among humans and animals. Antibiotic resistance is alarming and of concern, so alternative therapeutic approaches are essential to effectively treat infections and prevent antibiotic resistance. Metallodendrimers appear as a new class of effective therapeutic agents that do not induce antibacterial resistance. In the first part of this study, metallo-glycodendrimers were successfully developed. Carbohydrates are particularly interesting as ligands, because they allow the synthesis of well-defined glycomimetics for the study of carbohydrate-protein interactions. Glycodendrimers grafted with silver and copper nanoparticles showed significant antimicrobial activity against *Escherichia coli* bacteria. The second part of this thesis deals with the synthesis of innovative amphiphilic dendrimers, integrating a hydrophobic lipid and hydrophilic part and grafted with copper metals and silver.

Keywords: dendrimers, glycodendrimers, metallodendrimers, amphiphilic dendrimers
click chemistry

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Infections bactériennes et traitements antibiotiques

1.1.1 Infections bactériennes

Les infections bactériennes représentent un fléau à l'échelle de la santé publique mondiale dont les répercussions affectent les êtres humains mais aussi les animaux. En 2019 le nombre de décès liés aux infections bactériennes était estimé à 13,7 millions de personnes (Ikuta *et al.*, 2022). L'impact économique lié aux couts des soins de santé est également élevé. Les infections bactériennes affectent également les animaux.

1.1.2 Les antibiotiques

Les antibiotiques sont apparus dès la première partie du 20^{-ème} siècle comme la classe médicamenteuse de choix dans la lutte antibactérienne. Ces molécules permettent de bloquer la croissance des bactéries ou de les détruire. Les antibiotiques sont décrits comme bactéricides si elles sont capables de tuer les bactéries et bactériostatiques lorsqu'elles se limitent à empêcher leur prolifération (Ishak *et al.*, 2024). Le terme antibiotique est dérivé du grec (*anti* : contre et *biôtikos* : qui concerne la vie). Les antibiotiques sont des molécules d'origine naturelle, semi-synthétiques et synthétique (Leisner, 2020). Les antibiotiques d'origine naturelle sont produits par des micro-organismes, le plus souvent des champignons ou encore des bactéries. La pénicilline découverte en 1929 par Alexander Fleming et qui est produite naturellement

par le champignon *Penicillium* est considérée comme le premier antibiotique d'origine naturelle ayant été commercialisé. Les antibiotiques semi-synthétiques résultent de la modification en partie d'une molécule naturelle par semi-synthèse et les antibiotiques synthétiques sont obtenus par la synthèse chimique. Les antibiotiques synthétiques ont suscité l'intérêt en recherche pharmaceutique du fait qu'elles présentent un effet biocide contre les bactéries pathogènes et la production des antibiotiques a permis le traitement d'un nombre élevé d'infections. Ces molécules thérapeutiques ont ainsi permis d'induire des améliorations notables pour les êtres humains et les animaux.

1.1.3 Mécanismes de l'activité antibactérienne des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances médicamenteuses ayant la capacité d'anéantir les bactéries ou d'inhiber leur croissance. Le mécanisme d'action des bactéries repose sur l'attaque de structures ou de fonctions essentielles pour la survie bactérienne. Chaque classe d'antibiotiques cible un aspect spécifique du métabolisme ou de l'organisation cellulaire des bactéries, ce qui leur confère leur efficacité. L'action des antibiotiques s'effectue par le ciblage des mécanismes essentiels au fonctionnement et à la survie des bactéries et ces mécanismes d'action diffèrent selon la classe d'antibiotiques utilisée.

1.1.3.1 Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire

Les bactéries sont dotées d'une paroi cellulaire laquelle est constituée majoritairement de peptidoglycanes ayant une structure rigide constituée de chaînes de glycane réticulées par de courtes chaînes peptidiques et qui assurent la résistance mécanique de la paroi cellulaire (Loskill *et al.*, 2014). La paroi cellulaire joue un rôle de protection de l'intégrité de la cellule. Les antibiotiques tels que les β -lactamines (Klein, 2018) et les glycopeptides (Donadio et Sosio, 2009) vont inhiber la synthèse de la paroi cellulaire. Ces classes d'antibiotiques vont ainsi perturber la formation de peptidoglycane et empêcher les bactéries de préserver l'intégrité cellulaire au moment de la division. A titre d'exemple, la vancomycine inhibe la synthèse de la paroi

cellulaire en se liant aux précurseurs du dipeptide D-alanyl D-alanine, un composant du peptidoglycane bactérien (Ong et Nicolau, 2004).

1.1.3.2 Inhibition de la synthèse des protéines bactériennes

Au cours du processus de traduction, les ribosomes 70S permettent la synthèse de protéines d'ARNm. Les sous-unités 30S et 50S de la protéine ribonucléique sont les constructeurs du ribosome bactérien 70S et ils sont également la cible d'antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines en se liant à différents sites des ribosomes bactériens selon des mécanismes spécifiques dépendamment de la classe de l'antibiotique. Les antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines ciblent les ribosomes bactériens, soit les sous-unités 30S ou 50S, par une perturbation de la production de protéines et par un arrêt de la croissance bactérienne ou en tuant les cellules. Certaines classes d'antibiotiques inhibent la sous-unité 30S et d'autres la sous-unité 50S. Les aminoglycosides tels que la gentamicine agissent de manière dépendante de la concentration et se lient de manière irréversible à la sous-unité ribosomique 30S en interférant avec la synthèse des protéines par une lecture erronée de l'ARNm et une terminaison du code génétique, ce qui conduit à l'obtention de protéines incorrectes qui perturbent les fonctions des cellules bactériennes (Makii *et al.*, 2022). Les tétracyclines telles que la doxycycline inhibent de manière spécifique la sous-unité ribosomique 30S, ce qui empêchant la liaison de l'aminoacyl-ARNt au site accepteur du complexe ARNm-ribosome (Shutter et Akhondi, 2019). Les macrolides telles que l'érythromycine se lient à la sous-unité 50S en interférant avec la synthèse des protéines (Dinos, 2017). Les lincosamides tels que clindamycine se lie à la sous-unité 50S sur un site analogue aux macrolides, et bloquent l'élongation par interférence avec la formation de liaisons peptidiques. Le chloramphénicol se lie à la sous-unité 50S et inhibe de manière directe la peptidyl transférase, une enzyme responsable de la formation de liaisons peptidiques entre les acides aminés.

1.1.3.3 Interférence avec la réplication et la transcription de l'ADN

Les familles d'antibiotiques qui agissent en interférant avec la réplication et la transcription de l'ADN bactérien ciblent des enzymes et des processus cruciaux pour la synthèse des acides nucléiques. En perturbant la réplication ou la transcription de l'ADN, certaines classes d'antibiotiques empêchent la reproduction des bactéries et l'expression des gènes essentiels, ce qui induit à la mort des cellules bactériennes ou à une inhibition de leur croissance. Par exemple, les quinolones inhibent la réplication de l'ADN, tandis que les rifamycines bloquent la transcription. Les quinolones interagissent avec deux cibles bactériennes, les enzymes apparentées ADN gyrase et topoisomérase IV, qui sont impliquées dans la réplication de l'ADN. Les quinolones vont permettre la formation de complexes entre ces enzymes et l'ADN, ce qui va provoquer une inhibition de la réplication de l'ADN (Hooper, 2000). L'activité antibactérienne de la rifamycine dépend de son affinité pour l'ARN-polymérase et à la formation d'un complexe stable formé entre l'antibiotique et l'enzyme au niveau de l'ARN-polymérase ADN-dépendante ce qui induit l'inhibition de la croissance des bactéries (Floss et Yu, 2005; van Bambeke *et al.*, 2017).

1.1.3.4 Inhibition du métabolisme de l'acide folique

Les sulfamides sont une classe d'antibiotiques qui sont des antagonistes compétitifs et des analogues structuraux de l'acide *p*-aminobenzoïque (pABA) dans la synthèse de l'acide folique qui est à un rôle crucial dans la synthèse ultérieure de l'ADN dans les bactéries (Zessel *et al.*, 2014). En raison de leur similarité structurale avec le pABA, les sulfamides peuvent se lier à l'enzyme dihydroptéroate synthétase, remplaçant ainsi le pABA dans ce processus. empêche la formation de dihydrofolate et de tétrahydrofolate, ce qui perturbe la synthèse de l'ADN, la croissance cellulaire et la division des bactéries. En inhibant la synthèse du tétrahydrofolate, les sulfamides entraînent un arrêt de la réplication de l'ADN (Ovung et Bhattacharyya, 2021).

Tableau 1.1 Mode d'action de différentes classes d'antibiotiques

Classe	Exemple	Cibles	Mode d'action	Référence	
Aminoglycosides	Streptomycine	Sous-unité ribosomique 30S	Inhibe la synthèse des protéines bactériennes	(Bush et Bradford, 2016)	
Ansamycine	Rifamycine	ARN	Inhibe la transcription-ADN en ARN	(Calvori <i>et al.</i> , 1965)	
β-lactamines	Amoxicilline	Protéines liant la pénicilline	Inhibe la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne	(Klein, 2018)	
Glycopeptides	Vancomycine	Sous-unité ribosomique 30S	Inhibe la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne	(Donadio et Sosio, 2009)	
Lipopeptides	Daptomicine	Membrane Cytoplasmique	Perturbe le fonctionnement de la membrane cellulaire	(Heidary <i>et al.</i> , 2018)	
Macrolides	Erythromycine	Sous-unité ribosomique 50S	Inhibe la synthèse des protéines bactériennes	(Patel et Hashmi, 2023)	
Oxazolidinones	Cycloserine	Sous-unité ribosomique 50S	Inhibe la synthèse des protéines bactériennes	(Wills, 1985)	
Quinolones	Ciprofloxacine	ADN Gyrase	Interfère avec la réplication et la transcription de l'ADN des bactéries	(Fàbrega <i>et al.</i> , 2009)	
Streptogramines	Pristinamycine	Sous-unité ribosomique 50S	Inhibe la synthèse des protéines bactériennes	(Cocito <i>et al.</i> , 1997)	
Sulfamides	Prontosil	Métabolisme de l'acide folique	Folic Acid metabolism Inhibition	(Ovung et Bhattacharyya, 2021)	
Tetracyclines	Doxycycline	Sous-unité ribosomique 30S	Inhibe la synthèse des protéines bactériennes	(Chopra et Roberts, 2001)	

1.1.4 La résistance aux antibiotiques

Le succès des antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses a engendré leur utilisation abusive chez l'homme et l'animal. A titre d'exemple, en médecine humaine, l'utilisation des antibiotiques a connu une augmentation de 36% entre 2000 et 2010 dans le monde (Van Boeckel *et al.*, 2014). La libération des antibiotiques dans la nature est une source de pollution dont les répercussions négatives se sont reflétées sur la biodiversité et la santé humaine. De plus, l'utilisation abusive d'antibiotiques chez l'humain et l'animal a provoqué la résistance des bactéries pathogènes (Knapp *et al.*, 2010). On parle de résistance aux antibiotiques lorsqu'il n'y a plus une réponse de dose à effets à l'administration d'un antibiotique à la dose à laquelle la bactérie devrait être sensible (Courvalin, 2008). La capacité des bactéries à résister aux antibiotiques s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes :

1.1.4.1 Modification ou mutation de la cible

Le mécanisme de modification ou mutation de la cible permet la survie des bactéries en présence d'antibiotiques. Ce mécanisme s'appuie sur la modification de la structure de la cible moléculaire de l'antibiotique, ce qui réduit ou empêche une liaison efficace de l'antibiotique à sa cible et qui prive les antibiotiques de leur pouvoir d'inhibition la croissance bactérienne. La fixation de l'antibiotique avec la cible est primordiale pour que les antibiotiques puissent exercer un effet antibactérien. Toute mutation ou la modification de la cible va affecter l'effet de l'antibiotique (Figure 1.1) (Zhang, F. et Cheng, 2022). Lors du processus de modification, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, deux enzymes cibles des fluoroquinolones vont subir des mutations ce qui va entraîner la réduction de l'efficacité de la liaison des antibiotiques, et engendrer la résistance des bactéries. Lors du processus de mutation, les antibiotiques tels que les tétracyclines ciblent les ribosomes pour inhiber la synthèse protéique. Les bactéries peuvent ainsi par mutation, modifier la structure de leurs ribosomes.

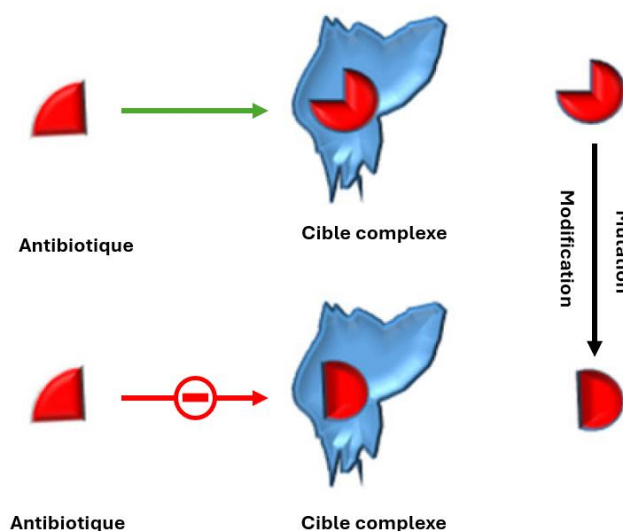


Figure 1.1 Présentation schématique de mécanisme de résistance des bactéries aux antibiotiques par modification ou mutation de la cible [tiré et réadapté (Zhang et Cheng, 2022)]

1.1.4.2 Réduction de la perméabilité membranaire

Afin de réduire la pénétration des antibiotiques, les bactéries effectuent une modification de la perméabilité de leur paroi. La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est dotée d'une membrane externe qui limite l'accès au périplasme en agit comme une barrière empêchant la diffusion des substances étrangères telles que antibiotiques vers l'intérieur de la cellule. La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est principalement constituée de protéines et de lipopolysaccharides, dans lesquels les composés hydrophiles ont du mal à traverser la bicouche lipidique et doivent être facilités par les canaux porines ou les protéines de la membrane externe OMPs. L'adaptation bactérienne pour réduire l'efflux via ces OMPs contribue à la résistance aux antibiotiques. Les antibiotiques polaires y compris les antibiotiques β -lactamines et les fluoroquinolones utilisent les OMPs pour pénétrer souvent dans les

bactéries à Gram négatif. Toute modification des OMPs peut affecter la prise de l'antibiotique et réduire l'efficacité. Les bactéries Gram-négatives, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, ont la capacité de réduire la production de leurs porines ou de modifier leur structure ce qui empêche l'entrée des antibiotiques dans la cellule.

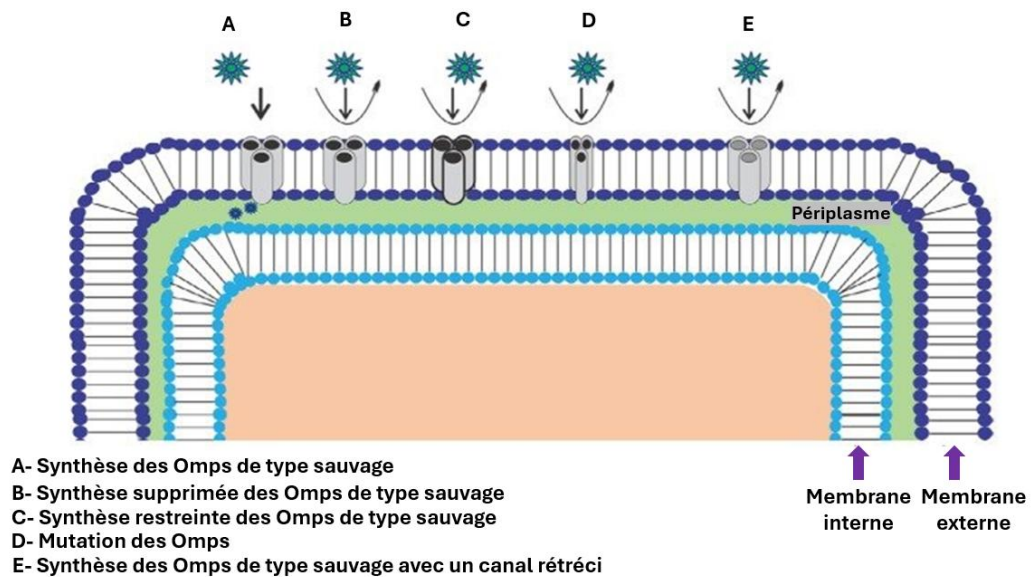


Figure 1.2 Présentation schématique du Mécanisme de résistance aux antibiotiques associé à la modification OMPs. Les molécules antibiotiques β -lactamines sont représentées par des étoiles vertes et les OMPs par des trimères des cylindres gris. La largeur des flèches droites représente le niveau de pénétration des β -lactamines via OMPs. Les flèches courbes illustrent l'échec/la réduction de l'absorption se produisant avec les éléments suivants : B : diminution du niveau d'expression des OMPs de type sauvage ; C : expression des OMPs à canal restreint ; D : mutation ou modification des

propriétés fonctionnelles d'un canal porine ; et E : synthèse d'OMPs modifiés avec une constriction significative. [tiré et réadapté (Ghai et Ghai, 2017)].

1.1.4.3 Efflux

Les pompes à efflux sont des protéines membranaires que l'on trouve dans la majorité des organismes procaryotes et eucaryotes. Les pompes à efflux transportent diverses substances à travers la membrane cellulaire et ils sont impliqués dans divers processus dont la virulence microbienne. L'activité des pompes à efflux représente une des causes de la résistance bactérienne à certains antibiotiques. Les pompes à efflux favorisent la résistance aux antibiotiques par trois principaux mécanismes à savoir : mécanisme naturel, acquis et phénotypique. Les pompe à efflux exportent de manière active certains agents antibactériens de la cellule en les pompant de manière agressive. Les bactéries peuvent ainsi par l'interim de leurs pompes à efflux expulser de manière active certains antibiotiques hors de la cellule avant qu'il n'atteigne sa cible. Les transporteurs d'extrusion de composés toxiques et de médicaments multiples (MATE) soutiennent la résistance aux médicaments multiples en utilisant le gradient électrochimique H^+ ou Na^+ pour extruder différents médicaments à travers les membranes cellulaires (Radchenko *et al.*, 2015). Les transporteurs ABC (Transporteurs à Cassette de Liaison de l'ATP) sont des protéines transmembranaires qui assurent le transport actif unidirectionnel de diverses substances à travers la membrane cellulaire, grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Ces substances peuvent inclure des ions, des stérols, des macromolécules et d'autres composés. Leur rôle principal est d'expulser ces molécules de la cellule, un mécanisme connu sous le nom de transport d'efflux. Les transporteurs ABC sont donc essentiels pour réguler la concentration de différentes molécules à l'intérieur de la cellule et protéger celle-ci contre des substances potentiellement nuisibles, comme certains médicaments. Ces protéines sont responsables du pompage des métabolites xénobiotiques et endogènes à travers les membranes intracellulaires et extracellulaires et, réduisent ainsi les

concentrations cellulaires de composés toxiques. Les transporteurs ABC ont été associés à la résistance aux médicaments chez plusieurs nématodes et arthropodes parasites (Pohl *et al.*, 2011). Les transporteurs de la famille RND (Résistance-Nodulation-Division) sont largement présents, notamment chez les bactéries Gram-négatives, et assurent l'efflux actif de nombreux antibiotiques et agents chimiothérapeutiques (Nikaido et Takatsuka, 2009). Les pompes à efflux multidrogues, qui appartiennent à la superfamille des facilitateurs majeurs (MFS), sont largement répandues dans les génomes microbiens et présentent une large diversité de spécificités de substrats. Ces pompes peuvent se présenter soit sous forme de transporteurs mono-composants, soit sous forme de complexes tripartites (Pasqua *et al.*, 2019).

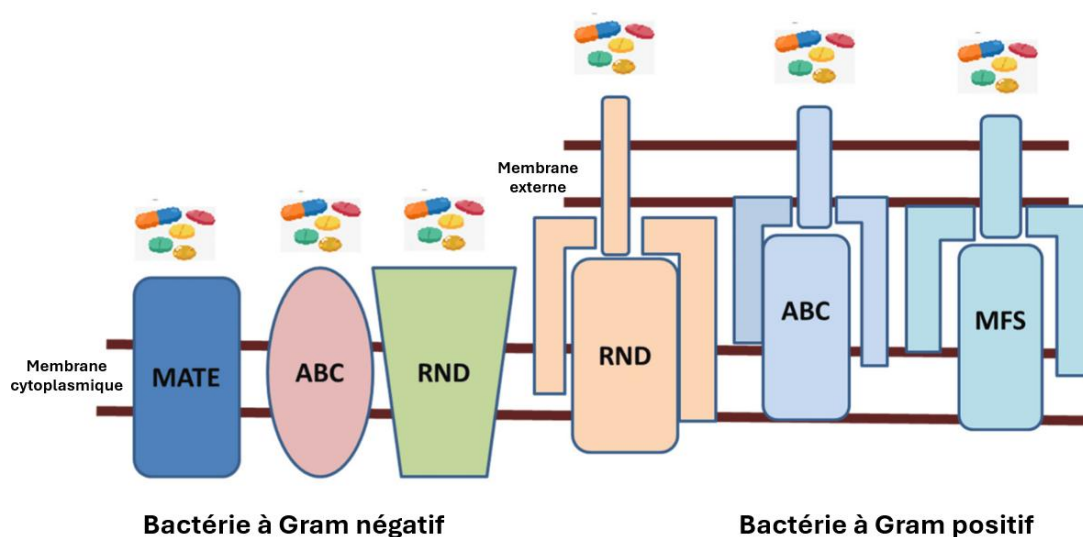


Figure 1.3 Présentation schématique des principales familles de pompes à efflux. ABC et RND (présentes dans les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram

positif), MATE (uniquement dans les bactéries à Gram négatif) et MFS (uniquement dans les bactéries à Gram positif) (tiré et réadapté) (Nguyen *et al.*, 2023).

1.1.4.4 Inactivation enzymatique

L'inactivation enzymatique est l'un des mécanismes de résistance aux antibiotiques les plus courants. Ce mécanisme permet aux bactéries la neutralisation directe des antibiotiques avant l'atteinte de leurs cibles. Ce mécanisme s'appuie sur la production d'enzymes pouvant induire la dégradation ou la modification chimique des antibiotiques qui perdent ainsi leur efficacité. L'inactivation enzymatique s'effectue principalement par hydrolyse ou par modification chimique. Au cours du premier processus, les enzymes hydrolysent l'antibiotique en rompant les liaisons chimiques nécessaires pour l'action de l'antibiotique. Les enzymes β -lactamases sont des enzymes qui hydrolysent l'anneau bêta-lactame, un cycle à quatre atomes communs aux antibiotiques β -lactamines telles que la pénicilline, les céphalosporines, et les carbapénèmes. En rompant cet anneau par la réaction d'hydrolyse, les enzymes β -lactamases désactivent les propriétés antibiotiques des β -lactamines. Dans ce mécanisme, les bactéries produisent aussi des enzymes qui vont modifier l'antibiotique par rajout de groupement chimique tels que les des groupements acétyle, phosphate ou adényle sur les sites vulnérables de la molécule antibiotique altérant ainsi sa conformation. Cela va empêcher l'antibiotique de se lier correctement à sa protéine cible et neutraliser ainsi son effet. Les aminoglycosides tels que gentamicine et la tobramycine sont des antibiotiques qui ciblent les ribosomes bactériens pour inhiber la synthèse des protéines. Les enzymes telles que les acétyltransférases et les phosphotransférases produites par certaines bactéries induisent la modification de ces antibiotiques qui n'arrivent plus à se fixer de manière efficace aux ribosomes. Les acétyltransférases rajoutent par une réaction d'acétylation un groupe acétyle à la molécule d'aminoglycoside, induisant une modification de sa structure et un blocage de sa liaison aux ribosomes. Les phosphotransférases rajoutent par une réaction de

phosphorylation un groupe phosphate, empêchant son interaction avec la cible bactérienne.

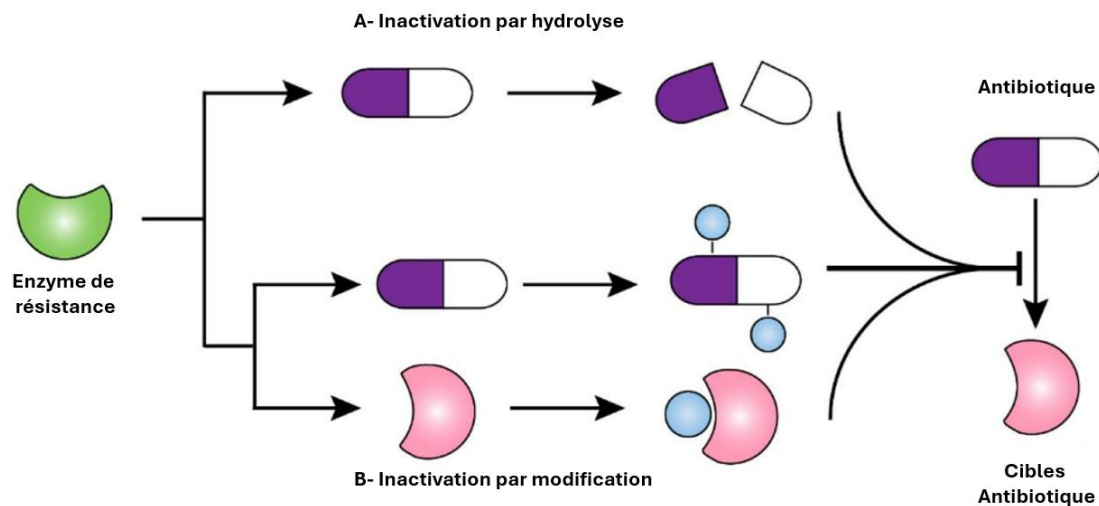


Figure 1.4 Représentation schématique des mécanismes de résistance aux antibiotiques par les enzymes de résistance bactérienne. (A) Les enzymes de résistance vont inactiver les antibiotiques par hydrolyse ce qui induit la résistance. (B) Les enzymes de résistance modifient la structure des antibiotiques, en empêchant leur liaison à leurs cibles ce qui induit la résistance (Liu, Y. *et al.*, 2018).

1.1.5 Attentes et solutions à la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques engendre des effets néfastes tant au niveau de la santé publique, avec une augmentation des décès, qu'au niveau économique, avec une hausse des coûts des soins (Friedman *et al.*, 2016). A titre d'exemple, en 2019, environ 1200 000 personnes sont décédées dans le monde à la suite d'une résistance bactérienne aux antibiotiques (Salam *et al.*, 2023). Au regard du coût en vies humaines et animales mais également au coût matériel qu'elle engendre, la résistance bactérienne est devenue un enjeu majeur pour la santé publique mondiale (Salam *et al.*, 2023). Afin de contrer

la résistance aux antibiotiques, plusieurs approches préventives ont été préconisées. Parmi ces approches dites de prévention, diverses mesures ont été suggérées allant de l'augmentation de l'hygiène à une prescription plus rigoureuse des antibiotiques. Bien que ces méthodes préventives puissent donner des résultats, cependant elles ne peuvent à elles seules atteindre l'objectif d'éradication de la résistance bactérienne. Plusieurs approches curatives ont été proposées afin de mettre résistance aux antibiotiques.

1.1.6 Développement de nouveaux antibiotiques

Le concept de développement de nouveaux composés antibiotiques est un outil important. Cependant, pour empêcher la propagation de la résistance aux antibiotiques, il faudrait créer de nouveaux antibiotiques avec de nouveaux modes d'action. Cela implique de trouver de nouvelles molécules antibactériennes, ce qui représente un investissement élevé en matière de recherche et développement et cela nécessite de années pour la mise en marché des médicaments. De ce fait les compagnies pharmaceutiques sont très réticentes pour une financement précoce de recherche et développement sur les nouvelles classes d'antibiotiques, car le retour sur investissement le plus souvent faible, voire nul ou négatif (Miethke *et al.*, 2021).

1.1.7 Thérapie combinée

La thérapie combinée est une méthode qui permet le traitement des infections bactériennes par l'utilisation de deux ou plusieurs antibiotiques dont les modes d'action sont différents. En s'attaquant aux bactéries de plusieurs façons, il est possible d'obtenir une activité antibiotique élevée du fait de l'effet de synergie, une prévention de l'émergence de résistances, une amélioration de la pénétration des agents antibactériens dans les cellules et les tissus, une inhibition de la production de toxines. La thérapie combinée élargit ainsi le spectre antibactérien, peut rendre le traitement plus efficace et peut ralentir le développement de résistance. Cependant cette méthode est limitée du fait qu'elle comporte des inconvénients élevés tels qu'une hypersensibilité et/ou des

effets secondaires indésirables pouvant être modérés ou graves. (Boyd et Nailor, 2011; Mouton, 1999; Singh, S. K. *et al.*, 2020).

1.1.8 Nanomatériaux comme systèmes d'administration de médicaments

Ces dernières décennies, les nanotechnologies ont connu des progrès énormes et sont devenues un outil attrayant et prometteur dans l'industrie pharmaceutique. Dans un contexte où la résistance aux antibiotiques représente une réelle menace pour la santé humaine et animale, l'utilisation des nanotechnologies apparaît comme une stratégie prometteuse. Les principaux systèmes à cet égard comprennent les nanoparticules métalliques, les nanoparticules polymères et les nanoparticules lipidiques.

Les dendrimères représentent une catégorie nouvelle et spécifique de polymères à l'échelle du nanomètre et qui sont tridimensionnelles, arborescentes et se rapprochant vers la monodispersité ce qui permet un contrôle précis de leurs propriétés (Abbasi *et al.*, 2014). De plus, les dendrimères bénéficient d'une structure hautement définie et régulière, ce qui les différencie des polymères linéaires, ces derniers étant dotés de chaînes pouvant s'étendre de manière désordonnée. L'étymologie du terme dendrimère est issue d'une combinaison de deux mots grecs, « dendron » qui signifie arbre ou branches et « meros » qui signifie partie. Ces macromolécules hautement ramifiées et symétriques sont dotées d'une structure tridimensionnelle distincte qui leur confère des propriétés physico-chimiques exceptionnelles. Avant l'émergence des dendrimères, les scientifiques ont exploré diverses architectures de polymères ramifiés. La recherche sur les polymères branchés a débuté à partir de 1940 avec des travaux sur les polymères hyperbranchés et les polymères étoilés. En 1941, le chimiste américain Flory a effectué une polymérisation hyperbranchée et tridimensionnelle obtenue sans réaction parasite pendant l'arborescence. du fait de leur synthèse en l'absence de réaction parasites durant le processus d'arborescence (Flory, 1941, 1942). Quatre décennies plus tard, une avancée majeure a eu lieu. En effet, le concept de synthèse de polymères ramifiés et arborescents va apparaître et en 1978, le chimiste allemand Fritz Vögtle

synthétisa des molécules polyamines appelées molécules en cascade (Buhleier *et al.*, 1978). Cette avancée majeure est suivie par le dépôt d'un brevet sur la synthèse de polymères dotés en périphérie d'acides aminés de lysine en 1981 par le chimiste R. G. Denkewalter (Gorzkiwicz *et al.*, 2020). Le couronnement de toutes ces recherches a eu lieu en 1985 avec la synthèse des premiers dendrimères par professeur Donald Tomalia et son équipe (Tomalia *et al.*, 1985). La même année soit en 1985 le professeur Newkome (Newkome *et al.*, 1985) a également synthétisé des dendrimères qu'il a dénommé arborols. En 1990, les travaux du Professeur Frechet (Hawker et Frechet, 1990) ont permis d'améliorer la flexibilité de la synthèse des dendrimères ce qui a permis la synthèse de molécules plus complexes avec un contrôle encore plus précis sur la taille et la fonctionnalité.

1.1.9 Structure des dendrimères

Les dendrimères sont constitués de manière structurale d'un noyau central, des couches internes appelées générations et qui sont composées d'unités répétitives attachées au noyau intérieur et des couches externes comprenant les fonctions terminales (Figure 1.5) (Singh, J. *et al.*, 2016). Le noyau central, aussi dénommé cœur, est une molécule aromatique ou aliphatique, le plus souvent de faible poids moléculaire. Le cœur est donc le point de départ de la croissance du dendrimère du fait qu'il est doté de sites réactifs qui vont permettre le rajout de branches. L'adhérence entre le cœur et les branches est possible du fait de la présence de points de divergence. Les points de divergence sont des groupements chimiques qui se retrouvent aux extrémités des branches et qui permettent l'addition répétitive d'une nouvelle séquence de branches ou le rajout de groupements terminaux. Les unités de ramification répétitives vont permettre la croissance des dendrimères en couches appelées générations qui sont déterminées par la suite de ramifications entre le cœur et la périphérie. En périphérie, les groupements fonctionnels terminaux vont influencer les propriétés physico-chimiques des dendrimères telles que la solubilité et la réactivité. Afin de mieux comprendre les caractéristiques structurales des dendrimères utilisés dans ce travail, il

est utile de présenter brièvement quelques familles représentatives ainsi que les approches synthétiques couramment employées. Il existe différentes familles de dendrimères, parmi lesquelles les plus étudiées sont les PAMAM (polyamidoamines) et les PPI (polypropylèneimines). Ces structures se distinguent par leur noyau central, leur type de liaisons internes, et leurs groupes terminaux. Les dendrimères PAMAM, par exemple, sont construits autour d'un cœur éthylènediamine, avec des couches successives d'amide et d'amines primaires en surface. Concernant leur synthèse, deux approches principales sont utilisées : la méthode divergente, qui consiste à faire croître les branches à partir du noyau central vers l'extérieur, et la méthode convergente, où l'on construit d'abord les extrémités ramifiées que l'on assemble ensuite au noyau. Chaque méthode présente des avantages et limites en termes de contrôle de structure, de pureté et d'échelle de production.

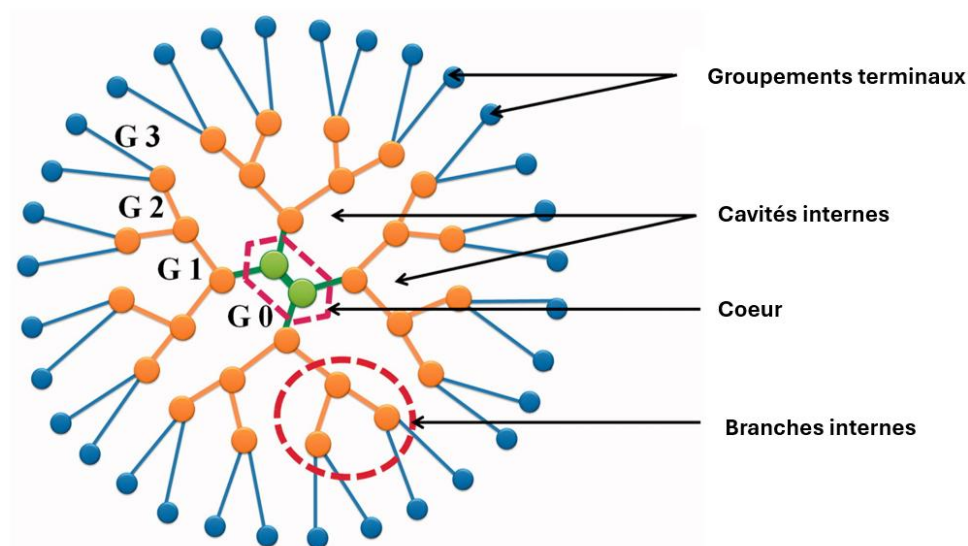


Figure 1.5 Composition structurale d'un dendrimère [tiré et réadapté (Singh, J. *et al.*, 2016)]. G0 (génération 0 ou cœur), G1 (génération 1), G2 (génération 2), G3 (génération 3).

1.1.10 Synthèse des dendrimères

La synthèse des dendrimères est un processus se déroulant en plusieurs étapes successives et qui nécessite une précision élevée. La synthèse des dendrimères s'effectue principalement par deux stratégies à savoir la stratégie divergente qui fut la première stratégie utilisée et la stratégie convergente et pourcentage non négligeable de dendrimère a été synthétisé par ces deux voies de synthèse. Chacune de ces stratégies de synthèse présente des avantages et des inconvénients, et le choix d'une des deux stratégies va dépendre des propriétés souhaitées pour le dendrimère final telles que le nombre de générations voulues et la nature des groupements terminaux. La solubilité, la miscibilité et la réactivité des dendrimères sont influencés par la nature des groupements terminaux (Latha et Selvamani, 2015).

1.1.10.1 Stratégie de synthèse divergente

Les premiers dendrimères ont été synthétisés par la méthode divergente (Newkome *et al.*, 1985) et cela a permis l'obtention des premiers dendrimères Polyamidoamine (PAMAM) (Tomalia *et al.*, 1985). La synthèse des dendrimères par la méthode divergente s'effectue à partir du noyau central auquel sont connectées de manière successive de branches ce qui conduit à l'obtention d'une nouvelle génération. Des monomères réactifs sont ajoutés au noyau pour former les premières branches. Le processus est répétitif jusqu'à l'obtention de la génération désirée. La méthode divergente comporte plusieurs avantages tels que le contrôle précis de la croissance en lors du processus itératif de rajout de branches. De plus cette méthode permet l'obtention de dendrimères avec des générations élevées et donc un nombre important de groupements fonctionnels en périphériques. Cependant cette méthode comporte certains inconvénients tels que la complexité du processus de purification du fait de l'obtention de produits secondaires qui sont des dendrimères partiellement branchés. Ces produits secondaires ont de grandes similitudes avec les dendrimères au niveau de la taille mais également des physico-chimiques (Islam *et al.*, 2005). Afin d'optimiser

la méthode divergente, deux variantes ont été développées à savoir la méthode Lego et la méthode click. L'approche Lego est une méthode flexible et efficace qui permet d'assembler des structures pour former un dendrimère unique, ce qui facilite la personnalisation de ses propriétés. La méthode Click se base sur des réactions de synthèse qui s'appuient sur la chimie click mais également sur les réactions azoture-alcyne catalysées par le cuivre (CuAAC). Les réactions click sont rapides, se produisent en conditions douces et offrent un rendement élevé et permet d'assembler des dendrimères de façon très ordonnée et précise, minimisant les sous-produits et les erreurs.

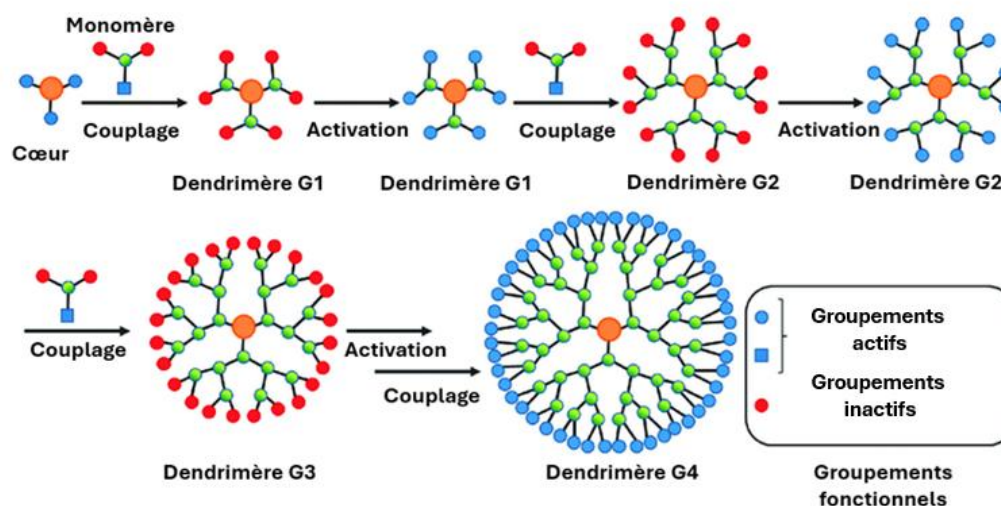


Figure 1.6 Stratégie de synthèse des dendrimères selon la méthode divergente (Sowinska et Urbanczyk-Lipkowska, 2014).

1.1.10.2 Stratégie de synthèse convergente

La présente méthode qui a été développée en 1990 par Hawker et Frechet (Hawker et Frechet, 1990) représente une méthode alternative à la méthode divergente. L'approche de synthèses par la méthode convergente permet de synthétiser les dendrons et de monter à la génération voulue en arrivant aux groupements périphériques. Une fois le

dendron final obtenu, il sera couplé au cœur du dendrimère ce qui va permettre d'obtenir le dendrimère désiré. Cependant lorsque les dendrons sont des molécules de masse moléculaire élevée, il est souvent difficile de les raccorder au cœur du fait de l'encombrement stérique.

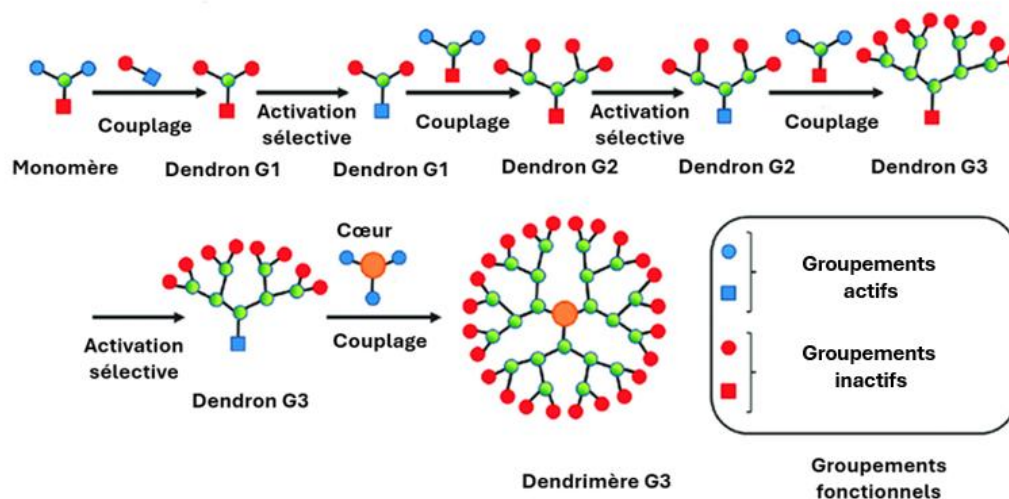


Figure 1.7 Stratégie de synthèse des dendrimères selon la méthode convergente (Sowinska et Urbanczyk-Lipkowska, 2014).

1.1.11 La chimie click

Le concept de la chimie click introduit par le professeur Sharpless et son équipe au début du 21^{ème} siècle s'est imposé dans le domaine de la chimie organique (Evans, 2007; Kolb *et al.*, 2001). La chimie click permet la synthèse de molécules complexes de manière simple, efficace et fiable. La chimie click repose sur des réactions de couplage de petites unités avec efficacité, sélectivité, régiosélectivité et à haut rendement, permettant l'assemblage de blocs moléculaires (Evans, 2007). Bien que la chimie click englobe une grande variété de réactions telles que celles de type thiol-ène, la cycloaddition azide-alcyne (CuAAC) représente l'une de ses réactions les plus emblématiques. La cycloaddition azoture-alcyne de Huisgen est une réaction de

cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne (Padwa et Pearson, 2003) ce qui aboutit à la formation d'un cycle 1,2,3-triazole. Cette réaction initiée par Rolf Huisgen (Huisgen, 1961) a été développée par le professeur Sharpless qui a introduit la version catalysée par le cuivre de cette réaction (Kolb *et al.*, 2001). Un des avantages de cette réaction est qu'elle permet l'utilisation de différents solvants ou différents systèmes de solvants. La réaction est régiosélective, se déroule dans des conditions douces et permet d'obtenir des rendements élevés.

1.1.12 Application des dendrimères

Le champ d'application des dendrimères est assez large et leurs domaines d'applications sont multiples et cela en raison leurs propriétés physico-chimiques, telles que leur polyvalence, leur capacité d'autoassemblage et leur stabilité mais également en raison de leur structure (Abbasi *et al.*, 2014; Caminade *et al.*, 2016; Klajnert et Bryszewska, 2001). Les dendrimères sont fortement utilisés dans le domaine de la catalyse par exemple pour la facilité de recyclage des catalyseurs ayant été encapsulés dans les dendrimères (Karakhanov *et al.*, 2022; Twyman *et al.*, 2002). Les dendrimères sont utilisés pour purification des eaux, ou leur incorporation aux membranes de filtration a augmenté leur efficacité (Rincón-Montón *et al.*, 2023). Les dendrimères sont utilisés en imagerie médicale comme agent de contraste tels que les dendrimères polyamidoamine dont les amines libres ont été conjuguées à un acide chélateur (Wiener *et al.*, 1994). Dans le domaine pharmaceutique, les dendrimères suscitent un intérêt croissant du fait de la panoplie d'avantages dont ils sont dotés. A titre d'exemples, les dendrimères sont devenus un outil potentiel dans la vectorisation des médicaments. La libération et concentration des médicaments sont deux facteurs cruciaux de l'administration des médicaments et les dendrimères permettent de contourner obstacles à une bonne libération des médicaments tels qu'une solubilité médiocre du médicament, sa dégradation enzymatique, sa toxicité non ciblée de même son inaptitude à traverser les barrières biologiques (An *et al.*, 2023).

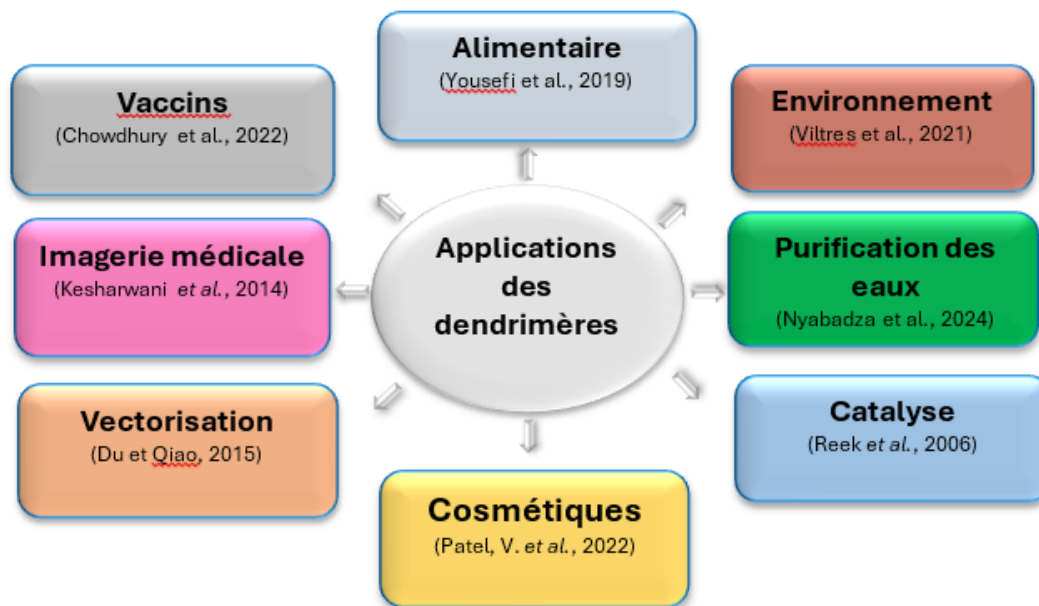


Figure 1.8 Classification des dendrimères.

1.1.13 Les dendrimères et chimie des carbohydrates

1.1.13.1 Concept de multivalence

La valence et la multivalence sont des concepts primordiaux dans la chimie des dendrimères du fait qu'ils permettent une meilleure connaissance des propriétés de ces macromolécules synthétiques. Les interactions ligand-récepteur sont dictées par le nombre de liaisons possibles entre le ligand et le récepteur. Une interaction entre un ligand et un récepteur va donner lieu à une interaction monovalente ligand-récepteur.

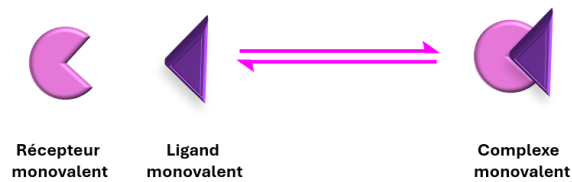


Figure 1.9 Exemple d'interactions récepteur-ligand monovalentes (Rispoli, G., 2009).

Il est possible de parler de multivalence lorsque plusieurs ligands se retrouvant sur une entité vont se lier à des récepteurs d'une entité distincte.

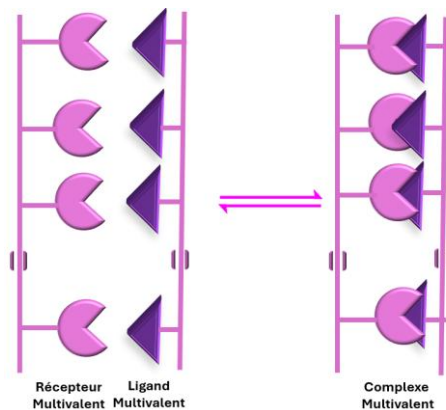


Figure 1.10 Exemple d'interactions récepteur-ligand multivalentes (Rispoli, G., 2009).

Ce phénomène est largement présent dans la nature : c'est le cas des liaisons entre les ligands et des récepteurs présents dans des entités biologique différentes (Kane, 2010). Dans la nature, la multivalence joue un rôle important notamment dans les interactions entre récepteurs et ligands, tels que la fixation de virus sur des cellules cibles avec une forte adhésion et la liaison d'anticorps à des agents pathogènes (Fasting *et al.*, 2012; Kane, 2010). Les phénomènes de reconnaissance multivalente *in vivo* les plus courants impliquent plusieurs copies de récepteurs de surface cellulaire en interaction avec des ligands multivalents. Plusieurs processus biochimiques reposent sur les interactions multivalentes notamment telles que la fixation cellulaire par des agents infectieux, la

reconnaissance des anticorps et la réponse immunitaire-inflammatoire (Hunter et Anderson, 2009; Kiessling, Laura L. *et al.*, 2006). Les interactions multivalentes suscitent un grand intérêt du fait des multiples avantages qu'elles comportent. On peut citer le fait que les interactions multivalentes sont plus fortes que les interactions monovalentes correspondantes (Mammen *et al.*, 1998), d'où l'intérêt de profiter de cet avantage pour synthèse de molécules multivalentes pouvant influencer les interactions biologiques (Badjić *et al.*, 2005; Kiessling, Laura L *et al.*, 2000; Mulder *et al.*, 2004). Des molécules synthétiques multivalentes ont permis d'inhiber les virus et les toxines bactériennes (Kane, 2010). La multivalence est également un outil clé dans la chimie des glucides. En effet, divers processus physiologiques se déroulant dans les cellules et les organismes vivants sont affectés par des interactions glycanes-protéines, lesquelles sont impliquées dans le développement de certaines maladies, telles que l'infection par des agents pathogènes. La force des liaisons entre les glycanes multivalents et protéines est beaucoup plus forte que celles des glucides monovalents et des protéines.

1.1.13.2 Les glycoconjugués

Les glucides ont des interactions multivalentes avec les protéines de plusieurs agents pathogènes, dont les virus et les bactéries et des virus. Les glycoconjugués sont les constituants majeurs des cellules de mammifères et ils sont issus de la liaison covalente entre glycanes et des molécules biologiques telles que les protéines, les peptides et les lipides (Shivatara *et al.*, 2022). Les glycoconjugués se retrouvent principalement dans la partie externe de la membrane cellulaire. Les glycoconjugués interviennent dans le processus d'infection mais également dans divers processus biologiques tels que les processus de reconnaissance spécifiques entre les cellules dont l'adhésion cellule-cellule ou encore interactions cellule-matrice. En raison de leurs avantages multiples, une panoplie de glycoconjugués synthétiques peut être utilisée pour cibler les biomolécules de reconnaissance des glycanes naturels (Chabre, Yoann M et Roy, 2013;

Seeberger et Werz, 2007). De même, les glycoconjugués synthétiques ont été utilisés dans le développement de nouveaux vaccins (Costantino *et al.*, 2011).

1.1.13.3 Les glycoconjugués

Profitant en outre de la multivalence mais également de nombreux avantages qu'ils offrent, les glycodendrimères sont devenus un élément important en glycobiologie (Röckendorf et Lindhorst, 2001). Ces macromolécules synthétiques hybrides combinent les propriétés des dendrimères et des glycanes (Röckendorf et Lindhorst, 2001). Les fractions glucidiques remplissent des fonctions clés dans les infections bactériennes et virales, souvent régulées par des interactions glucides-protéines. Plusieurs études ont montré que la structure moléculaire, la valence et l'organisation spatiale des épitopes glucidiques dans les glycoconjugués sont des facteurs clés de la spécificité et de l'avidité des interactions glucides-protéines. L'avidité, dans ce contexte, fait référence à la force globale de l'interaction entre un glycoconjugué et sa cible protéique, qui peut être influencée par la densité des épitopes et leur agencement dans l'espace, ainsi que par leur capacité à se lier de manière multivalente à des récepteurs ou des sites de reconnaissance sur la protéine cible. Le choix des glycodendrimères appropriés permet presque toujours d'interférer avec ces interactions et de bloquer l'adhésion bactérienne ou virale et l'entrée dans les cellules hôtes en tant que stratégie efficace pour inhiber les infections bactériennes ou virales. Les glycodendrimères sont des mimétiques de structure mais également de fonction des polysaccharides et des glycoprotéines et constituent de ce fait un outil intéressant pour le ciblage des protéines spécifiques de liaison aux glucides (Zhang, W. *et al.*, 2022).

1.1.14 Dendrimères et métaux

1.1.14.1 Nanoparticules métalliques

L'activité antibactérienne des métaux n'est pas un fait nouveau et certains métaux tels que l'argent ont été utilisés depuis des millénaires pour leur pouvoirs antibactérien. La

science moderne s'est également intéressée aux diverses propriétés des métaux notamment les propriétés antibactériennes. Les capacités antibactériennes des nanoparticules métalliques telles que les nanoparticules d'argent et de cuivre ont été jugées intéressantes (Wei *et al.*, 2010). Le pouvoir antibactérien des métaux tels que le cuivre et l'argent a été prouvé autant pour les ions métalliques que pour les métaux zérovalents (Jaiswal *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2009; Rispoli, F. *et al.*, 2010).

1.1.14.2 Les métallo-dendrimères

Les métallo-dendrimères représentent une classe de molécules prisée dans la chimie des dendrimères profitant de la combinaison des propriétés spécifiques des complexes métalliques et de celles des dendrimères. Potentiellement, de métaux dans les structures dendritiques a donné naissance à des molécule dotées de propriétés physiques potentiellement intéressantes. Les métallo-dendrimères ont suscité un intérêt croissant en raison de leur grande variété d'applications potentielles, allant de la catalyse (Deraedt *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2007), à la biomédecine (Sanz del Olmo *et al.*, 2020). L'avantage de combiner des échafaudages dendritiques et des ions métalliques ouvre le chemin à de potentielles applications.

1.1.15 Les dendrimères amphiphiles

Les lipides sont des molécules biologiques provenant des sources naturelles telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes ou synthétiques. Les lipides se caractérisent par leur hydrophobicité soit par une faible solubilité dans l'eau et une solubilité dans des solvants organiques apolaires tels que le benzène et l'éther, le chloroforme et l'hexane (Burtis et Bruns, 2014; Singh, S. *et al.*, 2013). Les lipides peuvent contenir des acides gras, qui sont des chaînes d'atomes de carbone saturées (acides gras saturés) ou insaturées (acides gras insaturés).

Les dendrimères amphiphiles sont une classe de dendrimères qui ressemblent aux entités dendritiques présentes dans la nature, telles que certaines protéines, polysaccharides ou molécules lipidiques, en raison de leur organisation ramifiée et de leur capacité à interagir avec des environnements à la fois hydrophiles et hydrophobes. Ils comportent deux parties distinctes : l'une hydrophile et l'autre hydrophobe (Siriwardena *et al.*, 2018). La chaîne lipidique hydrophobe est formée d'unités alkyles (par exemple, des chaînes d'acides gras ou des bromoalcanes). Cette portion est insoluble dans l'eau, mais interagit favorablement avec les milieux lipidiques ou les membranes biologiques. Elle peut être introduite par synthèse via le greffage de chaînes lipidiques sur une structure centrale. La chaîne hydrophile est le plus souvent composée de groupes polaires ou ioniques (par exemple, des groupes amine, carboxyle, hydroxyle ou sucre). Cette portion est soluble dans l'eau et permet au dendrimère de rester stable dans un environnement aqueux. Cette dualité structurelle confère aux dendrimères amphiphiles des propriétés similaires à celles des tensioactifs ou des phospholipides, leur permettant de s'insérer dans des membranes ou de former des structures auto-assemblées (micelles, vésicules, etc.).

Les dendrimères amphiphiles sont un outil prometteur pour diverses applications notamment les agents antibactériens. Une étude récemment effectuée a conféré un potentiel pouvoir antibactériens aux présence de dendrimères amphiphiles contenant une chaîne lipidique (Siriwardena *et al.*, 2018).

CHAPITRE 2

PROJET DE THÈSE

2.1 Schéma du projet de thèse

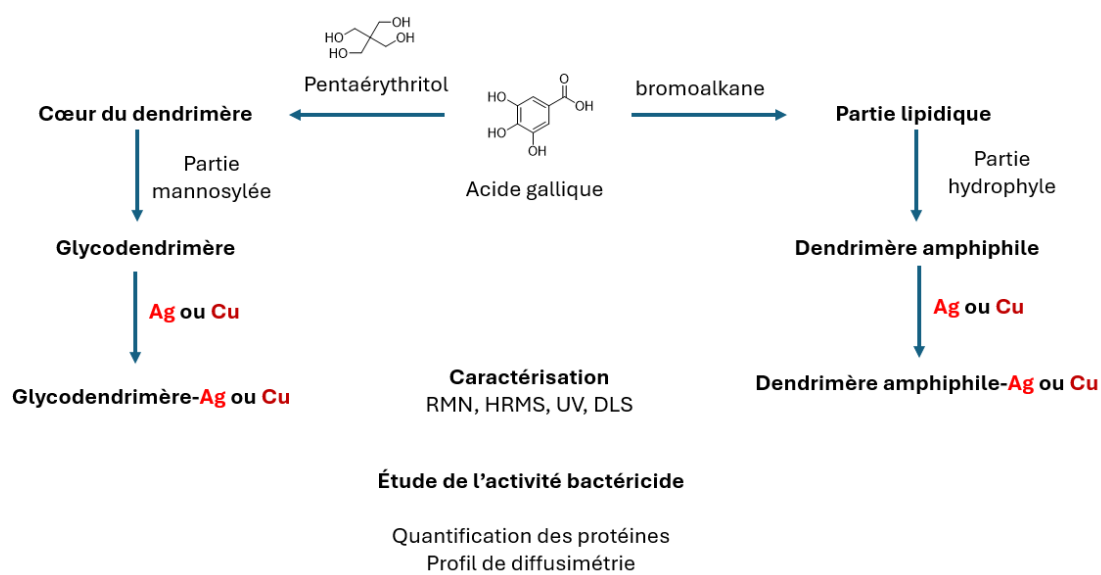


Figure 2.1 Présentation graphique du projet de thèse mettant en relief le projets 1 et 2 avec au départ l'acide gallique pour obtenir le glycodendrimère (projet 1) et le dendrimère amphiphiles qui ont été fonctionnalisés avec du cuivre et de l'argent et

caractérisés par RMN, HRMS, UV-Vis et DLS. L'étude bactéricide a également été effectuée.

2.2 Contexte général

La montée de la résistance bactériennes aux antibiotiques classiques tant en santé humaine qu'animale, a conduit à la recherche de solutions thérapeutiques alternatives. Cette situation alarmante a été l'élément déclencheur dans la recherche de nouvelles stratégies antibactériennes pouvant mener au développement de nouveaux traitements antibactériens. Les dendrimères étant hautement ramifiées (Kenguva *et al.*, 2022) et avec une surface fonctionnalisable (Ghaffari *et al.*, 2018), offrent une plateforme innovante pour le développement de nouvelles structures antibactériennes (Falanga *et al.*, 2021). Leur taille nanométrique (Chis *et al.*, 2020) et leur polyvalence (Singh, M. K. *et al.*, 2024) sont des avantages clés qui permettent aux dendrimères d'interagir de manière efficace avec les membranes bactériennes, d'être des transporteurs de charges actives médicamenteuses mais également de pouvoir cibler des mécanismes biologiques spécifiques. Les dendrimères ont la capacité de pénétrer les biofilms bactériens par diffusion à travers les matrices polysaccharidiques, ce qui permet d'atteindre de manière plus efficace les bactéries protégées à l'intérieur du biofilm. Cette propriété a été démontrée notamment pour les dendrimères de type PAMAM, capables de traverser les biofilms d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* grâce à leur structure ramifiée et leur charge de surface adaptée (Mintzer et Grinstaff, 2011). De plus, les dendrimères peuvent perturber la membrane bactérienne (Skrzyniarz *et al.*, 2023). En effet, les surfaces des dendrimères fonctionnalisées ont une capacité d'interaction avec les lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatives, entraînant ainsi la lyse cellulaire. Finalement, les dendrimères permettent une libération contrôlée des agents antimicrobiens par encapsulation des charges actives, ce qui permet une augmentation de leur biodisponibilité et leur efficacité. L'acide gallique, molécule naturelle dotée de propriétés antioxydantes et antimicrobiennes attrayantes a

fait l'objet de recherches dont les résultats ont révélé son activité bactéricide et qu'elle permettait d'inhiber la formation du biofilm bactérien (Tian *et al.*, 2022). Le mannose est un sucre qui peut se lier spécifiquement à certaines bactéries grâce à des récepteurs de type lectine, présents à la surface des cellules. Cette interaction augmente l'affinité et l'efficacité des mécanismes antibactériens. (Jack et Turner, 2003). Le pouvoir bactéricide de certains métaux tels que l'argent et le cuivre est connu depuis des millénaires. L'argent est réputé pour son activité bactéricide. Il agit en perturbant les enzymes respiratoires et en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), qui induisent des dommages cellulaires multiples (Morones *et al.*, 2005). En effet, les ions argent ont un rôle destructif vis-à-vis des bactéries du fait de leur adsorption sur la plupart des biomolécules (ADN, protéines membranaires ou enzymes) des bactéries ce qui permet une inactivation de leurs fonctions (Xu *et al.*, 2021). Les propriétés de certains complexes de cuivre (II) ont été étudiées et les résultats ont montré leur potentielle capacité à endommager l'ADN et les protéines et d'augmenter le ROS par des réactions de transfert d'électrons (Arthi *et al.*, 2023).

Ce projet de thèse vise à combiner des approches innovantes afin de développer des molécules dotées d'une activité antibactérienne élevée. De plus le projet se distingue par son approche innovante en alliant la chimie supramoléculaire et microbiologie, afin de trouver des solutions à la résistance bactérienne. En exploitant les avantages des dendrimères, tels que leur capacité à transporter et libérer de manière contrôlée des métaux, ainsi que les propriétés spécifiques de métaux comme l'argent et le cuivre, ce projet pourrait offrir une solution à la crise de la résistance bactérienne, avec des applications potentielles en médecine humaine et vétérinaire. Ce projet de thèse vise à développer de nouveaux matériaux nanométriques dendritiques greffés de métaux avec une efficacité antibactérienne potentiellement élevée, et pouvant être sujet à des applications cliniques, dans l'industrie pharmaceutique et vétérinaire.

Ce projet s'inscrit dans cette dynamique par une proposition menant au développement et à l'étude de dendrimères fonctionnalisés, avec deux axes principaux :

1. Axe de synthèse de glycodendrimères chargés en métaux zéro-valents (Cu^0 et Ag^0).
2. Axe de synthèse de dendrimères amphiphiles, dotés de structures hydrophobes et hydrophiles, et chargés en métaux.

2.3 Problématique

Les bactéries *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC), notamment la souche Fimbriae 4 (F4), jouent un rôle prépondérant dans les infections intestinales sévères, causant des pertes économiques importantes dans le secteur zootechnique et menaçant également la santé humaine. Les antibiotiques conventionnels, tels que la gentamycine qui étaient considérés comme des traitements de choix, sont confrontés à une décroissance de leur efficacité et cela en raison de l'émergence de souches résistantes.

Face à cette crise, le développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur des mécanismes alternatifs et des matériaux innovants est devenu une priorité. Les glycodendrimères mannosylés chargés de métaux zéro-valent (Cu^0 et Ag^0) de même que les dendrimères amphiphiles chargés de métaux zéro-valent (Cu^0 et Ag^0) mais également de métaux cationiques (Cu^{2+} et Ag^+) émergent comme des candidats prometteurs pour surmonter ces défis grâce à leur capacité à pouvoir cibler de manière sélective les bactéries pathogènes et à pouvoir perturber leurs mécanismes.

2.4 Approche

Cette étude adopte une approche multidisciplinaire qui intègre des aspects de la chimie de synthèse, de la chimie des matériaux et de la microbiologie afin de permettre le

développement de solutions innovantes contre les bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, en particulier ETEC: F4 (*E.coli* entérotoxigène).

L'utilisation de glycodendrimères métalliques mannosylés (chargés de Cu^0 et Ag^0) représente une stratégie novatrice, alliant des propriétés des glycodendrimères mannosylés et ceux des métaux pour cibler de manière sélective les bactéries tout en minimisant l'impact sur les cellules hôtes. Parallèlement, l'approche avec les dendrimères amphiphiles, dotés de structures hydrophobes et hydrophiles, est également prometteuse. Ces dendrimères amphiphiles peuvent interagir efficacement avec la membrane des bactéries, en exploitant les propriétés amphiphiles pour interagir avec les phospholipides membranaires et améliorer l'insertion dans la membrane lipidique des cellules bactériennes. En fonction des métaux chargés, ces structures peuvent favoriser la disruption de la membrane, générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et augmenter l'efficacité antibactérienne tout en réduisant la formation du biofilm. L'association de métaux chargés Cu^{2+} et Ag^+ , ou zéro-valents (Cu^0 et Ag^0) et des dendrimères amphiphiles pourrait également augmenter la diffusion à travers les matrices de biofilm, surmontant ainsi une des principales résistances des bactéries face aux traitements.

2.5 Objectifs de la recherche

L'objectif principal de cette recherche est le développement et l'évaluation de systèmes antimicrobiens dotés d'une efficacité élevée. Cet objectif principal est subdivisé en objectifs secondaires dont les plus importants sont :

- 1- Synthétiser des glycodendrimères greffés de métaux, avec un cœur constitué d'acide gallique et des branches mannosylées comme groupement terminaux et incorporant des métaux sous forme zéro-valente (Cu^0 et Ag^0), comme potentiels agents antibactériens efficaces et alternatifs aux antibiotiques traditionnels pour lutter contre certaines bactéries et de manière plus spécifique

contre *Escherichia coli* entérotoxigène Fimbriae 4 (ETEC:F4) et réduire le risque de résistance bactérienne.

- 2- Synthétiser des dendrimères amphiphiles comportant une partie hydrophobe constituée de trois chaînes lipidiques et une partie hydrophile, fonctionnalisés avec des métaux cationiques et zéro-valent (Cu^0 et Ag^0), comme potentiels agents antibactériens efficaces et alternatifs aux antibiotiques traditionnels pour lutter contre certaines bactéries et de manière plus spécifique contre *Escherichia coli* entérotoxigène Fimbriae 4 (ETEC:F4) et réduire le risque de résistance bactérienne.
- 3- Évaluation de l'activité antibactérienne des glycodendrimères contre **ETEC:F4**.

2.6 Hypothèse

L'hypothèse de cette recherche repose sur l'idée que les glycodendrimères mannosylés chargés de métaux zéro-valent (Cu^0 et Ag^0) de même que les dendrimères amphiphiles chargés de métaux cationiques et zéro-valent (Cu^0 et Ag^0) ont la capacité d'inhiber la croissance et la prolifération de certaines bactéries pathogènes dont la souche *Escherichia coli* entérotoxigène Fimbriae 4 (ETEC:F4) plus efficacement que les dendrimères non chargés. Cette hypothèse est fondée sur plusieurs études effectuées et se subdivise en deux hypothèses secondaires.

Hypothèse 1: L'hypothèse est que les glycodendrimères greffés de mannose et intégrant des métaux zéro-valent (Cu^0 et Ag^0) agissent comme agents antibactériens pour inhiber la formation de biofilm et perturber l'intégrité des cellules bactériennes. Les glycodendrimères, greffés avec des glucides tels que le mannose en périphérie, ont montré des propriétés antimicrobiennes potentielles en raison de leur capacité à interagir avec la surface des bactéries notamment à travers les fimbriae et les récepteurs à lectine. La reconnaissance des groupements mannosylés, par les lectines ou d'autres récepteurs spécifiques à la surface des bactéries facilite l'adhésion des glycodendrimères à la surface bactérienne, puis leur pénétration dans la cellule, perturbe les interactions bactéries-bactéries, interférant avec la transmission de

l'information cellulaire et inhibant la formation du biofilm bactérien. L'intégration de métaux zéro-valent (Cu^0 et Ag^0) dans la structure des glycodendrimères devra améliorer leur activité antibactérienne du fait de leurs propriétés intrinsèques. En effet, le cuivre et l'argent sont des métaux ayant la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'induire des dommages au niveau de la membrane bactérienne, en perturbant ainsi l'intégrité cellulaire et la fonction du métabolisme. Ces métaux peuvent également interagir directement avec des composants cellulaires essentiels comme l'ADN et les protéines, entraînant la mort cellulaire.

Hypothèse 2 : L'hypothèse est que les dendrimères amphiphiles intégrant des métaux chargés (Cu^{2+} et Ag^+) ou zéro-valent (Cu^0 et Ag^0) agiront comme agents antibactériens en inhibant la formation de biofilm et en perturbant l'intégrité des cellules bactériennes. Les dendrimères amphiphiles, dotés d'un cœur d'acide gallique, d'un groupement ester ou carboxyle, et fonctionnalisés avec des métaux (argent ou cuivre) sous forme zéro-valente ou ionique, devraient présenter des propriétés antibactériennes élevées en raison de leur capacité à cibler de manière sélective les membranes bactériennes, à perturber l'intégrité cellulaire, et à inhiber la formation de biofilms. L'activité antibactérienne des métallo-glycodendrimères a été évaluée contre des souches bactériennes Gram-positives (*Bacillus subtilis*) et Gram-négatives (*Escherichia coli*). Les tests d'inhibition seront réalisés à l'aide de la méthode de diffusion sur disque et mesurés par le diamètre de la zone d'inhibition.

2.7 Réalisations

- Article publié dans le journal *Microorganisms*
- Manuscrit en préparation pour soumission au journal *Molecules*
- Communications au colloque « Annual Symposium of the CRIPA 2023 » le 08 décembre 2023 au Centrexpo Cogeco de Drummondville.

CHAPITRE 3
METALLO-GLYCODENDRIMERIC MATERIALS AGAINST
ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI*

**Aly El Riz, Armelle Tchoumi Neree, Leila Mousavifar, René Roy, Younes Chorfi
and Mircea Alexandru Mateescu***

Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Succ. Centre-Ville, P.O.
Box 8888, Montréal, QC H3C 3P8, Canada

Department of Veterinary Biomedicine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,
Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA), Université de
Montréal, St-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

*Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu

Department of Chemistry, UQAM, CP 8888, Branch A. Montreal (Québec) H3C 3P8,
Canada

Phone: +1 (514) 987 4319

e-mail: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Cet article a été publié dans le journal Microorganisms **2024**, 12(5), 966.

3.1 Résumé

La conjugaison des glucides aux nanomatériaux a été largement étudiée et reconnue comme une alternative dans le domaine biomédical. Les dendrimères synthétisés avec du mannose comme groupement terminal et contenant du cuivre/argent zéro-valent encapsulé pourraient être des candidats potentiels contre la prolifération bactérienne. Cette étude a pour objectif d'étudier l'activité bactéricide des glycodendrimères métalliques. La réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par Cu(I) (CuAAC) a été utilisée pour synthétiser un nouveau dendrimère mannosylé contenant 12 résidus de mannopyranoside en périphérie. La viabilité des fimbriae 4 de *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC:F4), mesurée à 600 nm, a montré la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) des glycodendrimères sans métal (D), des glycodendrimères chargés en cuivre (D:Cu) et des glycodendrimères chargés en argent (D:Ag), proches de 4.5×10^1 , 3.5×10^1 et de 1.0×10^{-2} µg/mL, respectivement, et la concentration minimale inhibitrice (CMI) de D, D:Cu et D:Ag de 2.0, 1.5 et 1.0×10^{-4} µg/mL, respectivement. La libération du contenu bactérien dans le bouillon et l'inhibition de la formation du biofilm ETEC:F4 ont augmenté avec le nombre de matériaux métallo-glycodendrimères, avec un intérêt particulier pour le nanomatériau contenant de l'argent, qui a montré l'activité la plus élevée, suggérant que les matériaux à base de glycodendrimères interféraient avec les interactions bactéries-bactéries ou bactéries-polystyrène, avec le métabolisme des bactéries et pouvaient perturber les parois cellulaires bactériennes. Nos résultats identifient les dendrimères métal-mannose comme des agents bactéricides puissants et soulignent l'effet du métal zéro-valent encapsulé contre ETEC:F4.

Mots-clés :
 Activité bactéricide ; *Escherichia coli* entérotoxigène fimbriae 4 (ETEC:F4) ;
 perspectives moléculaires ; libération d'ADN ; libération d'ARN ; glycodendrimères ;

glycodendrimères chargés en cuivre (D:Cu) ; glycodendrimères chargés en argent (D:Ag).

3.2 Abstract

Conjugation of carbohydrates to nanomaterials has been extensively studied and recognized as an alternative in the biomedical field. Dendrimers synthesized with mannose at the end group and with entrapped zero-valent copper/silver could be a potential candidate against bacterial proliferation. This study is aimed at investigating the bactericidal activity of metal-glycodendrimers. The Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction was used to synthesize a new mannosylated dendrimer containing 12 mannopyranoside residues in the periphery. The enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) viability, measured at 600 nm, showed the half-inhibitory concentration (IC₅₀) of metal-free glycodendrimers (D), copper-loaded glycodendrimers (D:Cu) and silver-loaded glycodendrimers (D:Ag) closed to 4.5×10^1 , 3.5×10^1 and to 1.0×10^{-2} µg/mL, respectively, and minimum inhibitory concentration (MIC) of D, D:Cu and D:Ag of 2.0, 1.5 and 1.0×10^{-4} µg/mL, respectively. The release of bacteria contents onto broth and the inhibition of ETEC:F4 biofilm formation increased with the number of metallo-glycodendrimer materials, with a special interest in silver-containing nanomaterial, which had the highest activity, suggesting that glycodendrimer-based materials interfered with bacteria-bacteria or bacteria–polystyrene interactions, with bacteria metabolism and can disrupt bacteria cell walls. Our findings identify metal–mannose-dendrimers as potent bactericidal agents and emphasize the effect of entrapped zero-valent metal against ETEC:F4.

Keywords: Bactericidal activity ; enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae 4 ; (ETEC:F4), molecular insights ; DNA release ; RNA release ; silver-loaded glycodendrimers (D:Ag).

3.3 Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) bacteria are the main cause of enteric swine diseases (Fairbrother *et al.*, 2005) and were intensively studied in porcine post-weaning diarrhea characterized by growth retardation of piglets, dysbiosis, hemorrhagic diarrhea, pathogenic infections due to hyperpermeability of enterocytes or sudden death, causing economic upheaval in pig production (Castro *et al.*, 2022; Eriksen *et al.*, 2023; Rhouma *et al.*, 2017). The ETEC bacteria were found in pig foods, slaughterhouses, or contaminated instruments in contact with the animals. The prophylactic strategies to prevent bacterial infections are based on cleaning and sterilizing the swine environment. Fecal contamination is the main vehicle for zoonotic pathogens (Ercumen *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2022; Harris, 1990; Penakalapati *et al.*, 2017). Several pathogenic bacteria, including ETEC, found in livestock can contaminate water, soil and farm environments and cause disease in humans and pets (Calderon Toledo *et al.*, 2023; Sentamu *et al.*, 2023). ETEC are characterized by the ability to produce two types of virulent factors: adhesins promoting binding to specific enterocyte receptors for intestinal colonization and enterotoxins responsible for fluid secretion (Dubreuil *et al.*, 2016). During the disease, the proliferation of ETEC induces a disequilibrium of the commensal microbiome (Hrala *et al.*, 2021; Kim, K. *et al.*, 2022; Navez *et al.*, 2023) and generates severe hemorrhagic diarrhea in mammals that may cause inappetence, loss of weight and even sudden death (Fairbrother et Nadeau, 2019). The development and administration of vaccines (Dubreuil, 2021; Matías *et al.*, 2017; Matías *et al.*, 2020; Melkebeek *et al.*, 2013), bactericidal (Dubreuil, 2013; Rhouma *et al.*, 2016) and microbiota transplantation (Bin *et al.*, 2018) remain the main therapeutic strategies against ETEC infection. In the last decade, many cases of antibacterial resistance were reported (Laird *et al.*, 2021) that have shown the importance of engineering novel antibacterial drugs. In this project, we proposed glycodendrimer-based materials. Glycodendrimers are starburst polymers with predictable molecular

weight and organized with a central core surrounded by ramifications ended with reactive groups (Chabre, Yoann M. et Roy, 2010). Due to the hyperbranched structure and the presence of internal cavities, glycodendrimers are used as carriers for bioactive agents such as drugs or metallic ions. In addition, bioactive molecules (cationic, anionic, polar and non-polar) can be attached at the periphery of the glycodendrimer via the reactive terminal groups. The reactive group could interact with various therapeutic molecules such as DNA, proteins, carbohydrates, or metals according to the biological applications (Fernandes *et al.*, 2021). Further, multivalency is a real advantage for glycodendrimers compared to carbohydrate monomers (Kiessling, Laura L. *et al.*, 2006). Indeed, multivalent carbohydrate–protein target interactions have shown significant advantages, compared to the interactions between carbohydrate monomers and protein targets, due to low binding affinity (Pieters, 2007). For this purpose, several glycodendrimers have been designed to solve the problem of low-affinity carbohydrate–protein interactions (Sleiman *et al.*, 2008). Mannosylated analogs (Mousavifar *et al.*, 2018) glycodendrimers are considered potential candidates for the treatment of certain strains of *E. coli* by inhibiting bacterial adhesion and the formation of biofilms on the cell surface (Appeldoorn *et al.*, 2005). Further biological applications of glycodendrimers have been reported (Roy et Touaibia, 2007; Touaibia et Roy, 2007; Touaibia *et al.*, 2007).

Due to their anti-fungal and antibacterial properties, glycodendrimers are usually used to inhibit bacterial proliferation (Abdel-Sayed *et al.*, 2016); therefore, they constitute a non-neglected route to control bacterial proliferation. Other biopolymers, suitable as carriers for silver and copper are already used in the laboratory to control Gram-negative bacterial proliferation. It was previously shown (Noori *et al.*, 2022; Noori *et al.*, 2021) that zero-valent silver and copper hosted by carboxymethyl derivatives are bactericides against non-pathogenic Gram-negative bacteria. We propose now an investigation of the bactericidal activity of glycodendrimers unloaded and loaded zero-valent metals. The mechanism of action of glycodendrimers is not yet completely

understood. It is known that certain glycodendrimers carrying metal cations have a hydrophobic tail able to penetrate the cell or facilitate their attachment to the bacterial wall (Fox *et al.*, 2018; Winnicka *et al.*, 2013), changing the membrane permeability by making it porous, and leading to cell lysis. The positive charge of metal cations or of the carbohydrate terminal group and the amphiphilicity alongside the dynamic self-assembling of glycodendrimers are enrolled in their antibacterial activity (Căta *et al.*, 2023; de la Mata *et al.*, 2023; Dhumal *et al.*, 2022; Pricl, 2023; Shiabiev *et al.*, 2023; Viswanath et Santhakumar, 2017). The appearance of pores on the membrane may allow the diffusion of glycodendrimers into the cell, where the carbohydrate terminal groups bind with sulfur and phosphorus-containing proteins, leading to their inactivation and with DNA (Chen *et al.*, 2022). Another hypothesis suggests that the antibacterial activity of glycodendrimer loaded with metal nanoparticles results from the release of corresponding ions via the oxidation dissolution process. Metal ions oxidized from corresponding metal-loaded materials mainly interact with thiol groups of various enzymes and proteins, thereby interfering with the respiratory chain and disrupting the bacterial cell wall (Edr *et al.*, 2022). In addition, it is known that silver ions are involved in the generation of reactive oxygen species (ROS), which are considered the main cause of most cell deaths via the inactivation of DNA replication and ATP production (Kaur *et al.*, 2023). In the same way, it was also found that several dendrimers possess antibacterial activity against pathogenic *E. coli* (Pardeshi *et al.*, 2023).

Metallo-glycodendrimer materials combining the nanoparticle properties due to their nanosize and the alteration of bacteria metabolism due to mannose are expected to be good candidates to overcome microbial proliferation. To the best of our knowledge, there are no reports on the synthesis and on the antibacterial applications of mannosylated dendrimers loaded with zero-valent copper or silver. There are now reports of the synthesis of novel glycodendrimers loaded with zero-valent metals and their applications against enterotoxigenic *E. coli* proliferation (the main cause of swine

enteritis). The core of dendrimers was prepared using gallic acid, which has intrinsic antibacterial properties. Mannopyranosides, known to target bacterial pili, were attached as ending reactive groups to form glycodendrimers. In order to enhance the antibacterial activity of these glycodendrimers, zero-valent copper or silver was loaded to form copper-loaded glycodendrimers and silver-loaded glycodendrimers, respectively. The particle size of glycodendrimers-based materials was measured, zero-valent metals entrapped was confirmed, and the antimicrobial activity of metal-free glycodendrimers, copper-loaded glycodendrimers and silver-loaded glycodendrimers against ETEC:F4 was compared with that of 3% hydrogen peroxide.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Materials

All the reagents were used as supplied without any prior purification. The reagents were obtained from Millipore Sigma Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada) and Thermo Fisher Scientific (Saint-Laurent, QC, Canada).

Enterotoxigenic *E. coli* Fimbriae 4 (NCBI ID: txid316401), used for bactericidal assays, was from Professor Fairbrother (Pathology and Microbiology Department) at the Veterinary Medicine Faculty of Université de Montréal (St-Hyacinthe, QC, Canada).

3.4.2 Methods

All the organic reactions were carried out using standard methods under an inert atmosphere of nitrogen. The storage of the solvents was carried out using molecular sieves and if necessary, those solvents were bubbled with nitrogen. The monitoring of the reactions was carried out by using thin-layer chromatography (TLC) using silica gel 60 F254 pre-coated plates (E. Merck, Darmstadt, Germany). The TLC was viewed under ultraviolet light at 254 nm or/and chemical stain recipe. The purification was

performed by recrystallization or flash (60 Å porosity, 40–63 µm) column chromatography using silica gel (Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada).

The distribution of particle size was measured in water using Dynamic Light Scattering measurements (Malvern, Zetasizer Nano S90, Worcestershire, UK).

¹H-NMR acquisitions were recorded at 300 MHz, and ¹³C-NMR spectra were recorded at 75 MHz, respectively, on a Bruker spectrometer (300 MHz) (Milton, ON, Canada). All NMR spectra were measured at 25 °C in the described deuterated solvents. The chemical shifts of proton and carbon are reported in parts per million (ppm), and the coupling constants (*J*) are reported in Hertz (Hz). The peaks of the residual protic solvent used for chemical shift calibrations were CDCl₃ (¹H, δ 7.27 ppm; ¹³C, δ 77.2 ppm (central resonance of the triplet)), DMSO-d₆ (¹H, δ 2.50 ppm; ¹³C, δ 39.52 ppm) and D₂O (¹H, 4.79 ppm and 30.9 ppm for the CH₃ of the acetone in the ¹³C spectra).

Synthesis of methyl 3,4,5-tris(hydroxyl)benzoate (2). 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (**1**, Gallic acid) (5.0 g, 29.4 mmol) was dissolved in 80 mL of methanol, and 0.5 mL of H₂SO₄ was added dropwise. The reaction was refluxed for 7 h and monitored by TLC. When the reaction was completed, the solvent was evaporated to obtain the crude product. The reaction mixture was concentrated and extracted with ethyl acetate (3 × 200 mL). The reaction mixture was then treated with saturated NaHCO₃ in order to neutralize any acidic traces. The organic layer was dried over sodium sulfate (Na₂SO₄) and concentrated in vacuo (rotary evaporator) to provide ester **2** in good yield (5.1 g, 95%); R_f = 0.4 (15% ethyl acetate/hexane). Compound characterization agreed with the literature values (Zhang, S. et Zhao, 2011). ¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO): δ 9.21 (s, 3H), 6.98 (s, 2H), 3.74 (s, 3H); ¹³C-NMR (75 MHz, (CD₃)₂SO): δ 166.8, 146.0, 138.9, 119.9, 109.0 and 52.1 ppm.

Synthesis of methyl 3,4,5-tris(propargyloxy)benzoate (3). Compound **2** (1.0 g, 5.4 mmol) was dissolved in 10 mL of dry acetone to which was added potassium carbonate K_2CO_3 (5.2 g, 43.4 mmol) followed by the addition of 18-crown-6-ether (57.4 mg, 0.2 mmol) as a co-catalyst. Propargyl bromide (1.6 mL, 43.4 mmol) was next added dropwise, and the reaction was refluxed overnight. The solvent was then evaporated to afford the crude product, which was purified by silica gel column chromatography, which gave compound **3** as a white powder (1.10 g, yield 68%); R_f = 0.4 (15% ethyl acetate/hexane). Compound characterization agreed with literature values (Zhang, S. et Zhao, 2011); 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.41 (s, 2H), 4.77 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 2.54 (s, 2H), 2.46 (s, 1H); ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 165.7, 150.8, 140.5, 125.3, 109.3, 78.2, 76.3, 75.9, 75.3, 59.9, 56.6 and 51.9 ppm.

Synthesis 3,4,5-tris(propargyloxy)benzoic acid (4). Compound **3** (1.0 g, 3.4 mmol) was dissolved in 40 mL ethanol, followed by the addition of a 10% aqueous solution of KOH (7.5 mL, 752.4 mg, 13.4 mmol) in 7.5 mL water. The reaction was refluxed for 4 h with constant stirring and cooled to room temperature. Subsequently, the reaction mixture was concentrated, and hydrochloric acid was added until pH 1 was obtained. The reaction mixture was extracted with dichloromethane (DCM) and washed with H_2O . The organic layer was then collected and dried over Na_2SO_4 , followed by the solvent evaporation without purification to provide pure compound **4** as a white powder (905 mg, yield 95%); R_f = 0.4 (15% ethyl acetate/hexane). Compound characterization agreed with literature values (Zhang, S. et Zhao, 2011) 1H -NMR (300 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 7.40 (s, 2H), 4.91 (d, J = 1.2 Hz, 4H), 4.73 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.47 (s, 1H); ^{13}C -NMR (75 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 167.2, 151.4, 140.1, 126.7, 109.3, 79.6, 79.4, 79.3, 78.8, 59.9 and 56.9 ppm.

Synthesis of dendrimer core (5). To a solution of pentaerythritol (25.0 mg, 0.18 mmol) in 10 mL anhydrous DCM (10 mL), compound **4** (271.4 mg, 0.95 mmol), N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (189.4 mg, 0.92 mmol) and 4-

dimethylaminopyridine DMAP (49.4 mg, 0.40 mmol) were added. The reaction was refluxed overnight (o.n.). The completion of the reaction was confirmed by TLC, and the reaction mixture was concentrated and purified by silica gel column chromatography to afford compound **5** as a white powder (146.8 mg, yield 67%); R_f = 0.4 (DCM); $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 7.49 (s, 8H), 4.83 (d, J = 1.2 Hz, 8H), 4.79 (s, 16H), 4.66 (s, 8H), 2.61 (s, 8H), 2.47 (s, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 165.2, 151.5, 141.4, 124.7, 109.9, 78.6, 77.9, 76.6, 75.8, 63.3, 60.3, 57.2 and 43.2 ppm.

Synthesis of triethylene glycol *p*-toluenesulfonate (6). To a solution of triethylene glycol (16.24 g, 108.15 mmol) in 45 mL of tetrahydrofuran (THF), 6 mL of a 4M aqueous solution of NaOH was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h, and then a solution of tosyl chloride (2.11 g, 10.82 mmol) in THF (25 mL) was added dropwise using a dropping funnel. Finally, the reaction mixture was stirred at 0 °C for an additional 3 h. The reaction mixture was poured into iced water (200 mL) and extracted with DCM (3 $\times$ 200 mL). The organic layer was dried over sodium sulphate and concentrated under vacuo. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give compound **6** as a colorless oil (3.29 g, 99%) R_f = 0.4 (30% acetone/DCM). Compound characterization agreed with the literature value (van Ameijde et Liskamp, 2003). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.78 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.15 (t, J = 4.8 Hz, 3H), 3.69-3.54 (m, 10H), 2.97 (s, 1H), 2.44 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 145.0, 132.7, 127.9, 72.5, 70.6, 70.1, 69.3, 68.6, 61.5 and 21.6 ppm.

Synthesis of 2-[2-(2-(2-Tosyloxy-ethoxy)-ethoxy)-ethyl]2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside (8). This compound was prepared according to a slight modification of the literature procedure (Percec *et al.*, 2013). To a solution of known mannose pentaacetate (**7**) (1.00 g, 2.56 mmol) (Percec *et al.*, 2013) in anhydrous DCM (10 mL) was added triethylene glycol *p*-toluene sulfonate (1.8 g, 5.98 mmol) (**6**) and the mixture was stirred at room temperature for 1h. The reaction mixture was then

cooled to 0 °C in an ice bath. Boron trifluoride etherate (BF₃OEt₂, 3.8 g, 10.79 mmol) was next added dropwise under a nitrogen atmosphere, and the reaction was stirred for 2 h. The reaction mixture was next heated at 40 °C overnight until complete glycosylation. The crude product was extracted with DCM and treated with NaHCO₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄, followed by solvent evaporation. The product was purified by silica gel column chromatography to afford compound **8** as a colorless oil (1.0 g, yield 60%). R_f = 0.35 (EtOAc/Hexane, 1:4). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 δ (7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.32-5.21 (m, 3H), 4.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 12.3, 5.1 Hz 1H), 4.14-4.08 (m, 2H), 4.07-4.02 (m, 1H), 3.76-3.54 (m, 11H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.94 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.2, 169.6, 169.4, 169.3, 144.4, 132.6, 129.4, 127.5, 97.3, 70.3, 70.2, 69.6, 69.1, 68.9, 68.6, 68.3, 68.0, 66.9, 65.7, 62.0, 21.2, 20.4, 20.3, 20.3, 20.2.

Synthesis of 2-[2-(2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy)-ethyl]2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside (9**)** A solution of the compound **8** (854 mg, 1.7 mmol) in DMF (15 mL) was stirred under a nitrogen atmosphere then sodium azide (884 mg, 13.6 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for overnight. The reaction mixture was diluted in EtOAc and washed with saturated solution of sodium chloride (brine). The organic layer was dried over Na₂SO₄, followed by the solvent evaporation to afford compound **9** as a colorless oil (800 mg, yield 93%), R_f = 0.35 (EtOAc/Hexane, 1:4). Compound characterization agreed with the literature values (Li, J. *et al.*, 1999). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.39-5.26 (m, 3H), 4.88 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 12.4, 5.2 Hz, 1H), 3.71-3.67 (m, 2H), 3.91-3.75 (m, 1H), 3.76-3.60 (m, 9H), 3.42-3.38 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 169.8, 169.7, 169.5, 97.5, 77.2, 69.8, 69.7, 69.3, 68.8, 67.1, 50.4, 20.6, 20.5, 20.4, 20.4.

Synthesis of peracetylated glycodendrimer (10). To a solution of compound **5** (25.0 mg, 0.02 mmol) and excess compound **9** (194.4 mg, 0.37 mmol, 18.5 equiv., 1.5 equiv/alkyne groups) in H₂O/THF (4 mL, v/v) was added sodium ascorbate (29.3 mg, 0.24 mmol) and Cu(OAc)₂ (41.6 mg, 0.17 mmol). The solution was heated at 50 °C for 12 h and then cooled to room temperature until complete conversion of the alkyne used as limiting reagent (overnight). The reaction mixture was extracted with EtOAc, which was then treated with 5% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), water, brine and dried over Na₂SO₄. The organic phase was concentrated, and the residue was purified by silica gel column chromatography to afford the protected glycodendrimer. Yield (93.8 mg, 64%); R_f = 0.4 (DCM); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.01 (s, 8H), 7.99 (s, 4H), 7.49 (d, *J* = 1.2 Hz, 12H), 5.33-5.20 (m, 60H), 4.85 (s, 12H), 4.74 (s, 8H), 4.57 (s, 36H), 4.29-4.23 (m, 12H), 4.14-4.05 (m, 12H), 3.90-3.80 (m, 12H), 5.33-5.20 (m, 96H), 2.61 (s, 8H), 2.47 (s, 4H); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 170.3, 169.7, 169.6, 169.4, 164.9, 151.7, 124.8, 124.3, 108.9, 97.3, 70.3, 70.1, 69.6, 69.2, 68.7, 68.1, 65.7, 62.0, 49.9, 20.6, 20.4, 20.4, 20.4.

Synthesis of unprotected glycodendrimer (11) Peracetylated manno-dendrimer **10** (70.0 mg, 0.01 mmol) was trans-esterified under classical Zemplén conditions in dry MeOH (3 mL) containing a solution of 1M sodium methoxide (MeOH, pH 8.5). The reaction mixture was stirred at room temperature until the starting material completely disappeared, as confirmed by a single spot on TLC at the baseline. The reaction mixture was neutralized by the addition of a cationic ion-exchange resin (H⁺), filtered, evaporated under vacuo, and the residue was lyophilized to obtain the final unprotected glycodendrimer **11** (45.6 mg) in 89% yield. ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ 7.49 (s, 8H), 4.91 (d, *J* = 1.2 Hz, 4H), 4.79 (s, 16H), 3.89 (dd, *J* = 10.5, 5.7 Hz, 48H), 3.78 (dd, *J* = 12.5, 6.9 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 12.4, 3.5 Hz, 1H), 3.58 (dd, *J* = 16.9, 7.6 Hz, 1H), 3.51-3.45 (m, 84H); ¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ 165.1, 151.5, 141.4, 124.7, 109.9, 78.6, 77.9, 76.6, 75.8, 59.9, 63.2, 60.3, 57.2 and 43.2 ppm.

Metal-entrapment in glycodendrimer. The cation-loaded dendrimers were obtained by adding 15 mg of the glycodendrimer to 10 mL aqueous solutions of either 0.0005 mol/L Cu(OAc)₂ or 0.0005 mol/L AgNO₃ under vigorous stirring at room temperature for 2 h according to Noori et al. with minor modifications (Noori *et al.*, 2021). Then, to the obtained cation-containing glycodendrimers (**11-Cu²⁺** or **11-Ag⁺**) were added 10 mL of 0.001 mol/L NaBH₄ solution and the mixtures were stirred for 6 h at room temperature to afford zero-valent CuNP-loaded glycodendrimer (**11-Cu⁰**) and AgNP-loaded glycodendrimer (**11-Ag⁰**). Metals zero-valent were obtained by reduction with NaBH₄ in similar conditions as described by Noori et al. (Noori *et al.*, 2021) with the identification of zero-valent metals by XPS spectroscopy.

Effect of glycodendrimers on ETEC proliferation. Enterotoxigenic *E. coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) 1×10^7 CFU/mL were treated with various concentrations of metal-glycodendrimers (0–0.075 mg/mL of broth) loaded or not with metal nanoparticles. For the negative control, the ETEC:F4 bacteria were treated with Luria–Bertani (LB) broth from Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA). The samples at a final volume of 10 mL were incubated for 24 h at 37 °C, 100 RPM and the optical density at 600 nm (OD_{600nm}) was measured in a polystyrene cuvette of 10 mm path length by Biochrom Libra S50 UV-Vis spectrophotometer (Biochrom US, Holliston, MA, USA). The bactericidal activity of metal-glycodendrimers was also evaluated by inhibition zone diameter of 1 mg powder of glycodendrimers on LB agar Petri dishes, previously inoculated with ETEC:F4. The disc images were acquired after 24 h incubation at 37 °C, analyzed by ImageJ2 software (version 2, Madison, WI, USA) and the diameters of the inhibition zones were reported in centimeters.

Quantification of protein released by ETEC:F4 treated with metal-loaded glycodendrimers for 24 h at 100 RPM. In order to understand the metallo-glycodendrimers mechanisms on ETEC:F4 death, proteins, DNA, RNA and oligonucleotides released from bacteria were measured in the LB broth. A volume of 5

mL was taken from the mixture of bacteria previously incubated with corresponding glycodendrimers for 24 h. The sample was centrifugated at 800 RPM $\times$ 10 min at 4 °C, and the supernatant was collected to quantify bacteria-released contents. The Bradford method (Bradford, 1976) was used to assay proteins contained in the supernatant by absorbance measurement at 595 nm.

DNA, RNA and oligonucleotide assay. A volume of 0.5 mL of the supernatant collected from bacteria culture centrifugation (800 RPM $\times$ 10 min at 4 °C) was transferred to spin columns (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada) inserted into a 2 mL Eppendorf used as a collection tube and centrifuged at 6000 $\times$ g for 2 min at 4 °C according to the protocols of nucleic acids separation of the manufacturer. The centrifugation rounds were repeated three times. For each round, new spin columns and new Eppendorf vials are used to collect the elution solutions. The DNA, RNA and oligonucleotide concentrations were acquired by NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada) based on the 260/280 or 260/230 ratios following the protocols of the manufacturer.

Biofilm assay. ETEC was identified as a biofilm-forming species. Biofilm is a critical factor for microbial survival and antibiotic resistance. ETEC:F4 biofilm formation was followed in polystyrene 96-well plates. Bacteria, at a concentration of 10^7 CFU/mL treated or not with glycodendrimer-based materials 0.005 mg/mL (a concentration close to the IC₅₀ of less toxic glycodendrimeric materials), were grown at 37 °C for 24 h in Luria–Bertani broth. After incubation, bacteria were gently washed three times with 200 μ L of PBS in order to remove non-adhered bacteria. The attached bacteria, representing the matrix components of biofilm, were stained with 100 μ L of a 0.1% solution of crystal violet for 30 min at room temperature, according to Mintzer et al.'s protocol (Mintzer *et al.*, 2012). Crystal violet salt was then solubilized by the addition of 30% glacial acetic acid and incubated at room temperature for 10–15 min. The absorbance was measured by a Biochrom EZ Read 800 microplate reader (Biochrom

US, Holliston, MA, USA) at 570 nm, and data were reported as mean $\pm$ standard deviation. All experiments were repeated three times.

3.5 Results and Discussion

The glycodendrimer was conceived as based on antibacterial constituent elements exhibiting inner antibacterial activity. Thus, gallic acid, which is a natural polyphenol that is found in plants, was chosen for the synthesis route of the glycodendrimer core. Gallic acid is known to have strong antibacterial properties on its own and can affect irreversibly the *E. coli* membrane (Li, K. *et al.*, 2019). Additionally, mannose was also chosen because it has been well established that *E. coli* possesses a carbohydrate-binding protein at the tip of their pili associated with FimH, which recognizes α -D-mannopyranoside glycoconjugates on the host cell membranes (Mousavifar *et al.*, 2018). Hence, mannoside NPs can be envisaged as targeting devices. Therefore, combining the above two components into a single entity presented into a multivalent architecture (mannosylated glycodendrimer) was hypothesized to greatly enhance fighting *E. coli* bacterial infections.

3.5.1 Synthesis of the Core structure

The propargylated core structure was built from pentaerythritol and a propargylated gallic acid derivative (Scheme 1). First, methyl gallate (**2**) (Zhang, S. et Zhao, 2011) was obtained from the 3,4,5-trihydroxybenzoic by using Fischer esterification in order to protect the acid functionality. Then, the methyl ester was functionalized with alkyne groups in the periphery, and the propargylation reaction, including phenol groups, led to compound **3**. Then, the obtained compound **3** was treated with aqueous KOH to hydrolyze the ester and give the compound **4** (3,4,5-tris(propargyloxy)benzoic acid)(Scheme 1) (Sharma *et al.*, 2014).

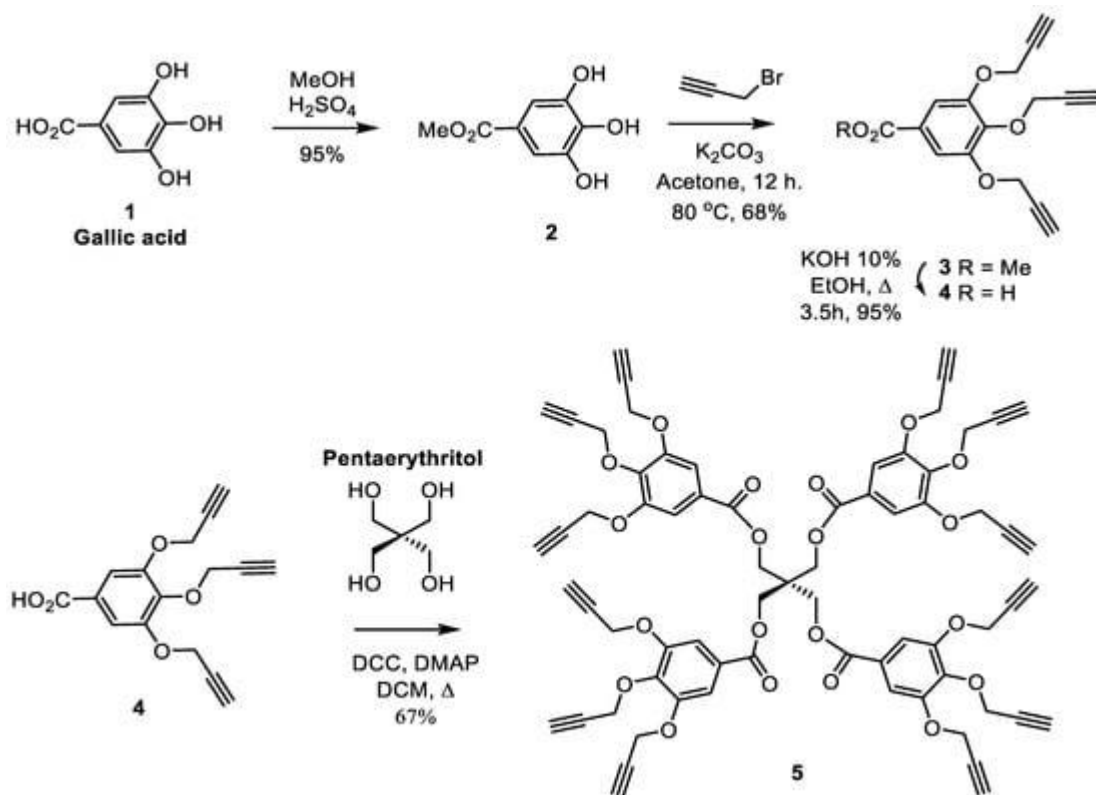


Figure 3.1 Synthesis of the key dendritic pentaerythritol scaffold harboring four gallic acid residues covered with 12 propargyl functions used for the preparation of multivalent mannosylated dendrimer by a copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC).

A dendrimer scaffold harboring 12 propargyl groups was chosen in order to allow a first generation with 12 mannoses on the glycodendrimer periphery, so 48 hydroxyl groups only for generation 1, which is remarkable given that the comparable number of hydroxyl groups is generally obtained from higher generations for commercial poly(amidoamine) dendrimers (Sharma *et al.*, 2021). The propargylated gallic acid (**4**) was reacted according to the Steglich reaction with pentaerythritol using DCC as a coupling agent and Dimethyl aminopyridine (DMAP) as a nucleophile to afford the

tetravalent glycodendrimer core (**5**) by esterification coupling. According to the literature, the Steglich reaction (Neises et Steglich, 1978) carried out at room temperature is known to take several days. The ^1H -NMR confirmed the presence of the propargylic protons at around 2.5 ppm, and the product was confirmed by ^{13}C -NMR.

3.5.2 Synthesis of the Carbohydrate for Core Branching

For the sugar moiety, our approach aimed to synthesize an ethylene glycol linker using triethylene glycol: a Food and Drug Administration (FDA)-approved agent. A monotosylation of triethylene glycol was carried out under cold conditions to obtain the desired product without any by-product. The D-mannose was also treated with acetic anhydride in pyridine for the acetylation of the mannose hydroxyl groups to afford the 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α/β -D-mannopyranose (**7**) which was glycosylated with triethylethylene glycol p-toluenesulfonate (**6**) using Lewis acid ($\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$) to give the 2-(2-(2-(2-Tosyloxy-ethoxy)-ethoxy)-ethyl)2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside (**8**). Finally, by carrying out a nucleophilic substitution, the tosylate group of compound **8** was converted into an azide group present at the focal point of our linker. ^1H -NMR showed the disappearance of the aromatic protons of the tosylate group at 7.77 and 7.32 ppm, as expected.

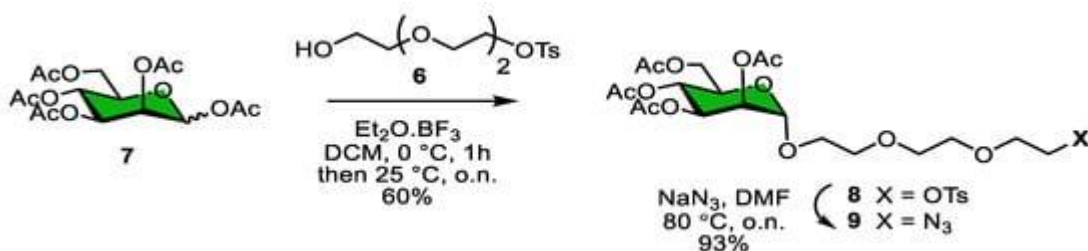


Figure 3.2 Synthesis of the peracetylated mannosylated azide precursor **9**.

3.5.3 Synthesis of Mannosylated Glycodendrimer

The Copper-assisted Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC), according to Sharpless *et al.* (Li, K. *et al.*, 2019; Rostovtsev *et al.*, 2002) is known to be efficient, simple, selective and frequently used in dendrimer synthesis.

The ^1H -NMR of 10 gives some indications of the reaction accomplishment. First, the disappearance of the two asymmetrical propargyl proton peaks at δ 2.61 ppm and δ 2.47 ppm, as well as the appearance of the triazole peaks at δ 8.01 and δ 7.99 ppm, unambiguously confirmed the completion of the click reaction (Figure 3.10). The ^1H -NMR analysis was also supported by ^{13}C -NMR (Figure 3.11). The deprotection of the peracetylated glycodendrimer 10 (Scheme 3) was carried out under mild Zemplén trans-esterification conditions (NaOMe, MeOH, pH 8.5), which allowed maintaining the inner (protected) gallate esters. The whole disappearance of the acetate peaks (144 protons) in the ^1H -NMR spectra of the resulting mannodendrimer 11 (Scheme 3) appeared between δ 1.9 and 2.2 ppm (Figure 3.12). The unprotected glycodendrimer (11) identified by ^{13}C -NMR (Figure 3.13) spectra confirmed the completion of the reaction.

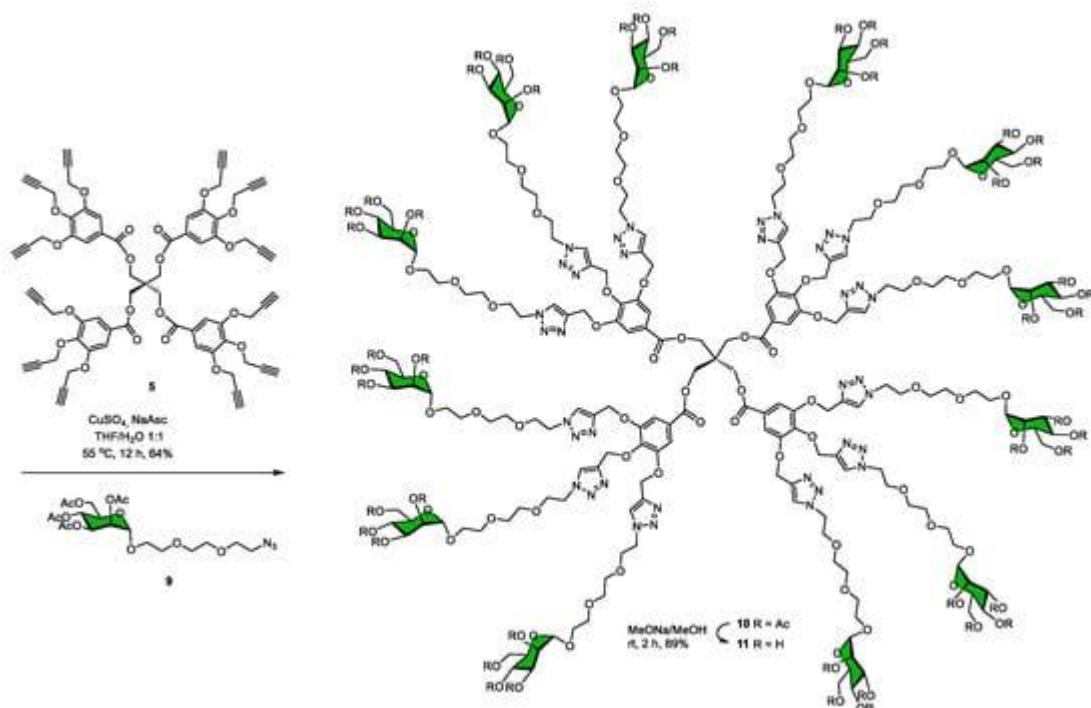


Figure 3.3 Synthesis of mannosylated glycodendrimer **11** which is endowed with 12 α -D-mannopyranoside residues at the periphery. The synthesis was accomplished according to the well-established “click chemistry” (CuAAC) between the propargylated core **5** and the mannosylated sugar azide **9**, followed by a selective Zemplén reaction.

3.5.4 Characterization of Nanoparticles of Cu- and Ag-Loaded Glycodendrimers

The relevant antibacterial properties of zero-valent copper and silver nanoparticles hosted by biopolymers are already documented (Noori *et al.*, 2021) and these zero-valent metals were used in this project to increase the antibacterial activity of the glycodendrimers. The metal ions from $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ and AgNO_3 were first uniformly distributed in the dendrimeric dispersion and then reduced with NaBH_4 to generate the corresponding zero-valent metals, homogeneously entrapped by glycodendrimers. A

DLS study of metal-glycodendrimeric materials showed particle sizes smaller than 100 nm for the metal-loaded glycodendrimers. The medium size for the D:Cu was slightly lower (41–64 nm) than for the D:Ag (61–80 nm), whereas the medium size of unloaded glycodendrimers (D) was 64–65 nm, suggesting no major impact of metal loading on the size of dendrimers. In addition, polydispersity indexes of 0.42 ± 0.03 , 0.47 ± 0.03 and 0.33 ± 0.01 were obtained for D, D:Cu and D:Ag, respectively.

3.5.5 Bactericidal Activity of Metal-Glycodendrimers

The enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) was selected to evaluate the bactericidal effect of zero-valent metal entrapment in glycodendrimers. The decrease in ETEC survival measured by optical density at 600 nm was inversely proportional to the increase in glycodendrimer concentrations (Figure 3.4). The minimal inhibitory concentrations (MIC) were 2.0, 1.5 and 1.0×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ for glycodendrimers (D), glycodendrimers loaded with copper (D:Cu) and glycodendrimers loaded with silver (D:Ag), respectively. These values were markedly lower (10–1000 folds) than MIC of anti-ETEC:F4 agents used in veterinary and human medicine. In the same way, the half inhibitory concentrations of bacteria growth (IC_{50}) were 4.5×10^1 , 3.5×10^1 and 1.0×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ for D, D:Cu and D:Ag, respectively (Figure 3.5, inserted table). These data support our hypothesis that the addition of mannose (antimicrobial carbohydrate) as terminal groups and the loading of glycodendrimers by zero-valent copper and silver nanoparticles, inhibited the ETEC:F4 proliferation and enhanced the bactericidal activity of designed dendrimer, with the highest activity for silver zero loaded glycodendrimers (Table S1).

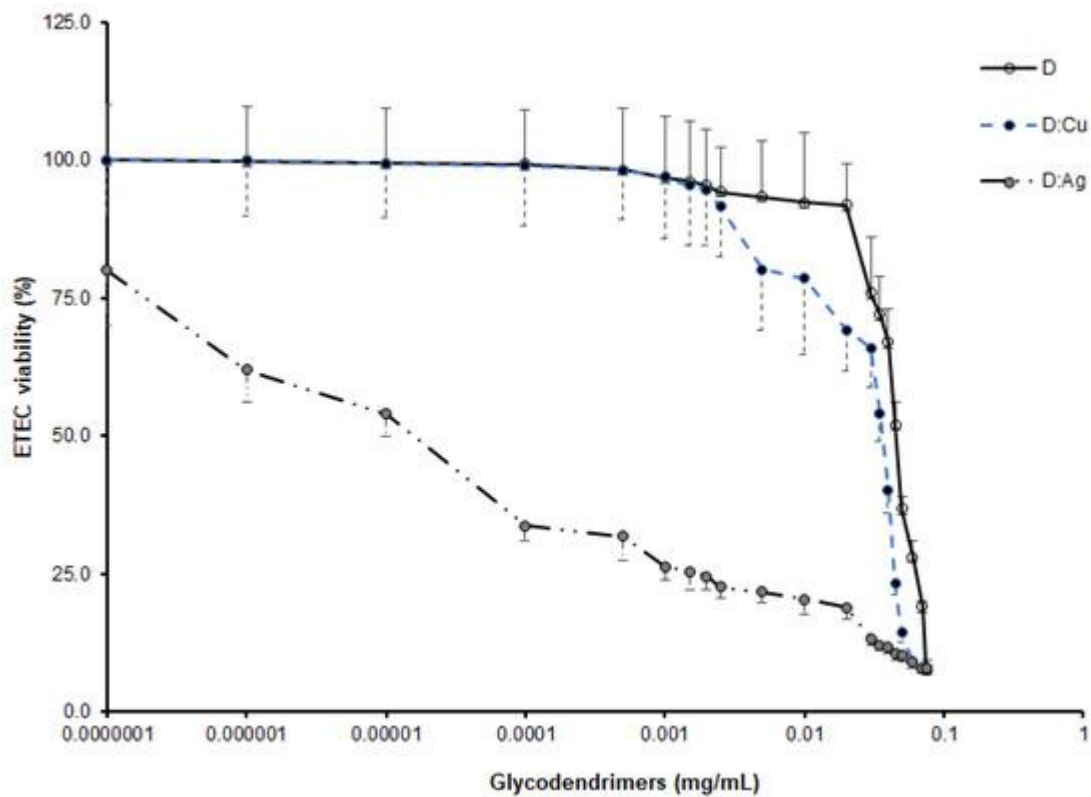


Figure 3.4 Effect of metal-glycodendrimers on ETEC:F4 bacteria. Evaluation by OD at 600 nm of survival of enterotoxigenic *E. coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) from LB broth

containing glycodendrimer-based compounds at different concentrations. Data are triplicate of three different experiments and are represented by mean $\pm$ SD.

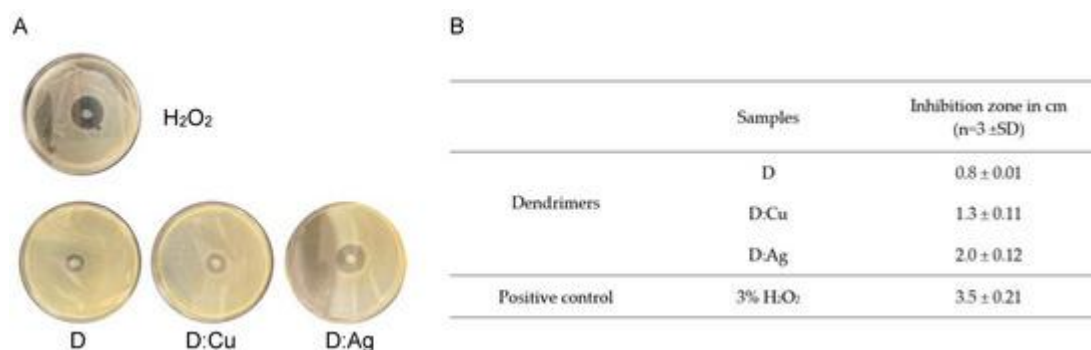


Figure 3.5 (A) Diffusimetric profile of the Anti-ETEC:F4 materials. Effect of glycodendrimer (D), of glycodendrimer complexed with copper (D:Cu) and of glycodendrimer complexed with silver (D:Ag) was evaluated on agar-LB gel. A solution of 3% H₂O₂ was used as a positive control. (B) Average diffusion diameters as growth inhibition of bacteria induced by 1 mg of glycodendrimer-based materials and by 10 μ L of 3% H₂O₂. The experiments were repeated three times, and data represented mean $\pm$ SD.

The inhibition of ETEC:F4 bacteria proliferation at metal glycodendrimer-dependent concentrations correlated with the inhibition diameters confirmed the bactericidal activity of glycodendrimeric materials loaded or not with zero-valent metal (Table S1). Additional experiments were conducted with Phosphomycin, Gentamycin and Kanamycin and compared with our unloaded (D) and metal-loaded mannodendrimers (D:Cu⁰, D:Ag⁰). The choice of Phosphomycin, Gentamycin and Kanamycin was based on the fact that these antibiotics are currently used to treat enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). The results expressed as diffusion diameters showed our materials D:Ag with a moderately higher bactericidal efficacy than those of Phosphomycin and

Gentamycin and comparable with that of Kanamycin. Differently, the D and D:Cu materials presented a lower bactericidal efficacy (Table 3.1).

At concentrations of 10 mM and higher, H₂O₂ may react with DNA and other macromolecules of bacteria and generate the highly reactive and damaging hydroxyl radical (HO•) via the Fenton reaction (Uhl et Dukan, 2016). The choice of 3% H₂O₂ (~1M) as positive control is based on the fact that, at this much higher concentration (around 100 times greater than that mentioned as cytotoxic), it is currently used as a disinfectant in slaughterhouses and for farm equipment due to its potential to kill all kinds of cells (Mahaseth et Kuzminov, 2017; Rutala et Weber, 2010) including *E. coli* (Flores *et al.*, 2012; Uhl et Dukan, 2016; Uhl *et al.*, 2015).

A common mechanism of antibacterial agents is the disruption of bacterial walls or the modification of nucleotidic contents. In order to confirm the metal glycodendrimer action on the loss of integrity of bacteria wall, the proteins released in the LB broth from ETEC:F4 treated or not with various concentrations of metal-glycodendrimer (0–0.03 mg/mL) for 24 h was assayed by Bradford method (Bradford, 1976) based on the absorbance measurement at 595 nm, whereas DNA, RNA and oligonucleotide concentrations were acquired according to the protocol of the nanodrop spectrophotometer manufacturer.

To quantify released proteins (Figure 3.6 A), DNA (Figure 3.6 B), RNA (Figure 3.6 C) and oligonucleotides (Figure 3.6 D), the ETEC:F4 (1×10^7 CFU/mL) was treated with various concentrations (0–0.03 mg/mL) of glycodendrimer-based materials. It was found that the bacterial cytoplasmic content increases in LB broth with the concentration of glycodendrimeric materials (Figure 3.6), confirming a loss of integrity of ETEC:F4 membrane during the treatment and the bactericidal activity of glycodendrimers (D), copper-loaded glycodendrimers (D:Cu) and silver-loaded glycodendrimers (D:Ag).

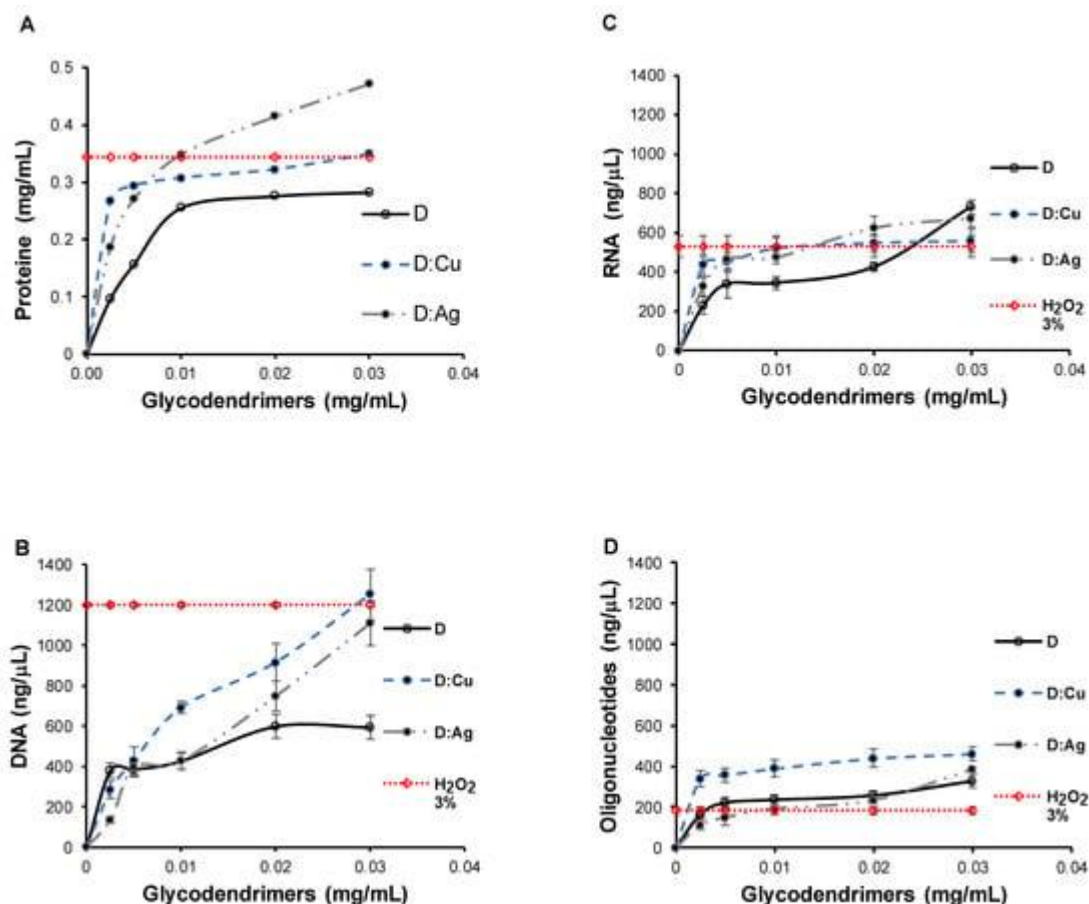


Figure 3.6 Quantification of released bioactive ETEC:F4 contents. Bacteria were treated with D, D:Cu, D:Ag or with 3% H₂O₂ (added in the absence of glycodendrimeric materials). The quantification of protein (**A**) was carried out by the Bradford method, whereas DNA (**B**), RNA (**C**) and oligonucleotides (**D**) concentrations were acquired by the protocol of the manufacturer of NanoDrop spectrophotometer ($n = 3$, mean $\pm$ SD).

Supposing a loss of ETEC membrane integrity, the treatment with D, D:Cu and D:Ag generated an increase in protein concentration in LB broth, but this was not proportional to the increasing concentrations of glycodendrimeric materials. The plot obtained from the releasing of proteins versus the concentration of the glycodendrimers (0–0.03 mg/mL) represented two phases: the first one faster, with a high slope,

correlated with a higher amount of ETEC:F4 in the LB broth and with an unstable rate of protein release from bacteria, and the second slower phase, with a low or moderately low slope, which might be related to protein release at a stable rate.

Coomassie brilliant blue R250 contains two negatively charged sulphated groups, able to establish electrostatic interactions with cationic amino acids of proteins. No metal-dependent interference was found between Coomassie R250 dye with $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ and AgNO_3 salts, or with copper- and silver-loaded glycodendrimers. So, proteins were accurately detected in the broth and were from bacteria.

The values of bioactive agents obtained with the 3% H_2O_2 positive control were constant for each sample due to the identical concentration. Supposing that each of the three glycodendrimers might disrupt the ETEC wall and liberate its content into the LB broth, the bactericidal effects of each glycodendrimer were also evaluated by assays of released DNA, RNA and oligonucleotides. Among the investigated agents, D:Ag appeared, as expected, to be the most bactericidal material. In opposite to our attempts, the DNA and oligonucleotides released from bacteria cytosol by D:Ag treatment was the lowest, suggesting interactions between D:Ag and DNA and between D:Ag and oligonucleotides as observed with many antibacterial agents able to interact and modify nucleic acids and oligonucleotides of bacteria (Sneideris *et al.*, 2023).

The capacity to form biofilm was investigated and compared between the different glycodendrimeric materials using the crystal violet method indirectly related to the presence of colored solution with absorbency at 570 nm. Treatment of bacteria with 0.005 mg/mL D, D:Cu and D:Ag inhibited the capacity to form the biofilm in comparison to the untreated ETEC:F4 (Figure 3.6 and Figure 3.14). The absorbency resulting from the reaction of crystal violet and the biofilm generated by bacteria grown with D, D:Cu and D:Ag was substantially reduced by approximately 20, 30 and 70%, respectively, when compared to the untreated (blank), considered as 100%.

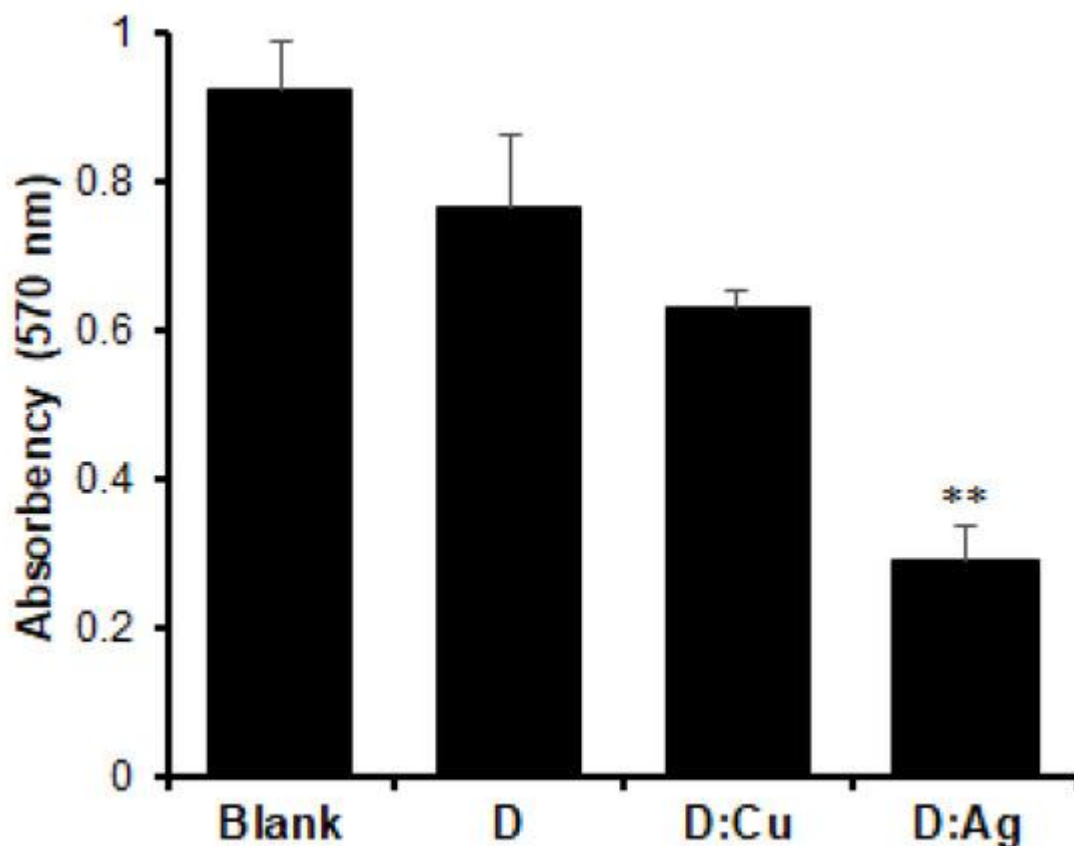


Figure 3.7 Metal-glycodendrimers inhibit the formation of biofilm by enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) was treated with 0.005 mg/mL of glycodendrimer (D), glycodendrimer loaded with copper (D:Cu) and glycodendrimer loaded with silver (D:Ag). The biofilm formation assayed by crystal violet colorimetry decreased at treatment with metal glycodendrimers. The untreated bacteria were representative of the blank. (n = 3, mean $\pm$ SD). ** $p < 0.001$.

These results corroborated those obtained for bactericidal activity assay (Figure 3.4), suggesting that D, D:Cu and D:Ag might inhibit the bacteria-to-bacteria interaction, interfere with bacteria information transmission, promote bacteria aggregation or prevent adhesion of bacteria to the surface of the well plate (Ficerman *et al.*, 2022; Villanueva-Flores *et al.*, 2020; Zajac *et al.*, 2023).

3.6 Conclusions

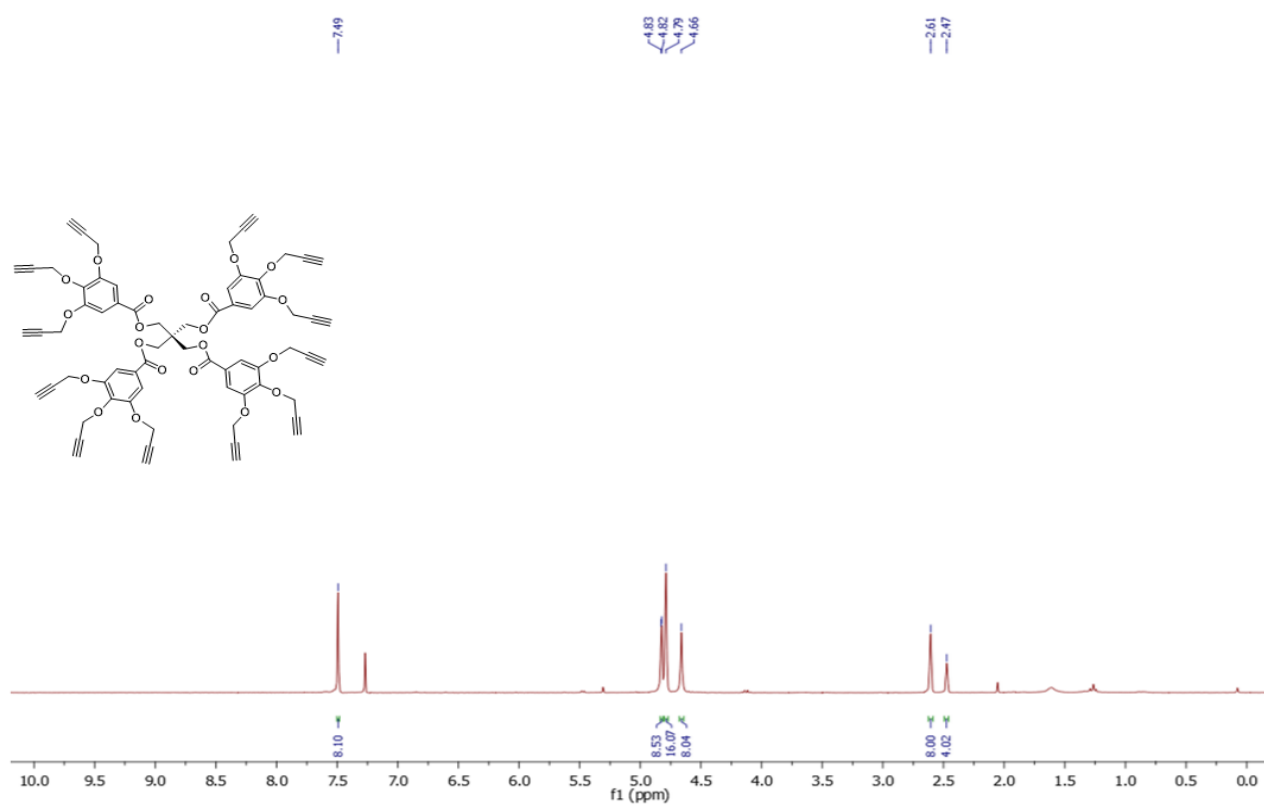
This report showed the bactericidal activity of metal glycodendrimers formed with gallic acid in the core and containing mannose as the carbohydrate-reactive terminal group. This glycodendrimeric material can host zero-valent metals (Cu^0 and Ag^0) and appears as a potent antibacterial candidate. More precisely, this type of glycodendrimer showed activity against enterotoxigenic *E. coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) bacteria with MIC lower than those of several common antibiotics. The entrapment of zero-valent metal increased the bactericidal effect of glycodendrimeric materials, and the Ag-loaded glycodendrimer (D:Ag) was the most potent bactericidal agent compared to Cu-loaded glycodendrimer (D:Cu) and metal-free glycodendrimer (D). These results show the synthesized glycodendrimeric materials as new bactericidal agents against Gram-negative bacteria such as enterotoxigenic *E. coli* Fimbriae 4. The bactericidal activity could be explained by bacteria wall disruption and by the release of bacteria content in the culture broth. In addition, D, D:Cu and D:Ag were able to inhibit the ETEC:F4 capacity to form biofilm. The bactericidal effects of D:Ag were higher than those of phosphomycin and gentamycin, currently used antibiotics.

3.7 Acknowledgments

This research was funded by NSERC/CRSNG, grant number 06912, to Pr. M. A. Mateescu and New Initiatives Grant from Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) to Y. Chorfi and M. A. Mateescu.

The FRQNT postdoctoral fellowship granted to A. Tchoumi Neree and a CRIPA-FRQNT Ph.D. studentship to A. El Riz are gratefully acknowledged. Also acknowledged is the generous gift of Enterotoxigenic *E. coli* Fimbriae 4 (NCBI ID: txid316401) from J. Fairbrother (Veterinary Medicine Faculty, Université de Montréal).

3.8 Supplementary data

Figure 3.8 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 5

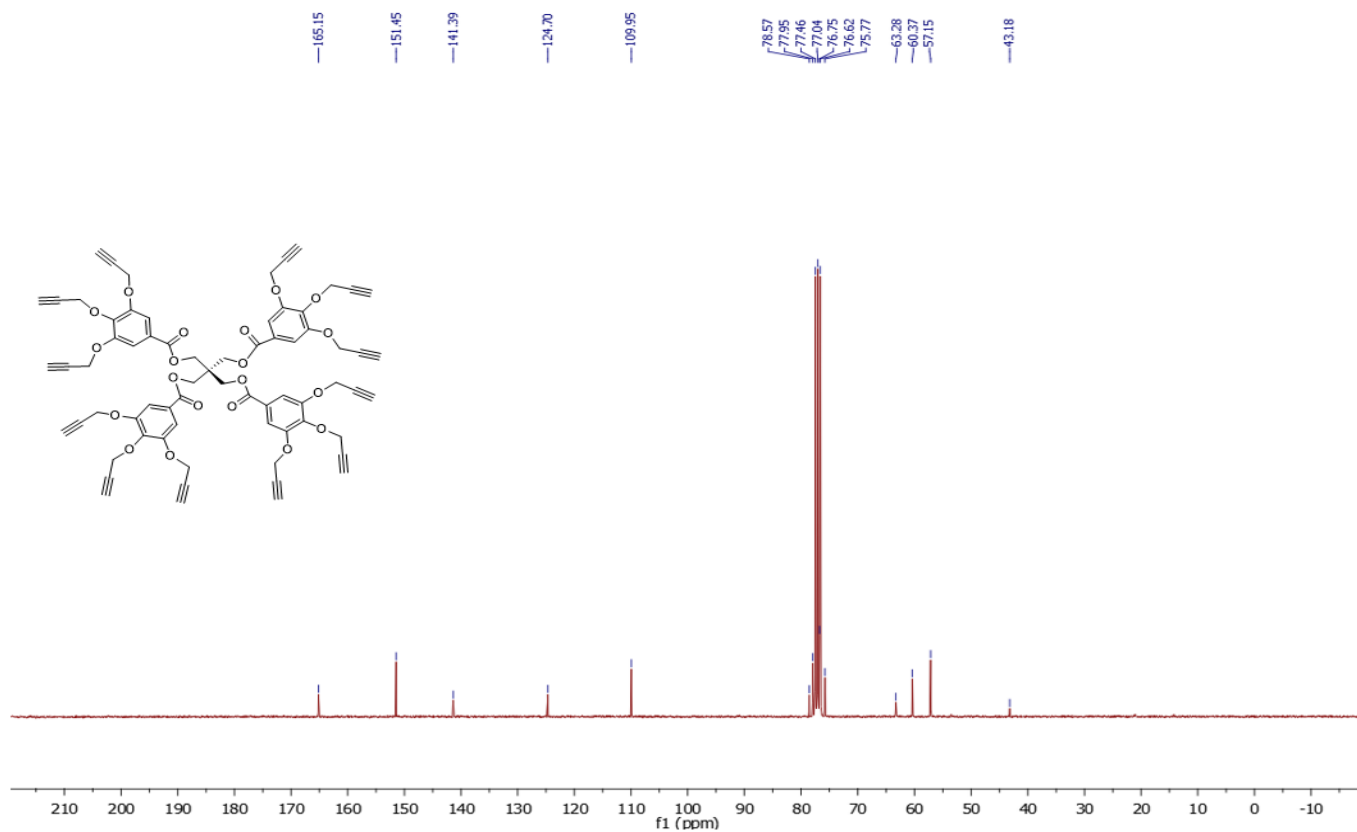


Figure 3.9 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 5

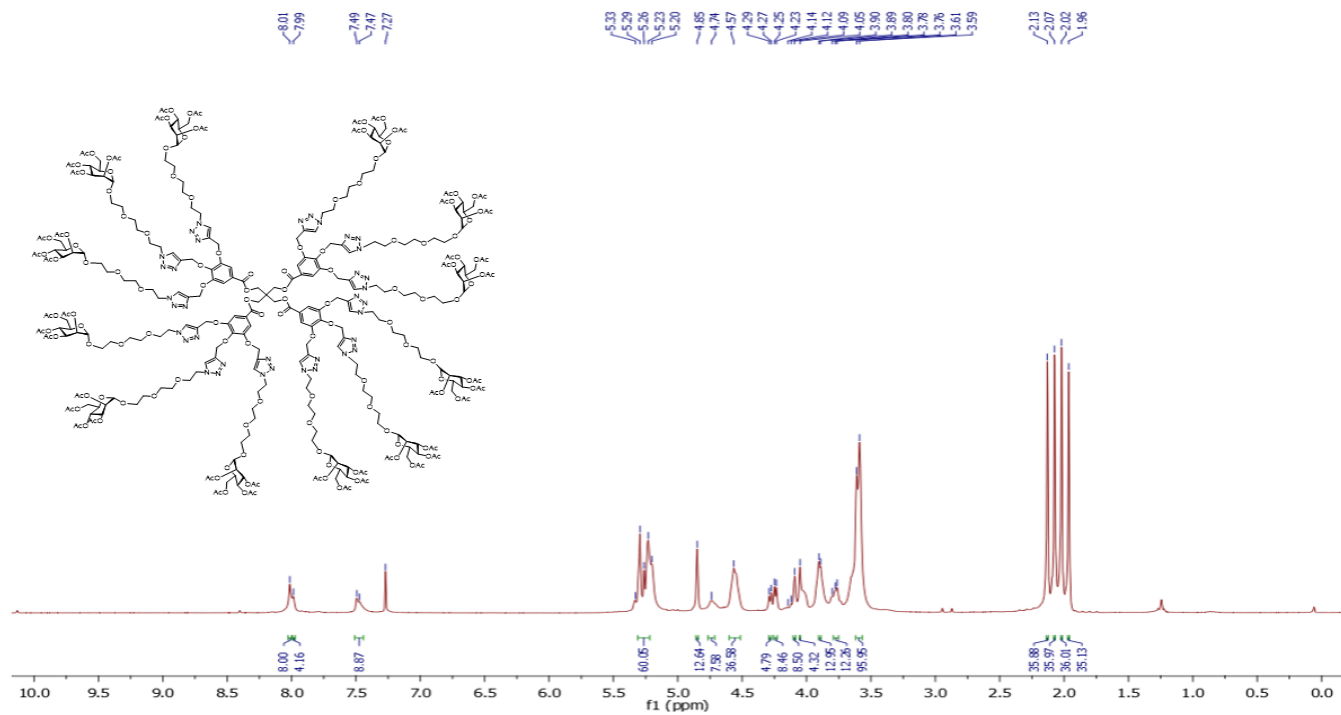


Figure 3.10 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 10

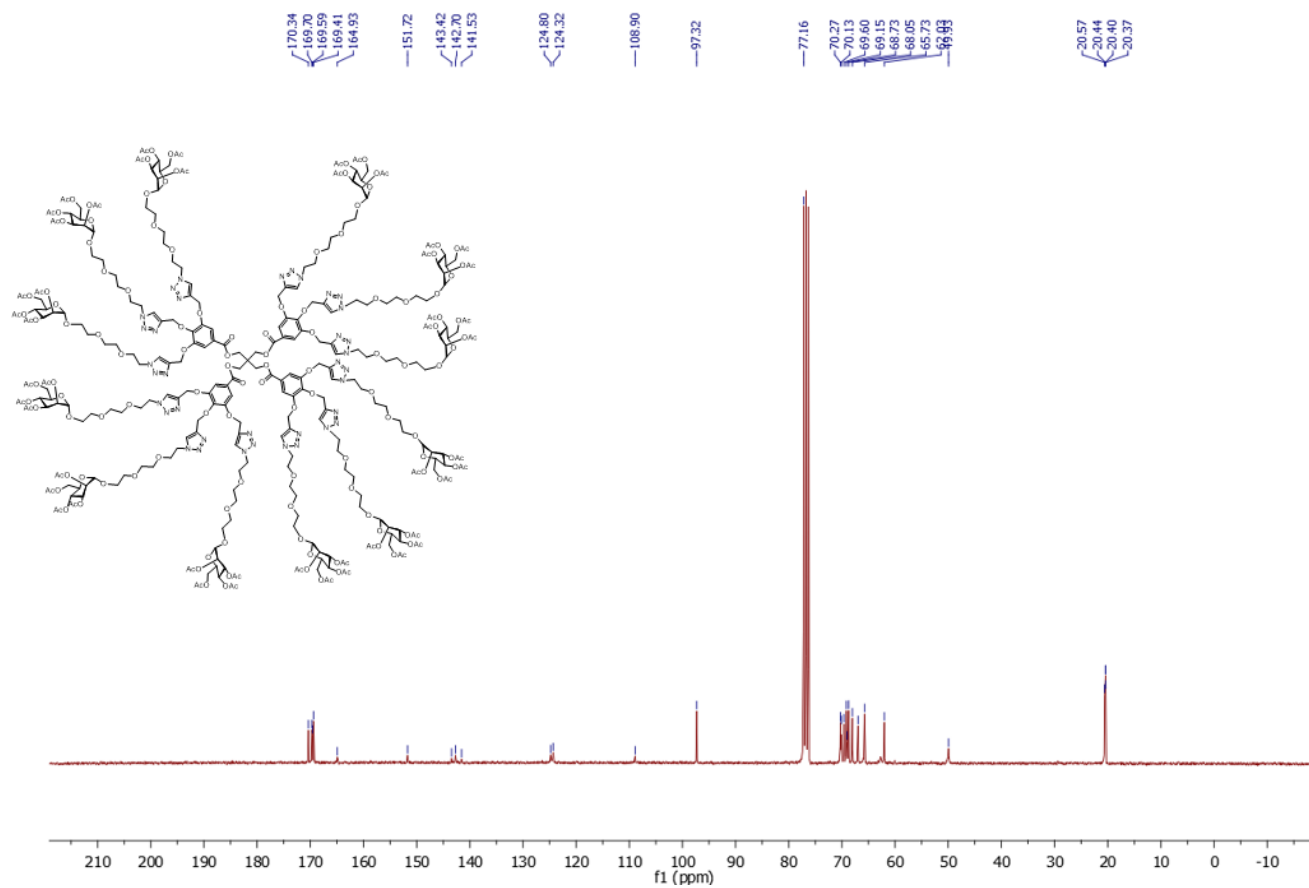


Figure 3.11 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 10

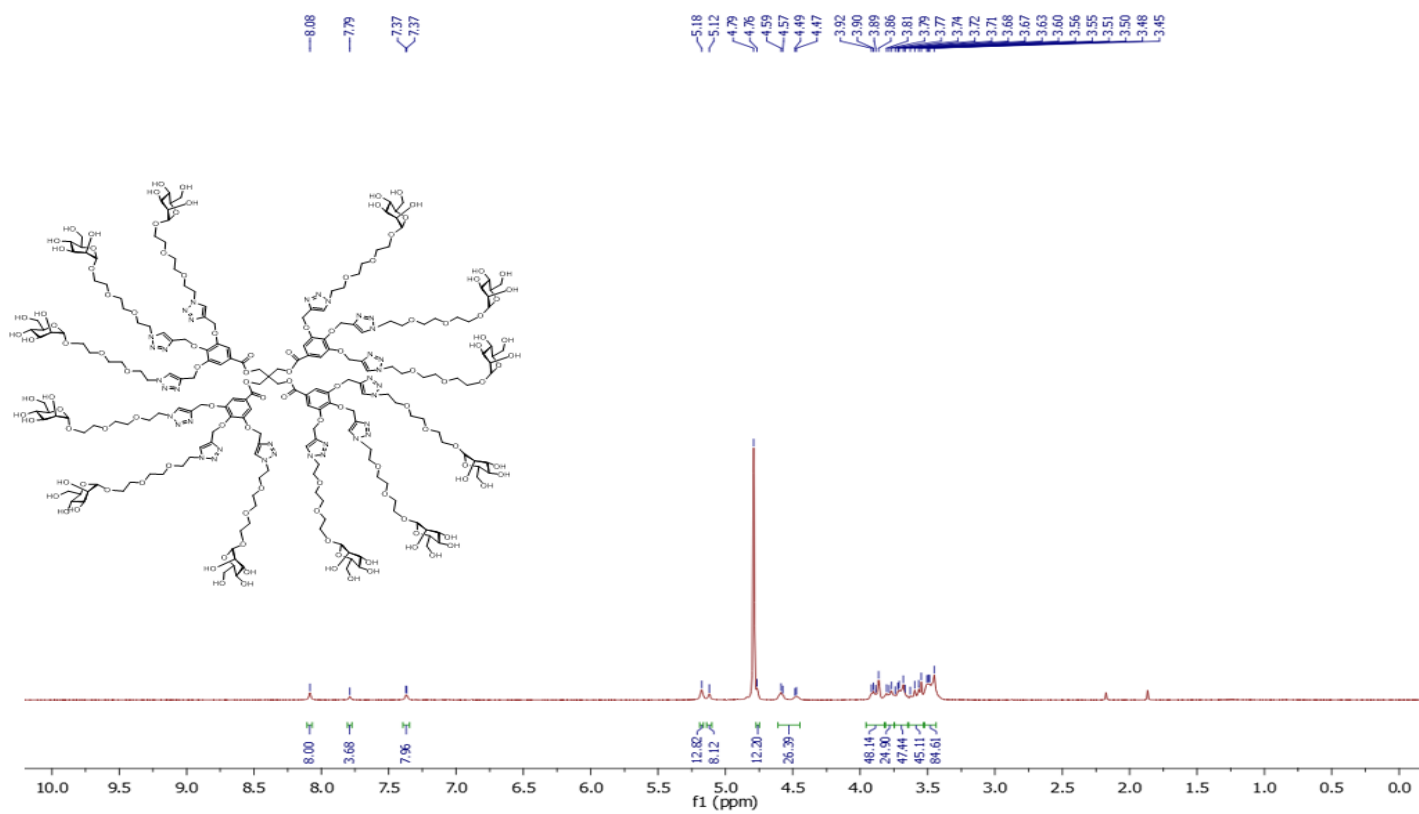


Figure 3.12 ^1H NMR (300 MHz, D_2O) of compound 11

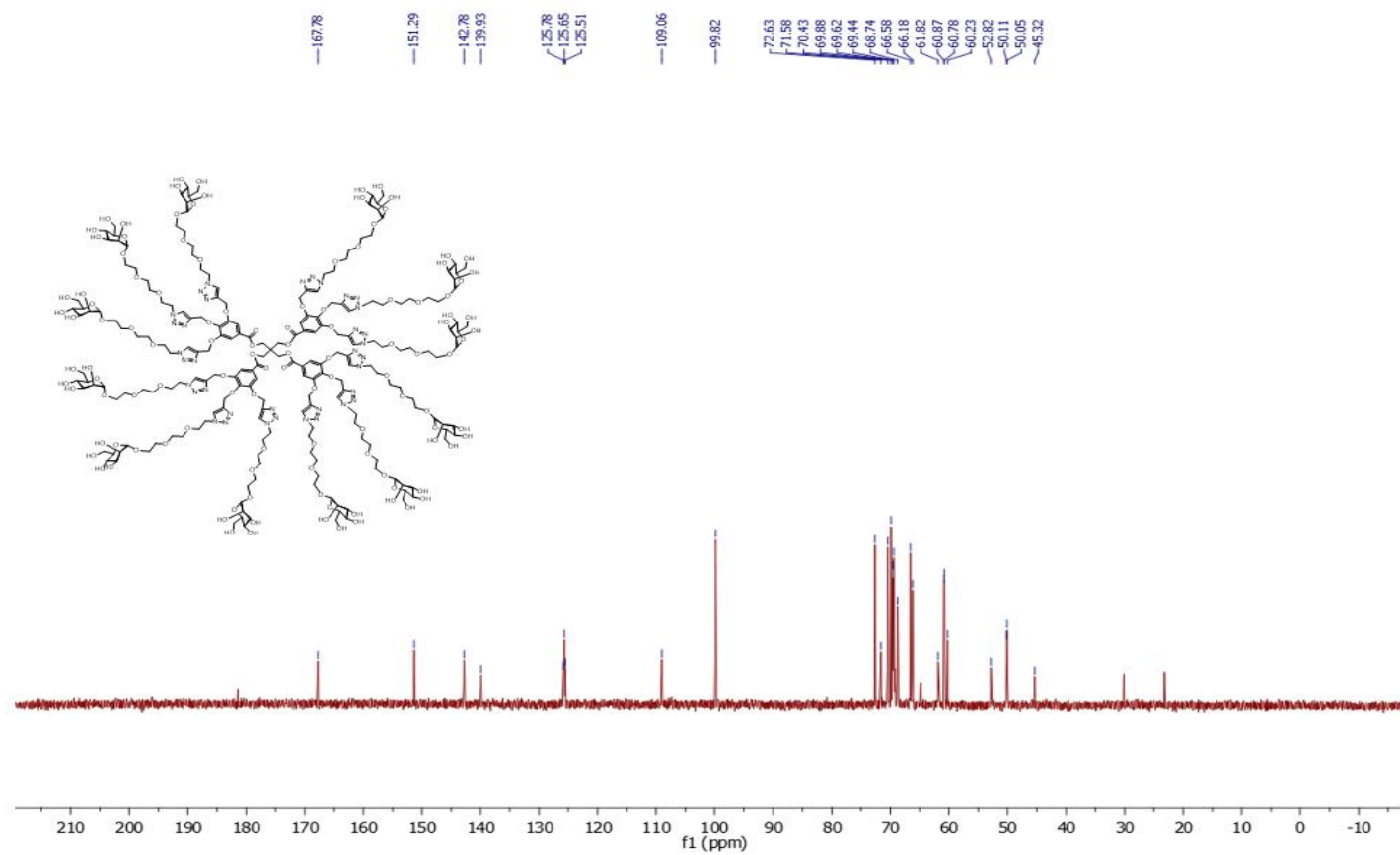


Figure 3.13 ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) of compound 11

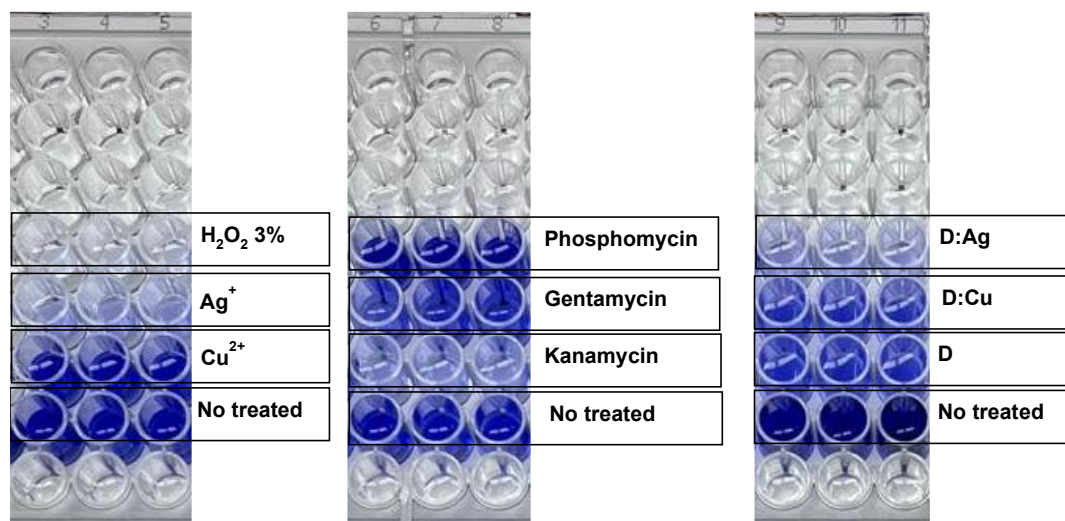


Figure 3.14 Biofilm production capabilities of *E. coli* enterotoxigenic fimbriae 4 (ETEC:F4) in the absence or presence of bactericidal agents by crystal violet Assay.

Table 3-1 Antibiotics effect on ETEC:F4

Materials		Inhibition zone (cm)
Dendrimers	D	1.10 ± 0.14
	D:Cu	1.11 ± 0.15
	D:Ag	2.25 ± 0.25
Current used bactericidal agents	Gentamycin	1.02 ± 0.18
	Phosphomycin	1.04 ± 0.18
	Kanamycin	2.18 ± 0.19
Metal ions	Cu²⁺	1.35 ± 0.12
	Ag⁺	1.35 ± 0.12
Components of dendrimer synthesis	Gallic acid	0.78 ± 0.05
	mannose	0.98 ± 0.13
Positive control	H₂O₂	3.15 ± 0.21

Average diffusion diameters as growth inhibition of bacteria induced by 1 mg of dendrimeric materials, of current antibacterial agents usually used and of 10 µL of 3% H₂O₂

CHAPITRE 4

AMPHIPHILIC METALLO-DENDRIMERIC MATERIALS WITH
ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Aly El Riz, Armelle Tchoumi Neree, René Roy, Younes Chorfi and Mircea Alexandru Mateescu

Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Succ. Centre-Ville, P.O. Box 8888, Montréal, QC H3C 3P8, Canada

Department of Veterinary Biomedicine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA), Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

Cet article est en préparation pour la soumission dans le journal *Molecules*

4.1 Résumé

La résistance aux antibiotiques représente une menace majeure pour la santé publique mondiale, rendant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques crucial. Les dendrimères amphiphiles, composés d'une chaîne lipidique hydrophobe et d'une partie hydrophile, ont été greffés avec des ions métalliques tels que l'argent (Ag^+) et le cuivre (Cu^{2+}), ainsi que leurs formes à zéro valence (Ag^0 et Cu^0). Cette approche offre une alternative prometteuse aux traitements antibiotiques traditionnels, avec l'avantage de réduire la toxicité pour les cellules humaines tout en maintenant une forte activité antibactérienne. L'intégration de ces métaux dans les dendrimères amphiphiles permet la libération d'ions métalliques actifs en réponse à des changements dans l'environnement biologique, optimisant ainsi l'efficacité antimicrobienne contre les bactéries sensibles et résistantes. L'objectif de cette étude était d'exploiter ces propriétés afin d'améliorer l'activité antibactérienne tout en minimisant l'impact toxique sur les cellules humaines.

Mots-clés : Activité bactéricide ; fimbriae d'*Escherichia coli* entérotoxigène 4 (ETEC:F4) ; dendrimères amphiphiles ; métallo-dendrimères chargés au cuivre (D:Cu) ; métallo-dendrimères chargés à l'argent (D:Ag).

4.2 Abstract

Antibiotic resistance is a major threat to global public health, making the development of new therapeutic strategies crucial. Amphiphilic dendrimers, composed of a lipidic chain and a lipidic hydrophilic part, were grafted with metal ions such as silver (Ag^+) and copper (Cu^{2+}), as well as with their zero-valent forms (Ag^0 and Cu^0). This approach offers a promising alternative to traditional antibiotic treatments, with the advantage of reducing toxicity to human cells while maintaining high antibacterial activity. The integration of these metals in amphiphilic dendrimers allows for the release of active metal ions in response to changes in the biological environment, thus optimizing antimicrobial efficacy against both sensitive and resistant bacteria. The aim of this study was to exploit these properties to improve antibacterial activity while minimizing the toxic impact on human cells.

Keywords: Bactericidal activity; enterotoxigenic *E. coli* fimbriae 4 (ETEC:F4); amphiphilic dendrimers; copper-loaded metallo-dendrimers (D:Cu); silver-loaded metallo-dendrimers (D:Ag).

4.3 Introduction

In recent decades, a high number of cases of antibacterial resistance have been reported and millions of deaths have been associated with this scourge that affects not only humans but also animals (Urban-Chmiel et al., 2022). This phenomenon caused by the inappropriate and excessive use of antibiotics (Blair et al., 2015) opens the door to the design of new antibacterial drugs with high efficacy and that do not induce resistance. It is therefore crucial to explore new technologies as alternatives to conventional antibiotic treatments. In this project, we have proposed new materials based on amphiphilic dendrimers. Dendrimers are synthetic polymers with macromolecular architectures (Kesharwani, 2022) and predictable molecular weight (Oliveira et al.,

2010) organized with a central core surrounded by ramifications that end in reactive groups. The branched structure, as well as the presence of internal cavities, allow dendrimers to be used as carriers of bioactive agents such as drugs or metal ions. Bioactive molecules, with diverse properties (cationic, anionic, polar, and non-polar), can be grafted to the periphery of dendrimers, via terminal groups capable of interacting with therapeutic molecules such as drugs, or with biomolecules like DNA, proteins, carbohydrates, and metals, depending on the intended biological applications. Although classical dendrimers have various properties, some of these macromolecules have certain handicaps such as high cytotoxicity, even at low concentrations (Janaszewska et al., 2019). To remedy this phenomenon, amphiphilic dendrimers that are dendritic structures of lower molecular weight and have both a hydrophobic and hydrophilic character have emerged (Márquez-Miranda et al., 2016). The synthesis of amphiphilic dendrimers allowed the optimization of the hydrophobic-hydrophilic balance which resulted in the achievement of high antibacterial activity and the reduction of adverse effects as well as drug resistance (Galanakou et al., 2023). The amphiphilic dendrimers utilized in this study are characterized by their dual structural components: a lipidic hydrophobic chain and a lipophilic part. The lipidic hydrophobic chain refers to the nonpolar, water-repellent segment, often derived from fatty acid chains or similar hydrophobic molecules, which contributes to the ability of dendrimers to interact with lipid membranes. On the other hand, the lipophilic part denotes regions of the molecule that have an affinity for lipids or lipid-like substances, enhancing their compatibility with biological systems, particularly cellular membranes. Together, these features enable the dendrimers to act as efficient carriers for metal ions, ensuring effective interaction with bacterial membranes while reducing toxicity to human cells. Amphiphilic dendrimers are thus promoted as potential antibacterial candidates with superior chemical properties which arises from their well-defined structure and the ability to resist degradation by enzymes. Additionally, they exhibit lower toxicity compared to conventional antibiotics. It has been reported that conferring an amphiphilic character through the insertion of a lipidic chain induces an increase in

antibacterial activity against various drug-resistant bacteria (Siriwardena et al., 2018). It has also been shown that amphiphilic dendrimers with double aliphatic chains exhibit reduced toxicity compared to the same dendrimer with a single aliphatic chain. This suggests that the attachment of three aliphatic chains to a gallic acid-derived core could be highly beneficial for the synthesis of amphiphilic dendrimers (Meyers et al., 2008).

New metallo-dendrimer materials that combine the properties of amphiphilic dendrimers but also the antibacterial properties of copper and silver should be good candidates to overcome microbial proliferation. To our knowledge, there are no reports on the synthesis of amphiphilic dendrimers loaded with copper or silver zero-valent metals. In addition, a comparative analysis between copper and silver dendrimers, both in their zero-valent and charged forms, is crucial. This analysis will allow for a detailed comparison of the properties and effects of copper and silver in their non-charged (zero-valent) state as well as their positively charged forms, enabling a better understanding of their behavior and efficiency in various applications. The synthesis of new dendrimers loaded with zero-valent metals and positively charged metals and their applications against enterotoxigenic proliferation of *E. coli* (main cause of porcine enteritis) are now reported. The hydrophobic part of the amphiphilic dendrimer was prepared by attaching hydrophobic chains to a gallic acid-derived core, which has intrinsic antibacterial properties. To enhance the antibacterial activity of these dendrimers, copper or silver ions were introduced, either in their positively charged or zero-valent forms, to form copper- or silver-loaded dendrimers, respectively.

4.4 Materials and Methods

4.4.1 Materials

All the reagents were used as supplied without any prior purification. Sodium chloride (NaCl) was obtained from ACP chemicals, Montreal, Canada, sodium borohydride 98% (NaBH₄) was obtained from Acros organics (Ottawa, Canada), all solvents,

potassium iodide, potassium carbonate, sodium azide, gallic acid, tosyl chloride, DIC, HOBt and tributylphosphine were obtained from Millipore Sigma Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada), copper sulfate (CuSO_4), silver nitrate (AgNO_3) 3-amino-1-propanol, methyl acrylate, 1-bromododecane, 1-bromotetradecane were obtained from Thermo Fisher Scientific (Saint-Laurent, QC, Canada). ETEC:F4 strain was a gift from the Escherichia coli laboratory located at veterinary Medicine Faculty of Université de Montréal (St-Hyacinthe, QC, Canada). Other reagents were from Sigma and Aldrich (Oakville, ON, Canada)

4.4.2 Methods

All the organic reactions were carried out using standard methods under an inert atmosphere of nitrogen. The storage of the solvents was done using molecular sieves and when necessary, those solvents were bubbled with nitrogen. The monitoring of the reactions was done by thin-layer chromatography (TLC) using silica gel 60 F254 pre-coated plates (E. Merck, Darmstadt, Germany). The TLC was viewed under ultraviolet light at 254 nm or/and chemical stain recipe. The purification was performed by recrystallisation or flash column chromatography on silica gel (60 Å porosity, 40 – 63 μm , from Canadian Life Science (Peterborough, ON, Canada).

^1H -NMR acquisitions were recorded at 300 MHz and ^{13}C -NMR spectra were recorded at 75 MHz, respectively, on a Bruker spectrometer (300 MHz) (Milton, ON, Canada). All NMR spectra were measured at 25 °C in the described deuterated solvents. The chemical shifts of proton and carbon are reported in parts per million (ppm) and the coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz). The peaks of the residual protic solvent used for chemical shift calibrations were CDCl_3 (^1H , δ 7.27 ppm; ^{13}C , δ 77.2 ppm (central resonance of the triplet)), DMSO-d_6 (^1H , δ 2.50 ppm; ^{13}C , δ 39.52 ppm) and D_2O (^1H , 4.79 ppm and 30.9 ppm for the CH_3 of the acetone in the ^{13}C spectra).

Synthesis of methyl 3,4,5-tris(hydroxyl)benzoate (Compound 2). 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (Compound 1, Gallic acid: 5.0 g, 29.4 mmol) was dissolved in

80 mL of methanol and 0.5 mL of concentrated H_2SO_4 (96%) was added dropwise. The reaction was refluxed for 7 h and monitored by TLC. When the reaction was completed, the solvent was evaporated to obtain the crude product. The reaction mixture was concentrated and extracted with ethyl acetate (3 x 200 mL). The reaction mixture was then treated with saturated NaHCO_3 in order to neutralize any acidic traces. The organic layer was dried over sodium sulphate (Na_2SO_4) and concentrated in vacuo (rotary evaporator) to provide ester 2 in good yield (5.1 g, 95%); $R_f = 0.4$ (15% ethyl acetate/hexane). Compound characterization agreed with the literature values (El Riz et al., 2024). ^1H -NMR (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 9.21 (s, 3H), 6.98 (s, 2H), 3.74 (s, 3H); ^{13}C -NMR (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 166.8, 146.0, 138.9, 119.9, 109.0 and 52.1 ppm.

General Procedure for the synthesis of methyl 3,5-bis(alkyloxy)benzoates (compounds 3-4)

For the synthesis of compounds 3 and 4, a previously published method was used with slight modifications (Cheng et al., 2018; Zeng et al., 2008). The methyl 3,4,5-tris(hydroxyl)benzoate (1.0 g, 5.4 mmol) (2), 1-bromododecane (4.2 mL, 14.16 mmol), potassium carbonate (2.3 g, 16.3 mmol), potassium iodide (63.1 mg, 0.4 mmol) and 75 mL of DMF were stirred under a nitrogen atmosphere at 90 °C for 12 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, followed by the addition of 50 mL of water. The organic phase was extracted with EtOAc (4 x 100 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. After chromatographic purification, compounds 3 and 4 were obtained in the form of a white powder.

Synthesis of methyl 3,4,5-tris(dodecyloxy)benzoate (Compound 3 was obtained as a white powder (1.12 g, 5.90 mmol, 99%) and the characterization agrees with literature (Zeng et al., 2008)). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.18 (s, 2H), 3.94 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H), 3.81 (s, 3H), 1.76-1.64 (m, 6H), 1.48-1.38 (m, 6H), 1.19 (s, 3H), 0.81 (t, $J = 6.4$ Hz, 9H); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 166.9, 155.8, 142.3, 124.6, 107.9, 73.4, 69.1, 52.1, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.1, 22.3, 14.1.

Synthesis of methyl 3,4,5-tris(tetradecyloxy)benzoate (Compound 4 was obtained as a white powder (3.42 g, 5.43 mmol, 81%) and the characterization agrees with literature (Cheng *et al.*, 2018)). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.18 (s, 2H), 3.93 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 3.81 (s, 3H), 1.78-1.62 (m, 6H), 1.42-1.35 (m, 6H), 1.19 (s, 3H), 0.81 (t, $J = 6.6$ Hz, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 166.9, 155.8, 142.3, 124.6, 107.9, 73.4, 69.1, 52.1, 31.9, 30.3, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 26.1, 22.7, 14.1.

General Procedure for the hydrolysis of methyl ester compounds

For the synthesis of compounds 5 and 6, the esters 3 and 4 (respectively 1.00 g, 1.98 mmol) were dissolved in 15 mL of ethanol, and 2.5 mL of a 10% KOH aqueous solution was added. The reaction mixture was heated under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with 40 mL of dichloromethane (DCM), washed successively with 1 M HCl (25 mL) and brine (40 mL), then dried over anhydrous Na_2SO_4 . The organic layer was filtered and evaporated under reduced pressure. This procedure follows Zeng *et al.*, 2008, with slight modifications, namely the use of a lower reaction temperature (reflux instead of 70 °C) and direct neutralization with HCl instead of acidification with acetic acid.

Synthesis of 3,4,5-tris(dodecyloxy)benzoic acid (compound 5). Compound 5 was obtained as a white powder (0.97 g, 1.46 mmol, 99%) and the characterization agrees with literature (Zeng *et al.*, 2008)). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.25 (s, 2H), 3.95 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.79-1.63 (m, 6H), 1.41-1.36 (m, 6H); 1.19 (s, 48H), 0.81 (t, $J = 6.6$ Hz, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 172.1, 152.8, 143.1, 123.6, 108.5, 73.5, 69.1, 31.9, 30.3, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 26.1, 22.7, 14.1.

Synthesis of 3,4,5-tris(tetradecyloxy)benzoic acid (compound 6) Compound 6 was obtained as a white powder (0.88 g, 1.30 mmol, 89%) and the characterization agrees with literature (Gruzdev *et al.*, 2015)). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.25 (s, 2H), 3.95 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.79-1.63 (m, 6H), 1.43-1.36 (m, 6H); 1.19 (s, 60H), 0.80 (t, J

= 6.6 Hz, 9H); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 171.1, 152.8, 143.1, 123.6, 108.5, 73.5, 69.1, 31.9, 30.3, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 26.1, 14.1.

Synthesis of Compound 8. To a solution of compound 7 (methyl acrylate) commercially purchased from Sigma Aldrich (6.9 g; 80 mmol) in 20 mL methanol was added dropwise a solution of 3-amino-1-propanol (compound 7) (1 g; 67 mmol) in 20 mL. The mixture was stirred at room temperature for 6 h. Excess methyl acrylate and solvent were removed in vacuo. The crude residue was then diluted with dichloromethane and washed with brine (3×25 mL). The organic layer was dried over sodium sulphate and concentrated under vacuum, then concentrated to afford compound 8 as a clear, colorless liquid (3.2 g; 97%). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.49 (s, 6H), 2.59 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 2.42 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 1.53-1.44 (m, 2H); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172.7, 61.9, 52.1, 51.4, 49.1, 31.9, 28.8.

Synthesis of Compound 9. To a solution of compound 8 (1.00 g, 4.04 mmol) in 50 mL of tetrahydrofuran (THF), 5 mL of a 4M aqueous solution of NaOH was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h, and then a solution of tosyl chloride (2.31 g, 10.82 mmol) in THF (25 mL) was added dropwise using a dropping funnel. Finally, the reaction mixture was stirred at 0 °C for an additional 3 h. The reaction mixture was poured into iced water (200 mL) and extracted with DCM (3×200 mL). The organic layer was dried over sodium sulphate and concentrated under vacuo. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give compound 9 as a colorless oil (1.1 g, 68%). ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.02 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.61 (s, 6H), 2.65 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 2.42 (s, 3H), 2.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.73 (q, $J = 6.4$ Hz, 4H); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 172.8, 144.7, 133.1, 129.8, 127.8, 68.7, 51.5, 49.5, 49.1, 32.4, 26.8 and 21.6 ppm.

Synthesis of Compound 10. A solution of the compound 9 (854 mg, 1.7 mmol) in DMF (15 mL) was stirred under a nitrogen atmosphere then sodium azide (884 mg, 13.6

mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at 80 °C overnight. The reaction mixture was diluted in EtOAc and washed with saturated solution of sodium chloride (brine). The organic layer was dried over Na₂SO₄, followed by the solvent evaporation to afford compound 10 as a colorless oil (0.6 g, 88%). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.60 (s, 6H), 3.25 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.68 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 2.44-2.35 (m, 6H) 1.63 (q, J = 6.6 Hz, 2H); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 172.9, 51.5, 50.5, 49.2, 49.1, 32.5, 26.6.

General Procedure for the synthesis of compounds 11-12

For the synthesis of compounds 11 and 12, which are amphiphilic dendrimers functionalized via amide bond formation between compound 9 and tris(alkyloxy)benzoic acid derivatives (compounds 5 and 6), a method previously described was used with minor modifications (Mousavifar et al., 2022). To a solution of compound 9 (100 mg, 0.37 mmol) and compounds 5 or 6 (248 mg, 0.37 mmol) in dry DCM (5.0 mL), tributylphosphine (140 µL, 0.55 mmol) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 hours, then allowed to warm to room temperature and stirred for 24 hours. The formation of the amine intermediate was confirmed by TLC. Then, hydroxybenzotriazole (HOBt) (74 mg, 0.55 mmol) and N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) (80 µL, 0.45 mmol, 2.1 equiv.) were added. The reaction was stirred at room temperature for 96 hours. After completion, the mixture was diluted with ethyl acetate, washed successively with saturated NaHCO₃ and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure to give the crude product. This crude material corresponds to the unpurified dendrimeric compounds bearing the desired functional groups. The crude product was purified by silica gel column chromatography, using a gradient of DCM/MeOH (from 100:0 to 95:5, v/v) as eluent. The fractions containing the pure products were identified by TLC and combined to afford compounds 11 and 12 as purified products.

Synthesis of compound 11. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.09 (s, 2H), 3.92 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 3.57 (s, 6H), 3.33 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 2.39 (dd, J = 12.5, 6.1 Hz, 6H) 2.54 (s, 2H), 1.74-1.62 (m, 6H); 1.45-1.29 (m, 6H), 1.19 (s, 48H), 0.80 (t, J = 6.5 Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 173.0, 167.1, 152.9, 140.6, 129.3, 105.5, 73.3, 69.0, 51.6, 50.3, 49.3, 41.6, 37.6, 32.4, 31.9, 29.6, 29.3, 26.1, 22.7, 14.1.

Synthesis of compound 12. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.07 (s, 2H), 3.92 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 3.59 (s, 6H), 3.36 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 2.43 (dd, J = 13.2, 6.7 Hz, 6H), 1.74-1.62 (m, 6H); 1.42-1.33 (m, 6H), 1.19 (s, 60H) 0.80 (t, J = 6.7 Hz, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 173.0, 167.1, 152.8, 140.6, 129.3, 105.5, 73.3, 68.9, 51.6, 50.3, 49.3, 41.6, 37.6, 32.4, 31.9, 29.6, 29.3, 26.1, 22.7, 14.3.

General Procedure for the synthesis of compounds 13-14

For the synthesis of compounds 13 and 14, a procedure previously published with slight modifications was used (Mousavifar et al., 2022). To a solution of compound 11 and 12 (100.00 mg, 0.11 mmol) in EtOH (5 mL) corresponding to a final concentration of 22 mM was added a 10% KOH solution (0.5 mL) and the resulting mixture was heated under reflux for 4h. The reaction mixture was cooled to room temperature, dissolved in DCM (40 mL) washed with 1 M HCl (25 mL), brine (40 mL), and dried over Na_2SO_4 . The filter was concentrated under the vacuum.

Metal-entrapment in the amphiphilic dendrimer.

Ester-terminated amphiphilic dendrimers (compounds 11 and 12) were incubated with aqueous metal salt solutions to evaluate their interaction with zero-valent metals after reduction. Specifically, 10 mg of each dendrimer was added to 10 mL of aqueous 0.0005 mol/L $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ or AgNO_3 , under vigorous stirring at room temperature for 2 hours, following Noori et al. (Noori et al., 2021) with minor modifications. Carboxylic acid-terminated dendrimers (compounds 13 and 14) were treated under the same

conditions. 15 mg of each dendrimer was added to 10 mL of aqueous CuSO_4 or AgNO_3 (0.0005 mol/L) solutions. In this case, the carboxylic acid terminal groups act as ligands for Cu^{2+} and Ag^+ , allowing for classical metal coordination. Then, to all the metal-ion-loaded dendrimers, 10 mL of 0.001 mol/L NaBH_4 solution was added dropwise under vigorous stirring at room temperature for 2 hours. This reduction step led to a visible color change from pale yellow to brown or grey, indicating the formation of Cu^0 and Ag^0 nanoparticles. This was confirmed by UV–Vis spectroscopy showing characteristic surface plasmon resonance (SPR) bands. The reduction conditions with NaBH_4 were according to a procedure previously published by Noori et al with minor modifications (Noori et al., 2021).

Effect of metal entrapped amphiphilic dendrimers on ETEC:F4 proliferation. Enterotoxigenic *E. coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) 1×10^7 CFU/mL were treated with various concentrations of metal-amphiphilic dendrimers (0–0.1 mg/mL of broth) loaded or not with metal nanoparticles. For the negative control, the ETEC:F4 bacteria were treated with Luria–Bertani (LB) broth from Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA). The samples at a final volume of 10 mL were incubated for 24 h at 37 °C, 100 RPM and the optical density at 600 nm (OD_{600nm}) was measured in a polystyrene cuvette of 10 mm path length by Biochrom Libra S50 UV-Vis spectrophotometer (Biochrom US, Holliston, MA, USA). The bactericidal activity of metal-glycodendrimers was also evaluated by inhibition zone diameter of 1 mg powder of amphiphilic dendrimers on LB agar Petri dishes, previously inoculated with ETEC:F4. The disc images were acquired after 24 h incubation at 37 °C, analyzed by ImageJ2 software (version 2, Madison, WI, USA) and the diameters of the inhibition growth were reported in centimeters. Solutions of 1% H_2O_2 , and of 1000 µg/mL Penicillin were used as positive control. In addition, AgNO_3 and CuSO_4 used to the synthesis of metal amphiphilic dendrimers was also used.

4.5 Results and discussion

The amphiphilic dendrimers were designed based on antibacterial constituent elements that exhibit intrinsic antibacterial activity. Gallic acid, a natural polyphenol found in plants, was selected for the hydrophobic part of the dendrimer due to its antibacterial properties, even though it is water-soluble. Gallic acid is known to have strong antibacterial properties on its own and can affect irreversibly the *E. coli* membrane (Li, K. *et al.*, 2019). In addition, studies have demonstrated that the antimicrobial activity of lipids is both specific and selective. Furthermore, lipid chains can inhibit cell wall synthesis by interacting with the bacterial cell wall synthesis machinery, as well as interacting with bacterial membranes. Hence, amphiphilic NPs can be envisaged as targeting devices.

Therefore, combining the above two components into a single entity presented into a multivalent architecture (amphiphilic dendrimer) was hypothesized to greatly enhance fighting *E. coli* bacterial infections.

4.5.1 Synthesis of the lipid-based structures

The lipidic scaffold was built from gallic acid and lipidic chain (Scheme 1). First, methyl gallate (2) was obtained by the esterification of gallic acid using Fischer esterification, in order to protect the acid functionality. Then, the methyl ester was functionalized with lipidic chain in the periphery to afford the compounds 3 and 4. The ^1H NMR spectra The ^1H NMR spectra of compounds 5 and 6 confirm the successful hydrolysis of the methyl esters (compounds 3 and 4). The singlet at δ 3.81 ppm, corresponding to the OCH_3 group in compounds 3 and 4, is no longer present. The aromatic protons appear as a singlet at δ 7.25 ppm (2H), consistent with the symmetric 3,4,5-substitution. A triplet at δ 3.95 ppm ($J = 6.4$ Hz) corresponds to the methylene protons adjacent to the oxygen atoms (OCH_2-) in the long alkyl chains. The aliphatic region (δ 1.79–0.80 ppm) displays the expected multiplets and triplets for the

dodecyl (compound 5) and tetradecyl (compound 6) chains. The carboxylic acid proton was not clearly visible under these NMR conditions (CDCl_3), as commonly observed.

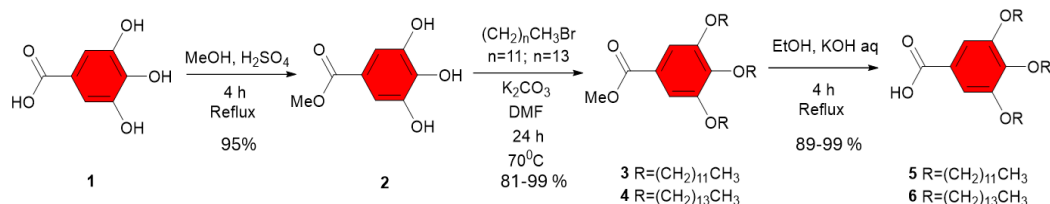


Figure 4.1 Synthesis of the lipid-based structures using the gallic acid

4.5.2 Synthesis of the hydrophilic moiety

The hydrophilic moiety was synthesized in several steps starting from 3-amino-1-propanol. The amine group of 3-amino-1-propanol reacted with tert-butyl acrylate in a nucleophilic addition, forming a secondary amine. This reaction was followed by tosylation of the hydroxyl group to introduce a tosyl group. Finally, a nucleophilic substitution of the tosyl group by an azide group (NaN_3 , NaI , DMF , 80°C) yielded the azide, which is essential for the subsequent coupling reaction with the lipid portion.

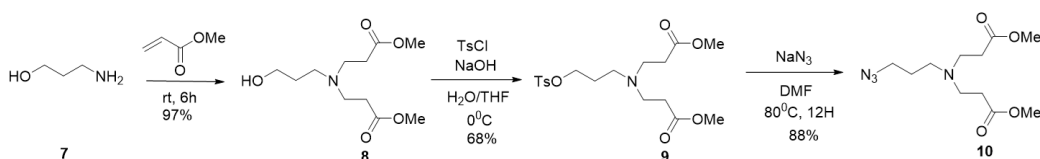


Figure 4.2 Synthesis of the hydrophilic part using 3-amino-1-propanol .

4.5.3 Synthesis of the amphiphilic dendrimer

The amphiphilic ester terminal dendrimers 11–12 were synthesized through a chemical ligation between the lipid architectures 5–6, which have a carboxylic acid terminal group, and the hydrophilic molecule 10, featuring a terminal azide group. The reaction was done using a one-pot modified Staudinger reaction (Bu_3P , HOBt , DIC , DCM). The

obtained products were fully characterized by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy. The amphiphilic dendrimers 13 and 14 were further confirmed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). For compound 13 ($\text{C}_{52}\text{H}_{94}\text{N}_2\text{O}_8$), the expected molecular ion was observed at $m/z = 875.7076$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$), matching the calculated mass of 874.70 g/mol. Similarly, compound 14 ($\text{C}_{58}\text{H}_{106}\text{N}_2\text{O}_8$) showed a molecular ion at $m/z = 959.8046$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$), consistent with its calculated mass of 958.80 g/mol. These results support the successful synthesis of the carboxylic acid-terminated amphiphilic dendrimers.

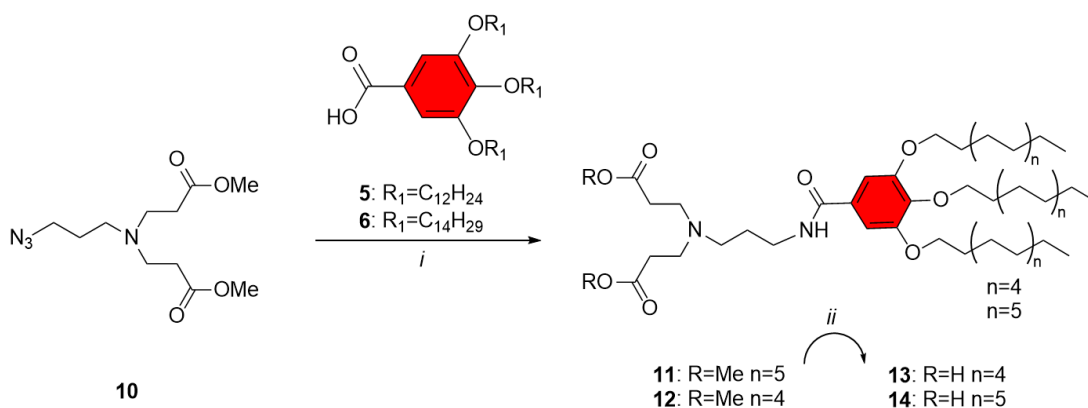


Figure 4.3 Synthesis of amphiphilic dendrimers via a one-pot modified Staudinger ligation between the azide-functionalized hydrophilic compound 10 and the carboxylic acid-terminated lipid compounds 5 and 6. Conditions: (i) Bu_3P , DCM, HOBt, DIC, 24 h to give compounds 11 (72%) and 12 (70%); (ii) EtOH, KOH, 4 h to afford carboxylic acid derivatives 13 (85%) and 14 (82%).

The *in situ* amidation reaction between the azide-functionalized hydrophilic head and the carboxyl-functionalized lipophilic tail was carried out using DIC ($\text{N,N}'$ -diisopropylcarbodiimide) as the coupling agent, with HOBt (Hydroxybenzotriazole) added to improve the yield and stabilize the acid activation. This activation results in

the formation of an intermediate ester, which is then substituted by the amine formed *in situ*. The reduction of the azide to iminophosphorane $RN=P(OBu)_3$ was performed using tributylphosphine (Bu_3P), a reducing agent that facilitates the formation of the iminophosphorane. The reduction was monitored by thin-layer chromatography (TLC), with detection using ninhydrine, which specifically identifies primary amines. The formation of the amide was confirmed by proton NMR spectroscopy, with the appearance of a triplet at δ 7.53 ppm, correlated with the CH_2NH group. Additionally, the absence of Hpara protons confirms that we are observing a covalent bond rather than a physical mixture.

4.5.4 Bactericidal Activity of metal loaded amphiphilic-dendrimers

The ETEC:F4 EcL8559 strain was chosen in this study because it is a well characterized pathogen. The ETEC :F4 toxicity measured at OD600 nm increased concentration to 1 mg/mL of metal-entrapped amphiphilic dendrimer (Figure 4.1). According to El-Riz et al. (2024). Dendrimer-based materials loaded with silver are more potent than those loaded with copper.

The two amphiphilic dendrimeric compounds (D12 and D14) were designed according to the carbon chain. To evaluate the bactericidal effect of carbon length chain, the half inhibitory concentrations (IC_{50}) of ETEC:F4 growth were experimentally reported in mg/mL around 1×10^{-4} and 1×10^{-3} for D12-zero valent silver (D12- Ag^0) and for non-reduced silver (D12- Ag^+). Surprisingly, any bactericidal effect was found for D12 and for both D12-copper (D12- Cu^0 and D12- Cu^{2+}) loaded (Figure 4.1A), referring to the fact that the amphiphilic function inhibited the bactericidal activity of gallic acid as reported (reference) and of copper. The non-bactericidal activity result was also obtained for ETEC:F4 treatment with D14-amphiphilic dendrimers loaded with metals. An IC_{50} around 1×10^{-4} and 1×10^{-2} mg/mL was found for D14- Ag^0 and for D14- Ag^+ whereas any bactericidal activity was revealed for the control D14 and for both D14- Cu^0 and D14- Cu^{2+} (Figure 4.1B).

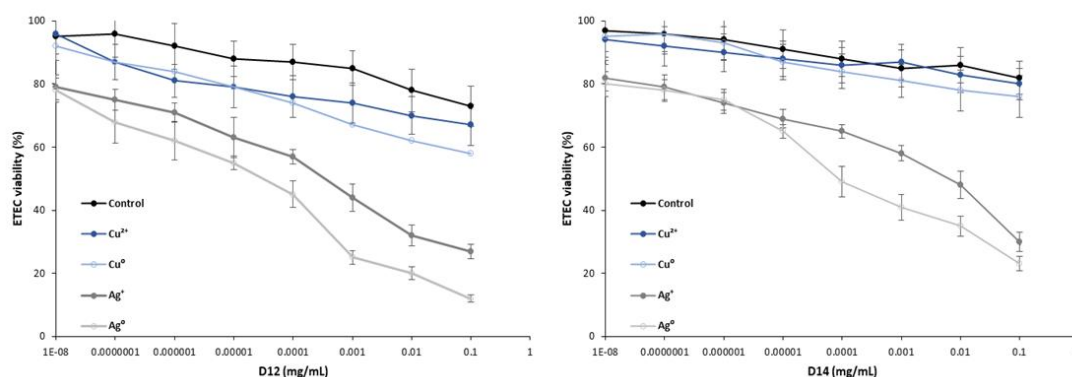


Figure 4.4 Survival of enterotoxigenic *E. coli* fimbriae 4 (ETEC:F4) was evaluated by OD at 600 nm after incubation in LB broth containing zero-valence (Cu⁰, Ag⁰) or ionic metal (Cu²⁺, Ag⁺) loaded into amphiphilic D14 (A) or D12 (B) dendrimers. The bactericidal activity was obtained at different concentrations of dendrimer-based compounds. Data are triplicate of three different experiments and are represented by mean $\pm$ SD.

The effect of amphiphilic metallo-dendrimers on bacterial proliferation was monitored by optical density at 600 nm (Figure 4.4). Excluding the data found with copper-amphiphilic dendrimeric materials, the bactericidal activity of silver-loaded dendrimeric materials supports our hypothesis that they act as bactericidal agents. In addition, an inverse correlation was observed between the carbon chain length and the bactericidal effect of non-reduced silver, with IC₅₀ values of approximately 1×10^{-3} and 1×10^{-2} mg/mL for D12 and D14, respectively (Figure 4.4). These data suggested that D12-material might be more efficient than their counterpart D14 and that silver-derived material was the most relevant to evaluate the bactericidal effect of metal-amphiphilic dendrimers. In the same way, zero-valence silver was more bactericidal than non-reduced metal. The bactericidal activity of both zero-valent and non-reduced silver entrapped in D12 and D14 amphiphilic dendrimers was confirmed by antibiogram assay on LB-agar. The inhibition diameters observed on Petri dishes (Figure 4.2) are reported in Table 4.1. As also observed in OD600 assays, no inhibition zones were

observed for the dendrimers D12 and D14 alone, used as metal-loading matrices. The diffusimetric profiles (Figure 4.2 and Table 4.1) confirmed the previous results and showed that D12-Cu⁰ was more potent than D14-Cu⁰, and that copper-entrapped materials (D12-Cu²⁺ or D14-Cu²⁺) did not exhibit any bactericidal activity against ETEC:F4.

Considering that rude materials (CuSO₄ and AgNO₃) activities overlap those of design materials, it will be interesting to evaluate the cell toxicity of the proposed materials to understand their mechanism and to show the beneficial effect of amphiphilic dendrimers against enterotoxigenic disease induced by ETEC.

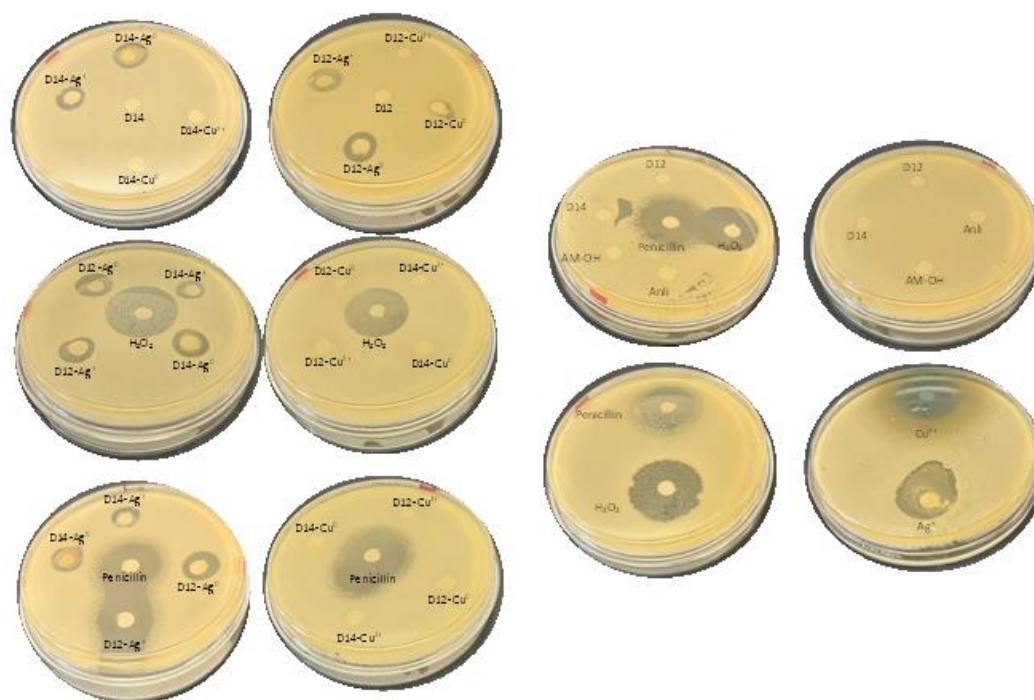


Figure 4.5 Diffusimetric profiles of the Anti-ETEC:F4 materials. Effect of 12- or 14-carbone chain of amphiphilic dendrimer (D12 or D14), loaded with Cu⁰ (D12- Cu⁰ and D14- Cu⁰), with Cu²⁺ (D12- Cu²⁺ and D14- Cu²⁺), with Ag⁰ (D12- Ag⁰ and D14-Ag⁰)

or with Ag^+ (D12- Ag^+ and D14- Ag^+) was evaluated on agar-LB gel. Solutions of 1% H_2O_2 and of 1000 $\mu\text{g/mL}$ Penicillin were used as a positive control.

Table 4.1 Average diffusion diameters as growth inhibition of bacteria

D12-Metal loaded	No metal	Cu^{2+}	Cu^0	Ag^+	Ag^0
Inhibition diameter (cm)	0.00	0.00	0.70	1.13 ± 0.07	1.63 ± 0.15
D14-Metal loaded	No metal	Cu^{2+}	Cu^0	Ag^+	Ag^0
Inhibition diameter (cm)	0.00	0.00	0.57 ± 0.38	1.15 ± 0.05	1.60 ± 0.15
Control samples	AgNO_3	CuSO_4	Penicillin	H_2O_2	
Inhibition diameter (cm)	3.00 ± 0.18	2.10 ± 0.11	3.26 ± 0.31	2.43 ± 0.14	

The inhibition growth bacteria were induced by 1 mg of amphiphilic dendrimer-based materials or of 5 mg AgNO_3 or of 5 mg CuSO_4 and by 10 μL of antibacterials materials (1% H_2O_2 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ Penicillin). The experiments were repeated three times, and data represented mean $\pm$ SD.

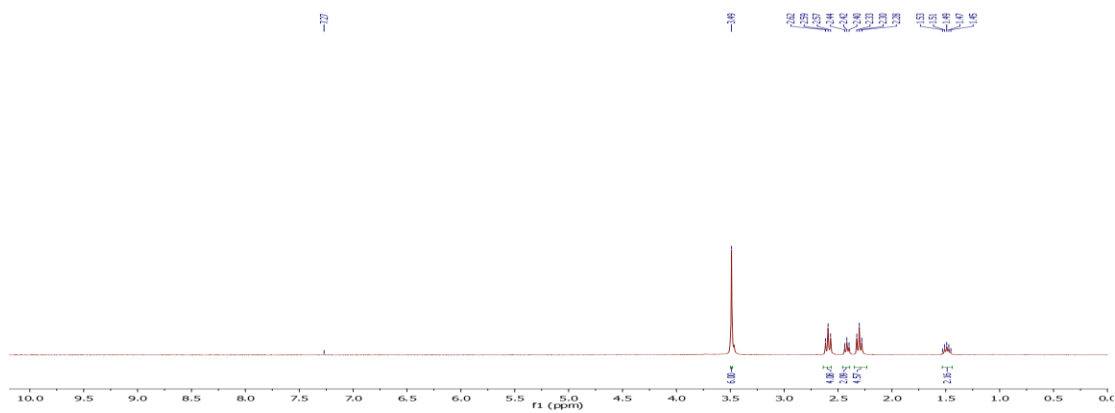
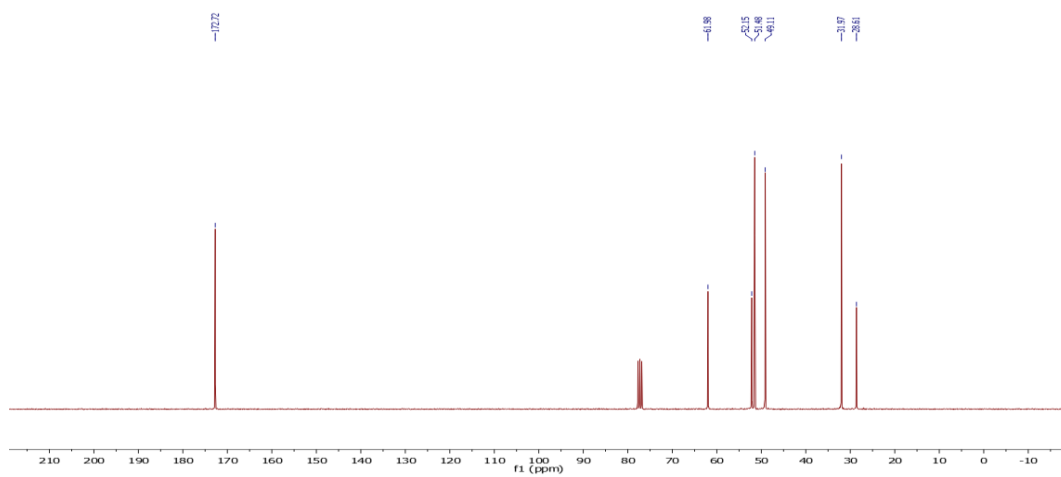
The bactericidal activity of the metallo-dendrimers is slightly lower than that of free metal(s) or of free cations. It is not excluded that the cytotoxicity of metallo-dendrimers would be lower than that known of free metal(s) or of free cations. In this case, although the bactericidal activity appears slightly lower, the association with the dendrimers could be an advantage for the environmental tissues. Although metal salts alone exhibit a slightly higher antibacterial activity, they are also known to be significantly more cytotoxic to human cells. The association of silver and copper ions with dendrimeric structures may offer several advantages, including targeted delivery, controlled release of metal ions, and a reduced interaction with eukaryotic cell membranes. Consequently, the modest reduction in bactericidal effect observed with metallo-dendrimers (D:Ag and D:Cu) may be considered a favorable trade-off between antimicrobial efficacy and

biocompatibility. This hypothesis is supported by previous studies showing that metal-containing nanostructures can minimize acute cytotoxicity while maintaining sufficient antibacterial action, particularly through localized ion release and protection of surrounding tissues. Such a strategy could be especially valuable in biomedical contexts, where minimizing damage to human cells while maintaining antimicrobial activity is critical.

4.6 Conclusions

The study conducted on metal-loaded amphiphilic dendrimers, containing copper and silver in their ionic (Cu^{2+} , Ag^{+}) and zero-valent (Cu^0 , Ag^0) forms, highlights their potential in combating bacterial infections, including those caused by resistant strains. The integration of these metals, both as ions and in their zero-valent form, enables effective modulation of antimicrobial activity, offering new therapeutic avenues to address the emergence of resistance to conventional treatments. These metal-based dendrimers thus represent an innovative and potentially effective solution for tackling resistant bacterial infections.

4.7 Supplementary data

Figure 4.6 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) of compound 8Figure 4.7 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) of compound 8

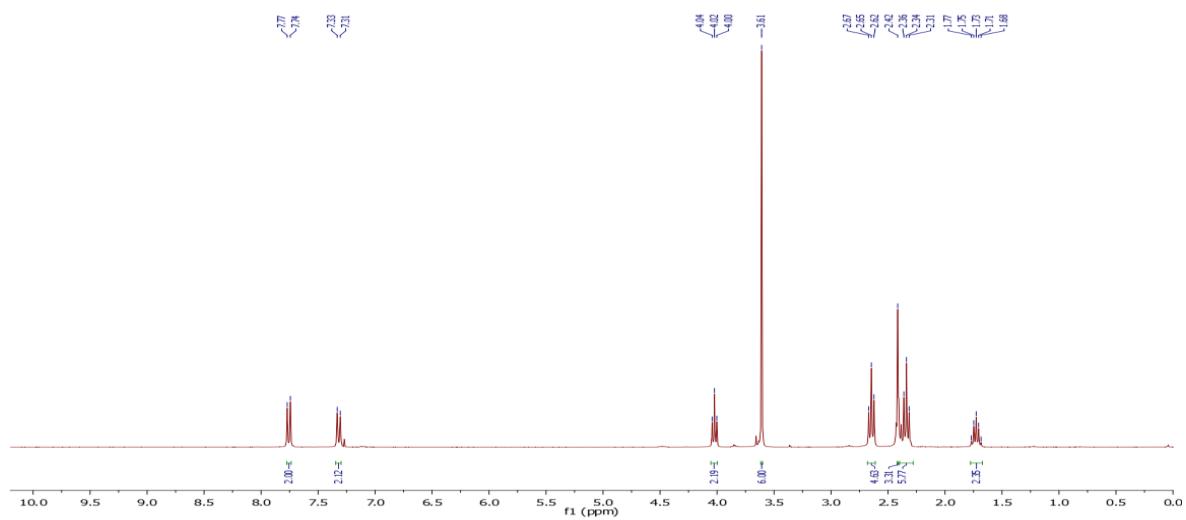


Figure 4.8 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) of compound 9

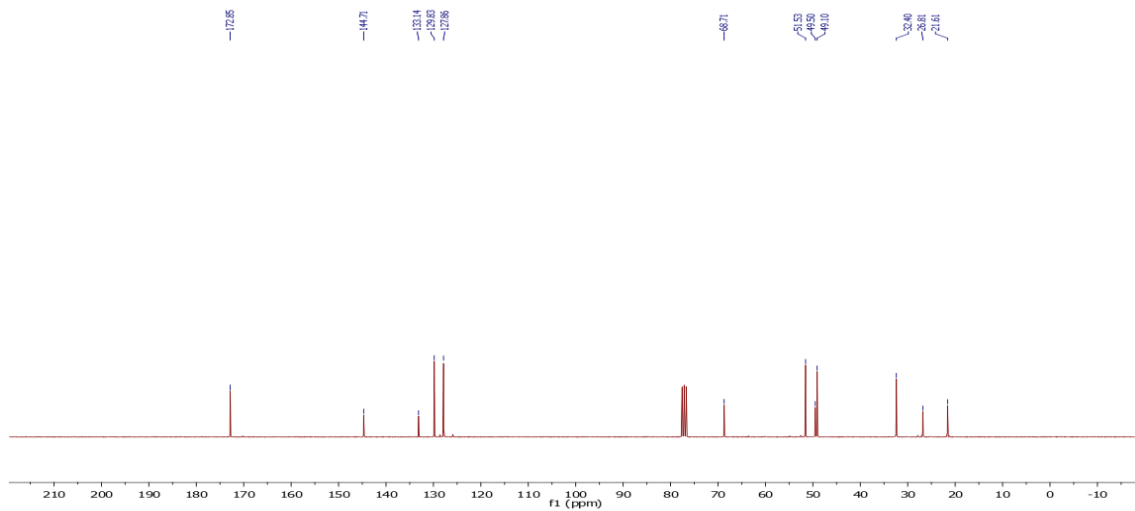


Figure 4.9 ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) of compound 9

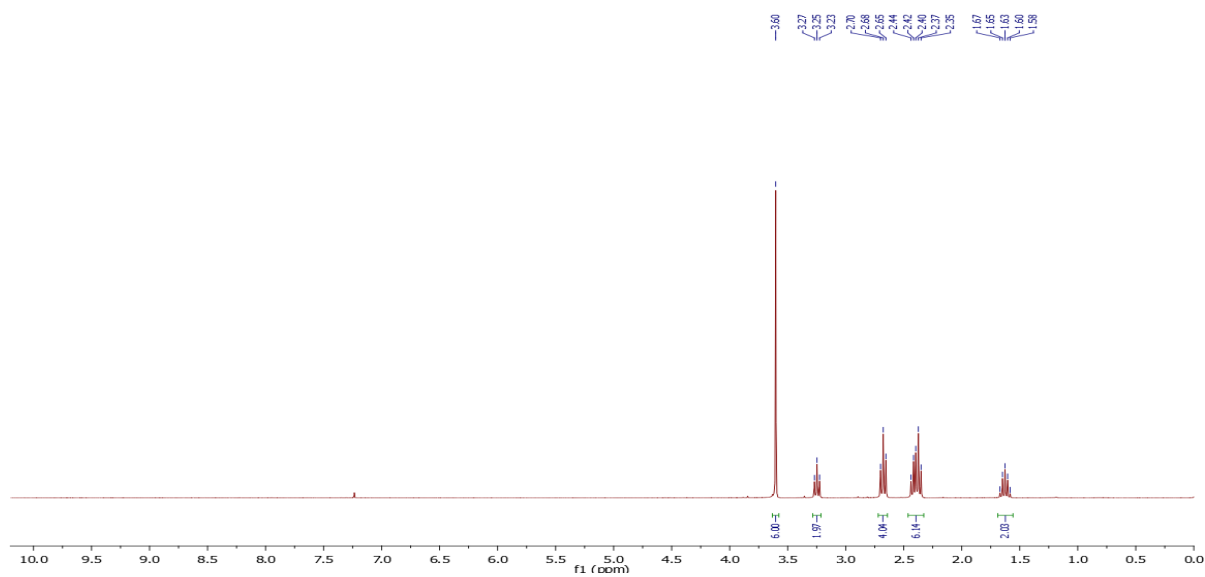


Figure 4.10 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) of compound 10

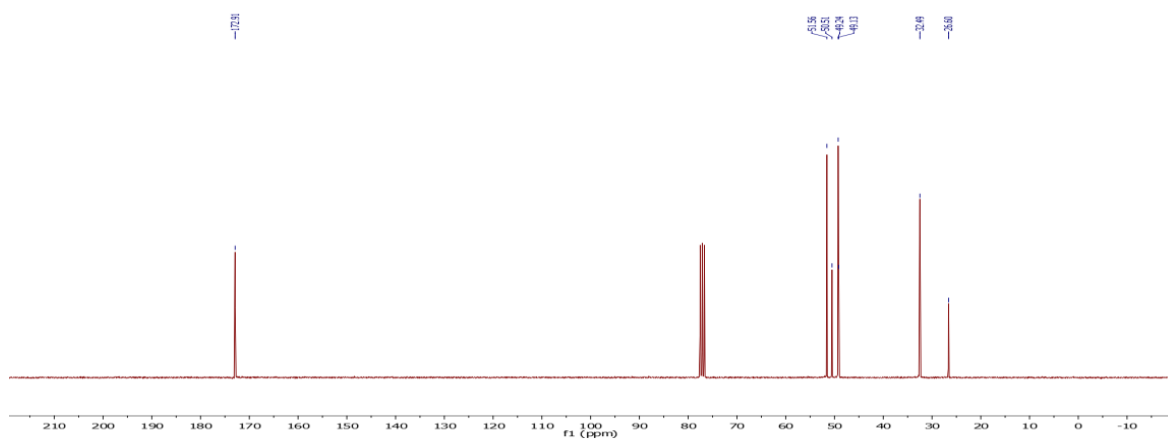


Figure 4.11 ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) of compound 10

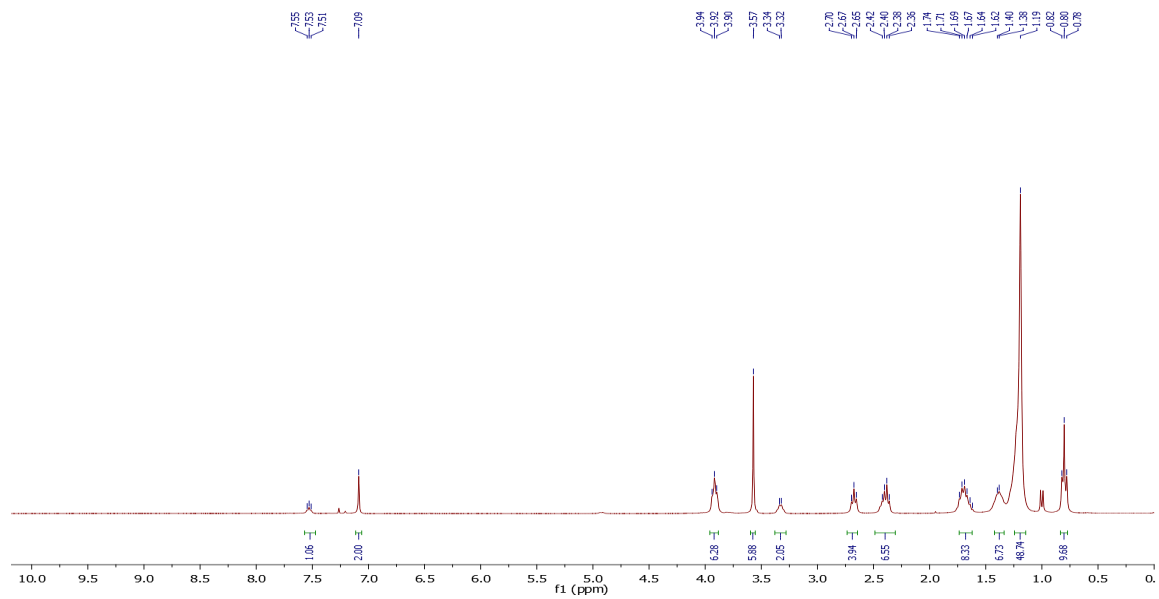


Figure 4.12 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) of compound 11

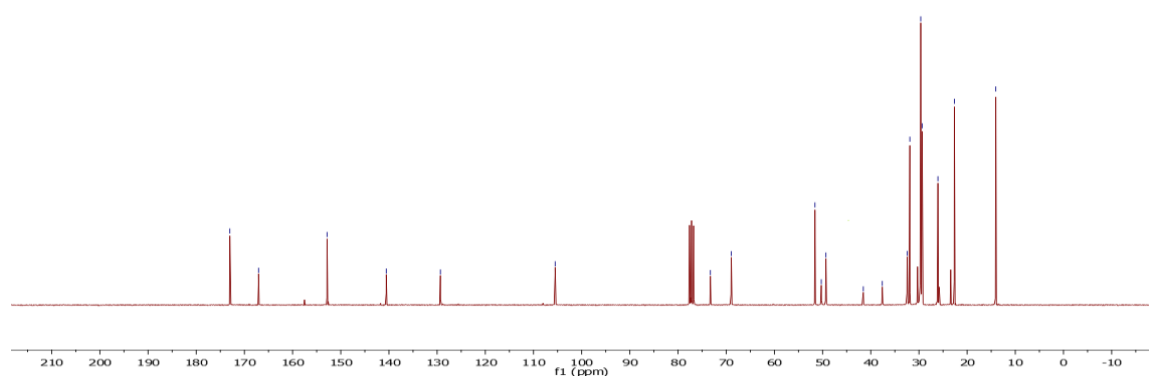


Figure 4.13 ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) of compound 11

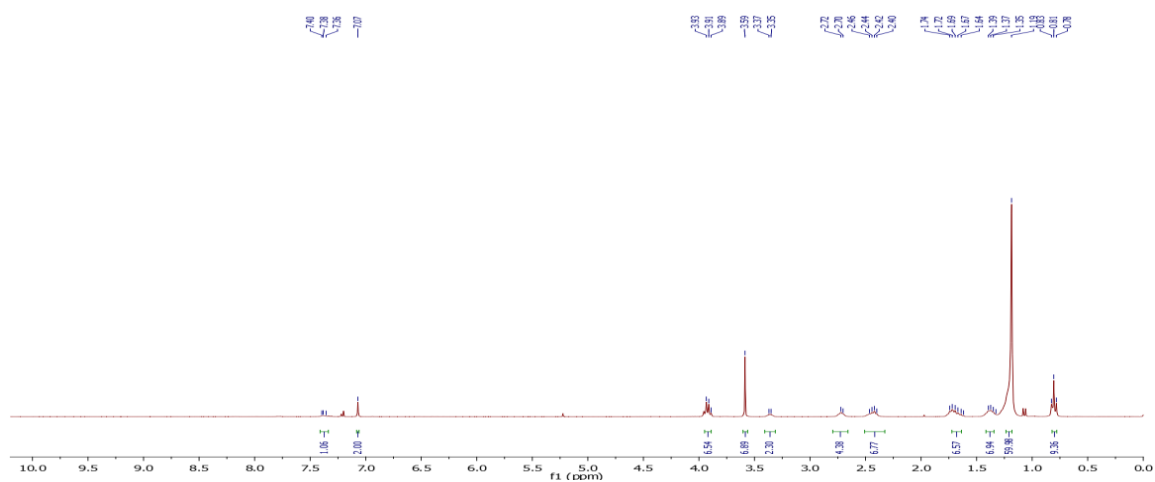


Figure 4.14 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) of compound 12

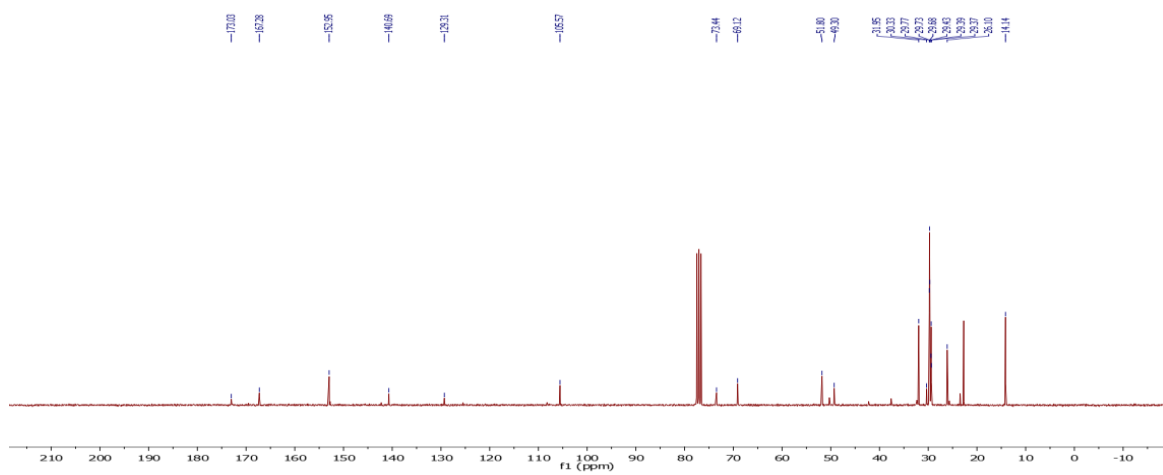


Figure 4.15 ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) of compound 12

CHAPITRE 5

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

5.1 DISCUSSIONS

La lutte contre les infections bactériennes représente aujourd'hui un défi majeur pour la santé publique mondiale en raison de la résistance des bactéries aux antibiotiques et par la capacité des micro-organismes à former des biofilms (Abdelhamid et Yousef, 2023). Ce phénomène de résistance, largement dû à l'usage excessif et inapproprié des antibiotiques, a contribué à la réduction de manière importante de l'efficacité des traitements antibiotiques classiques (Llor et Bjerrum, 2014). Cette problématique a tracé le chemin à la recherche d'alternatives innovantes pour traiter les infections bactériennes, notamment celles causées par des bactéries multirésistantes. Le développement de nouveaux traitements antibactériens agissant par des mécanismes qui diffèrent de ceux des antibiotiques classiques est nécessaire et cela afin de prévenir ou de surmonter la résistance antibactérienne. Une des stratégies émergentes dans la lutte contre la résistance bactérienne repose sur l'utilisation de métaux tels que l'argent et le cuivre. Il convient néanmoins de souligner que, bien que les nanoparticules métalliques, telles que celles à base d'argent (AgNPs) ou de cuivre (CuNPs), soient reconnues pour leur efficacité antimicrobienne, plusieurs études ont mis en évidence la possibilité pour certaines souches bactériennes de développer une résistance à ces agents. Cette résistance, bien que reposant sur des mécanismes distincts de ceux des antibiotiques classiques, peut impliquer notamment la surexpression de pompes à efflux, la formation renforcée de biofilms, la modulation de la perméabilité

membranaire, ou encore l'activation de gènes spécifiques liés à l'homéostasie des métaux, tels que *copA* pour le cuivre. D'autres processus adaptatifs, comme les altérations morphologiques, les modifications du stress oxydatif, ou la synthèse accrue de biofilms, ont également été rapportés. Ces éléments plaident en faveur d'une utilisation prudente et d'une évaluation approfondie du potentiel de résistance associé à ces nanomatériaux métalliques (Kamat et Kumari, 2023). Néanmoins, ces métaux ont longtemps été reconnus pour leur toxicité envers les organismes vivants, notamment grâce à leur interaction avec les donneurs de paires d'électrons dans les membranes cellulaires (Greiner *et al.*, 2012; Turel, Iztok et Kljun, Jakob, 2011). Cette propriété a conduit au développement de matrices capables d'héberger ces métaux sous forme de cations ou de métaux zéro-valents qui peuvent interagir d'une manière suffisamment forte pour assurer une dispersion et une stabilisation élevées, mais aussi suffisamment faible pour permettre une libération contrôlée au contact des membranes bactériennes (Greiner *et al.*, 2012; Kotrange *et al.*, 2021; Liu, J. *et al.*, 2010; Turel, Iztok et Kljun, Jakob, 2011). Cette stratégie repose sur la perturbation de la membrane bactérienne, entraînant une altération de ses fonctions essentielles et une diminution de la viabilité cellulaire (Greiner *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2008; Turel, I. et Kljun, J., 2011; Turel, Iztok et Kljun, Jakob, 2011). Les matériaux incorporant des ions métalliques, en particulier ceux à base d'argent ou de cuivre, ont démontré un fort potentiel antimicrobien en tant qu'alternatives aux antibiotiques classiques (Hao *et al.*, 2024). Une fois intégrés à des matrices, ces métaux permettent de contourner certains mécanismes de résistance bactérienne, tout en conservant une activité efficace contre des souches multirésistantes (Ioannou *et al.*, 2024; Pang *et al.*, 2019). Néanmoins, leur efficacité reste parfois limitée en raison de leur élimination ou dégradation rapide dans les milieux biologiques (Ameen *et al.*, 2021).

Une autre limitation importante réside dans la capacité des bactéries à développer des mécanismes de défense spécifiques contre les ions métalliques (Ameen *et al.*,

2021). Pour surmonter cette contrainte, l'intégration des métaux dans des systèmes porteurs, tels que les dendrimères, constitue une approche prometteuse. Les dendrimères sont des polymères synthétiques dotés d'une structure arborescente bien définie, composée d'un noyau central et de groupements fonctionnels en périphérie. Cette architecture leur confère des propriétés uniques, notamment la capacité à vectoriser des agents bioactifs (métaux, médicaments, protéines, etc.) et à en contrôler la libération dans des environnements biologiques ciblés. En tant que matrices d'encapsulation, les dendrimères permettent d'améliorer la stabilité, la biodisponibilité et la dispersion des métaux tout en régulant leur relargage. En particulier, les dérivés contenant du cuivre ou de l'argent ont montré des avantages significatifs par rapport aux méthodes d'administration métalliques classiques. Certaines classes, telles que les glycodendrimères, sont particulièrement intéressantes en raison de leur capacité à mimer les structures des glycoconjugués de surface cellulaire, ce qui pourrait favoriser une meilleure interaction avec les cibles bactériennes et renforcer leur potentiel antimicrobien.

Les fractions glucidiques en périphérie font des glycodendrimères des acteurs clés dans la lutte contre les infections bactériennes, souvent régulées par des interactions glucides-protéines (Hoyos *et al.*, 2021). Les glycodendrimères ont la capacité d'interférer avec ces interactions, inhibant ainsi l'adhésion des agents pathogènes et leur entrée dans les cellules hôtes, ce qui constitue une stratégie efficace pour bloquer les infections et limiter leur propagation (Hoyos *et al.*, 2021). La première partie de la thèse se concentre sur la conception, la synthèse et l'évaluation des propriétés antibactériennes de glycodendrimères chargés de Cu^0 et d' Ag^0 . Les résultats expérimentaux présentés ont permis de démontrer l'efficacité de ces matériaux contre les souches de *ETEC:F4* et ont apporté des éléments d'information sur les mécanismes d'action possibles. Les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse confirment que les glycodendrimères conçus à partir de l'acide gallique et du mannose ont une structure de base adaptée pour l'encapsulation de métaux à zéro-valence, créant ainsi

un système hybride avec des propriétés antibactériennes renforcées. L'utilisation de l'acide gallique, connu pour ses propriétés antibactériennes intrinsèques, combinée à la reconnaissance spécifique des récepteurs de mannose sur la surface des bactéries *ETEC*, représente une stratégie efficace pour cibler spécifiquement ces agents pathogènes. Les résultats obtenus montrent que les glycodendrimères chargés en argent (D:Ag) ont une efficacité antibactérienne plus marquée que les glycodendrimères chargés en cuivre (D:Cu) ou ceux non chargés (D). Cela s'explique probablement par la plus grande réactivité des nanoparticules d'argent à des concentrations plus faibles, ce qui a été observé dans plusieurs études comparatives mettant en évidence leur puissance antibactérienne à faibles doses (Kim, J. S. *et al.*, 2007). Ce résultat pourrait également être dû à la capacité de l'argent à générer des radicaux libres, tels que le radical hydroxyle, via la réaction de Fenton, un mécanisme bien documenté dans la littérature (Dakal *et al.*, 2016; Marambio-Jones et Hoek, 2010). Les tests d'activité antimicrobienne ont montré que les glycodendrimères chargés en métal étaient capables d'inhiber la prolifération de *ETEC:F4* avec des CMI plus faibles que celles des antibiotiques courants, comme la gentamycine et la phosphomycine. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'études antérieures, qui ont démontré que les nanoparticules de métaux à zéro-valence, telles que celles de Cu et d'Ag, sont particulièrement efficaces contre *E. coli* en raison de leur capacité à perturber les membranes bactériennes et à interagir avec les macromolécules intracellulaires, comme l'ADN. L'activité antibactérienne observée pour D:Ag pourrait également être liée à la capacité de l'argent à inhiber la croissance bactérienne en perturbant la paroi cellulaire, un mécanisme bien documenté pour les métaux lourds comme l'argent. D'autre part, les matériaux D et D:Cu ont montré une efficacité plus faible, ce qui peut s'expliquer par des différences dans les mécanismes de libération des ions métalliques et leur capacité à pénétrer la paroi bactérienne. Les tests de libération de protéines, d'ADN et d'ARN ont montré une augmentation significative des concentrations de ces macromolécules dans le bouillon LB après traitement avec les glycodendrimères, confirmant ainsi la disruption de la membrane de *ETEC:F4*. Ce phénomène est en accord avec des études

antérieures sur les nanoparticules métalliques, qui ont montré que les ions de cuivre et d'argent peuvent perturber l'intégrité de la membrane bactérienne, entraînant une fuite de protéines et de matériel génétique. Le mécanisme sous-jacent pourrait impliquer une interaction directe entre les nanoparticules métalliques et les composants de la membrane, perturbant la structure lipidique et favorisant la formation de pores. De plus, la capacité des glycodendrimères à interagir avec les macromolécules intracellulaires pourrait renforcer leur effet antibactérien, en permettant une libération ciblée de substances bioactives à l'intérieur de la cellule. La formation de biofilm est un phénomène clé dans la résistance bactérienne et la persistance des infections. Les résultats présentés montrent que les glycodendrimères *D*, *D:Cu* et *D:Ag* ont la capacité d'inhiber la formation de biofilm par *ETEC:F4*. Cette capacité est particulièrement marquée pour *D:Ag*, où l'absorbance liée au biofilm a diminué de manière significative, ce qui suggère que l'argent joue un rôle clé dans l'interruption de ce processus. Les nanoparticules d'argent sont bien connues pour leur capacité à perturber l'adhésion des bactéries aux surfaces, une propriété démontrée dans plusieurs études, notamment par *Habash et al.* (2014), qui ont montré que les AgNPs inhibent l'adhésion initiale des bactéries à des surfaces abiotiques, réduisant ainsi la formation de biofilms précoces (*Franci et al.*, 2015). Les résultats de cette thèse corroborent ces observations et montrent que l'effet antibactérien des glycodendrimères n'est pas limité à l'inhibition de la croissance bactérienne mais inclut également l'empêchement de la formation de biofilm, un facteur crucial pour la virulence bactérienne. Les glycodendrimères chargés en métal ont également montré une capacité à interférer avec les interactions bactéries-bactéries, ce qui pourrait contribuer à leur activité antibactérienne. Ce phénomène est en accord avec la littérature sur les nanoparticules, qui ont été rapportées comme capables d'interrompre la communication bactérienne (quorum sensing) et de modifier l'agrégation bactérienne. Cette interférence pourrait s'expliquer par la capacité des glycodendrimères à perturber les systèmes de communication intercellulaire des bactéries, notamment les systèmes de quorum sensing, régulant la production de virulence et la formation de biofilms. En modifiant la disponibilité des signaux auto-

inducteurs (AHLs), ou en interférant avec leur perception via des récepteurs membranaires bactériens, les glycodendrimères métalliques pourraient empêcher la coordination des comportements collectifs, comme l'agrégation, la mobilité ou la sécrétion de toxines (Franci *et al.*, 2015). De plus, la perturbation des interactions interbactériennes pourrait résulter d'effets électrostatiques ou d'encombrement stérique liés à la surface ramifiée des glycodendrimères, limitant physiquement les contacts cellule-cellule, comme suggéré dans d'autres travaux sur les nanomatériaux fonctionnalisés. Les résultats suggèrent que les glycodendrimères pourraient agir non seulement en perturbant la paroi cellulaire, mais aussi en influençant la manière dont les bactéries interagissent entre elles, une approche potentiellement innovante pour lutter contre les infections bactériennes. L'une des conclusions importantes de cette thèse est que les glycodendrimères chargés en argent (D:Ag) ont montré des effets bactéricides plus forts que la phosphomycine et la gentamycine, deux antibiotiques utilisés pour traiter *ETEC*. Cette observation souligne l'énorme potentiel des glycodendrimères métalliques comme alternatives ou compléments aux traitements antibiotiques traditionnels. De plus, les glycodendrimères pourraient offrir l'avantage supplémentaire de cibler spécifiquement des bactéries pathogènes tout en minimisant l'impact sur la flore bactérienne normale. Bien que les résultats soient prometteurs, certaines limites doivent être prises en compte. Par exemple, l'effet à long terme des glycodendrimères sur la santé humaine et leur biodisponibilité nécessitent des investigations approfondies. De plus, la stabilité des glycodendrimères dans des conditions physiologiques, ainsi que leur toxicité potentielle pour les cellules humaines, devrait être évaluée dans des études précliniques. Une seconde classe de dendrimères peuvent être conçus pour avoir une structure amphiphile, permettant d'optimiser l'interaction avec les membranes biologiques et de réduire ainsi la toxicité systémique. Par exemple, la modification de dendrimères par des groupes hydrophobes et hydrophiles favorise leur interaction avec les membranes bactériennes, tout en permettant une libération ciblée des molécules actives au niveau des sites d'infection. Dans le cadre de la lutte contre les infections bactériennes, en particulier celles causées

par des souches résistantes comme *Escherichia coli* entérotoxigénique, l'utilisation de dendrimères amphiphiles chargés de métaux zéro-valents tels que le cuivre (Cu^0) et l'argent (Ag^0) pourrait offrir une alternative prometteuse aux traitements antibiotiques traditionnels. Ces dendrimères présentent l'avantage de réduire la toxicité pour les cellules humaines tout en maintenant une activité antibactérienne élevée, en particulier lorsqu'ils sont utilisés pour délivrer des ions métalliques dans leur forme active. L'intégration de métaux zéro-valents dans ces dendrimères permettrait de surmonter certains des défis associés à l'utilisation de métaux sous forme ionique, tels que la nécessité de libérer les ions métalliques actifs, comme c'est le cas pour l'argent, dont la forme métallique (Ag^0) est moins réactive que sa forme ionique (Ag^+). De plus, les dendrimères amphiphiles chargés de métaux peuvent offrir une libération contrôlée de ces ions en réponse à des changements dans l'environnement biologique, permettant ainsi de minimiser l'impact toxique sur les cellules humaines tout en maximisant l'efficacité antibactérienne contre les pathogènes cibles. Toutefois, la question de la biocompatibilité de ces systèmes hybrides reste cruciale. Des études ont montré que les nanoparticules d'argent (AgNPs), bien qu'efficaces, peuvent induire un stress oxydatif important, des lésions de l'ADN, une apoptose, voire une cytotoxicité aiguë vis-à-vis de cellules humaines, notamment celles issues de la peau, du foie, du cerveau ou des voies respiratoires (Ferdous et Nemmar, 2020). De manière similaire, les nanoparticules de cuivre (CuNPs) sont capables de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraînant des altérations cellulaires. Par ailleurs, la toxicité des dendrimères dépend fortement de leur structure centrale, de leur taille (génération), de leur concentration, et surtout de leur charge de surface : les dendrimères cationiques peuvent perturber les membranes cellulaires, provoquer une hémolyse, une agrégation plaquettaire ou encore induire la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que $\text{TNF-}\alpha$ ou IL-6. Enfin, l'association des dendrimères avec des nanoparticules métalliques peut engendrer des effets synergiques qui, s'ils améliorent l'efficacité antibactérienne, peuvent également exacerber la toxicité. Il est donc essentiel de mener

des études précliniques approfondies pour évaluer ces risques et optimiser les paramètres de formulation.

5.2 CONCLUSIONS

Le concept de la recherche était de réaliser des dendrimères greffés avec des métaux de cuivre et d'argent sous la forme zéro-valente et possiblement sous la forme chargée pour être des potentiels composés antibactériens. Les dendrimères synthétisés doivent être susceptibles de bénéficier initialement de caractéristiques antibactériennes intrinsèques afin de permettre une augmentation de cette efficacité après leurs fonctionnalisations avec des métaux. La première partie du projet consistait à synthétiser des glycodendrimères dotés d'un cœur à base d'acide gallique et de groupements fonctionnels mannosylés. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que glycodendrimères avaient la capacité d'héberger des ions métalliques sous forme zéro-valente, notamment le cuivre (Cu^0) et l'argent (Ag^0), ce qui a permis une augmentation des leurs propriétés antibactériennes, notamment contre bactéries *ETEC*. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que ces glycodendrimères avaient une activité antibactérienne intéressante contre *E. coli*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) bien inférieures à celles d'antibiotiques couramment utilisés. L'introduction de métaux sous leur forme zéro-valente a ainsi permis d'amplifier l'activité, avec une efficacité antibactérienne particulièrement marquée pour les glycodendrimères chargés en argent.

Ces résultats suggèrent que la modification de la structure des dendrimères, avec l'intégration de ces métaux, pourrait être une stratégie efficace pour améliorer l'efficacité des traitements contre les infections bactériennes résistantes. Les futures recherches pourraient explorer l'optimisation des formulations de glycodendrimères pour améliorer leur efficacité antibactérienne, ainsi que leur capacité à pénétrer les biofilms complexes. Une autre voie prometteuse serait d'examiner la synergie entre les

glycodendrimères et d'autres agents antimicrobiens ou thérapeutiques pour contrer la résistance bactérienne.

La seconde partie du projet consistait à synthétiser des dendrimères amphiphiles comportant une partie hydrophobe constituée de chaînes lipidiques et une partie hydrophile, fonctionnalisés avec des métaux cationiques et zéro-valent (Cu^{2+} , Ag^+ , Cu^0 , Ag^0), dans le but d'évaluer leur potentiel en tant qu'agents antibactériens alternatifs aux antibiotiques traditionnels. Ces dendrimères ont montré un intérêt particulier pour lutter contre certaines infections bactériennes, notamment *Escherichia coli* entérotoxigène Fimbriae 4 (ETEC:F4), tout en réduisant le risque de résistance bactérienne. L'intégration des métaux sous leurs formes ioniques et de valence nulle a permis d'offrir une approche novatrice potentielle face aux infections bactériennes. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contrer l'émergence de la résistance aux antibiotiques classiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K. et Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale research letters*, 9, 1-10.
- Abdel-Sayed, P., Kaeppli, A., Siriwardena, T., Darbre, T., Perron, K., Jafari, P., Reymond, J.-L., Pioletti, D. P. et Applegate, L. A. (2016). Anti-microbial dendrimers against multidrug-resistant *P. aeruginosa* enhance the angiogenic effect of biological burn-wound bandages. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Abdelhamid, A. G. et Yousef, A. E. (2023). Combating bacterial biofilms: current and emerging antibiofilm strategies for treating persistent infections. *Antibiotics*, 12(6), 1005.
- Ameen, F., Alsamhary, K., Alabdullatif, J. A. et Alnadhari, S. (2021, 2021/04/15/). A review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112027.
- An, H., Deng, X., Wang, F., Xu, P. et Wang, N. (2023). Dendrimers as nanocarriers for the delivery of drugs obtained from natural products. *Polymers*, 15(10), 2292.
- Appeldoorn, C. C. M., Joosten, J. A. F., Ait el Maate, F., Dobrindt, U., Hacker, J., Liskamp, R. M. J., Khan, A. S. et Pieters, R. J. (2005, 2005/01/24/). Novel multivalent mannose compounds and their inhibition of the adhesion of type 1 fimbriated uropathogenic *E. coli*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16(2), 361-372.
- Arthi, P., Dharmasivam, M., Kaya, B. et Rahiman, A. K. (2023). Multi-target activity of copper complexes: Antibacterial, DNA binding, and molecular docking with SARS-CoV-2 receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 373, 110349.
- Badjić, J. D., Nelson, A., Cantrill, S. J., Turnbull, W. B. et Stoddart, J. F. (2005). Multivalency and cooperativity in supramolecular chemistry. *Accounts of chemical research*, 38(9), 723-732.
- Bin, P., Tang, Z., Liu, S., Chen, S., Xia, Y., Liu, J., Wu, H. et Zhu, G. (2018). Intestinal microbiota mediates Enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in piglets. *BMC veterinary research*, 14, 1-13.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. et Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42-51.
- Boyd, N. et Nailor, M. D. (2011). Combination antibiotic therapy for empiric and definitive treatment of gram - negative infections: insights from the Society of

- Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 31(11), 1073-1084.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buhleier, E., Wehner, W. et VÖGtle, F. (1978, //
- 12.09.2002). "Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis*, 1978(02), 155-158.
- Burtis, C. A. et Bruns, D. E. (2014). *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*. Elsevier Health Sciences.
- Bush, K. et Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247.
- Calderon Toledo, C., von Mentzer, A., Agramont, J., Thorell, K., Zhou, Y., Szabó, M., Colque, P., Kuhn, I., Gutiérrez-Cortez, S. et Joffré, E. (2023). Circulation of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) isolates expressing CS23 from the environment to clinical settings. *Msystems*, 8(5), e00141-00123.
- Calvori, C., Frontali, L., Leoni, L. et Tecce, G. (1965, 1965/07/01). Effect of Rifamycin on Protein Synthesis. *Nature*, 207(4995), 417-418.
- Caminade, A.-M., Ouali, A., Laurent, R., Turrin, C.-O. et Majoral, J.-P. (2016). Coordination chemistry with phosphorus dendrimers. Applications as catalysts, for materials, and in biology. *Coordination Chemistry Reviews*, 308, 478-497.
- Castro, J., Barros, M. M., Araújo, D., Campos, A. M., Oliveira, R., Silva, S. et Almeida, C. (2022). Swine enteric colibacillosis: Current treatment avenues and future directions. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 981207.
- Căta, A., Ienașcu, I. M. C., Ștefănuț, M. N., Roșu, D. et Pop, O.-R. (2023). Properties and bioapplications of amphiphilic janus dendrimers: A Review. *Pharmaceutics*, 15(2), 589.
- Chabre, Y. M. et Roy, R. (2010). Chapter 6 - Design and Creativity in Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates. Dans D. Horton (dir.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (vol. 63, p. 165-393). Academic Press.
- Chabre, Y. M. et Roy, R. (2013). Multivalent glycoconjugate syntheses and applications using aromatic scaffolds. *Chemical Society Reviews*, 42(11), 4657-4708.
- Chen, J., Zhu, D., Liu, X. et Peng, L. (2022). Amphiphilic dendrimer vectors for RNA delivery: State-of-the-art and future perspective. *Accounts of Materials Research*, 3(5), 484-497.
- Cheng, H.-F., Xing, W., Zhang, B., Yu, J. et Cheng, X.-H. (2018, 2018/05/31/). Bisphenylsulfone-based polycatenar mesogens via CuAAC click reaction: Self-assembly and their applications in water purification. *Tetrahedron*, 74(22), 2735-2742.

- Chis, A. A., Dobrea, C., Morgovan, C., Arseniu, A. M., Rus, L. L., Butuca, A., Juncan, A. M., Totan, M., Vonica-Tincu, A. L. et Cormos, G. (2020). Applications and limitations of dendrimers in biomedicine. *Molecules*, 25(17), 3982.
- Chopra, I. et Roberts, M. (2001, Jun). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2), 232-260 ; second page, table of contents.
- Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E. et Vannuffel, P. (1997, May). Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 39 Suppl A, 7-13.
- Costantino, P., Rappuoli, R. et Berti, F. (2011). The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 6(10), 1045-1066.
- Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, 264(1), 4-16.
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S. et Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in microbiology*, 7, 1831.
- de la Mata, F. J., Gómez, R., Cano, J., Sánchez - Nieves, J., Ortega, P. et Gallego, S. G. (2023). Carbosilane dendritic nanostructures, highly versatile platforms for pharmaceutical applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 15(3), e1871.
- Deraedt, C., Ye, R., Ralston, W. T., Toste, F. D. et Somorjai, G. A. (2017). Dendrimer-stabilized metal nanoparticles as efficient catalysts for reversible dehydrogenation/hydrogenation of N-heterocycles. *Journal of the American Chemical Society*, 139(49), 18084-18092.
- Dhumal, D., Maron, B., Malach, E., Lyu, Z., Ding, L., Marson, D., Laurini, E., Tintaru, A., Ralahy, B. et Giorgio, S. (2022). Dynamic self-assembling supramolecular dendrimer nanosystems as potent antibacterial candidates against drug-resistant bacteria and biofilms. *Nanoscale*, 14(26), 9286-9296.
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British journal of pharmacology*, 174(18), 2967-2983.
- Donadio, S. et Sosio, M. (2009). Glycopeptides, Antimicrobial. Dans M. Schaechter (dir.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (p. 455-471). Academic Press.
- Dubreuil, J. D. (2013). Antibacterial and antidiarrheal activities of plant products against enterotoxinogenic *Escherichia coli*. *Toxins*, 5(11), 2009-2041.
- Dubreuil, J. D. (2021). Pig vaccination strategies based on enterotoxinogenic *Escherichia coli* toxins. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 2499-2509.
- Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E. et Schifferli, D. M. (2016). Animal enterotoxinogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1), 10.1128/ecosalplus. ESP-0006-2016.
- Edr, A., Wrobel, D., Krupková, A., Šťastná, L. Č., Cuřínová, P., Novák, A., Malý, J., Kalasová, J., Malý, J. et Malý, M. (2022). Adaptive Synthesis of Functional

- Amphiphilic Dendrons as a Novel Approach to Artificial Supramolecular Objects. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2114.
- El Riz, A., Tchoumi Neree, A., Mousavifar, L., Roy, R., Chorfi, Y. et Mateescu, M. A. (2024). Metallo-Glycodendrimeric Materials against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 12(5), 966.
- Ercumen, A., Pickering, A. J., Kwong, L. H., Arnold, B. F., Parvez, S. M., Alam, M., Sen, D., Islam, S., Kullmann, C. et Chase, C. (2017). Animal feces contribute to domestic fecal contamination: evidence from *E. coli* measured in water, hands, food, flies, and soil in Bangladesh. *Environmental science & technology*, 51(15), 8725-8734.
- Eriksen, E. Ø., Kudirkiene, E., Barington, K., Goecke, N. B., Blirup-Plum, S. A., Nielsen, J. P., Olsen, J. E., Jensen, H. E., Pankoke, K. et Larsen, L. E. (2023). An observational field study of porcine post-weaning diarrhea: clinical and microbiological findings, and fecal pH-measurements as a potential diagnostic tool. *Porcine Health Management*, 9(1), 33.
- Evans, R. A. (2007). The rise of azide–alkyne 1, 3-dipolar ‘click’ cycloaddition and its application to polymer science and surface modification. *Australian Journal of Chemistry*, 60(6), 384-395.
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. et Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*, 2(1), 40-61.
- Fairbrother, J. M. et Nadeau, É. (2019). Colibacillosis. *Diseases of swine*, 807-834.
- Fairbrother, J. M., Nadeau, É. et Gyles, C. L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal health research reviews*, 6(1), 17-39.
- Falanga, A., Del Genio, V. et Galdiero, S. (2021). Peptides and dendrimers: How to combat viral and bacterial infections. *Pharmaceutics*, 13(1), 101.
- Fasting, C., Schalley, C. A., Weber, M., Seitz, O., Hecht, S., Koksche, B., Dervede, J., Graf, C., Knapp, E. W. et Haag, R. (2012). Multivalency as a chemical organization and action principle. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(42), 10472-10498.
- Ferdous, Z. et Nemmar, A. (2020). Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2375.
- Fernandes, G., Pandey, A., Kulkarni, S., Mutalik, S. P., Nikam, A. N., Seetharam, R. N., Kulkarni, S. S. et Mutalik, S. (2021, 2021/08/01/). Supramolecular dendrimers based novel platforms for effective oral delivery of therapeutic moieties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 64, 102647.
- Ferreira, V., Magalhães, R., Teixeira, P., Castro, P. M. L. et Calheiros, C. S. C. (2022). Occurrence of fecal bacteria and zoonotic pathogens in different water bodies: Supporting water quality management. *Water*, 14(5), 780.
- Ficerman, W., Wiśniewski, M. et Roszek, K. (2022). Interactions of nanomaterials with cell signalling systems—focus on purines-mediated pathways. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 220, 112919.

- Flores, M. J., Brandi, R. J., Cassano, A. E. et Labas, M. D. (2012). Chemical disinfection with H₂O₂– The proposal of a reaction kinetic model. *Chemical engineering journal*, 198, 388-396.
- Flory, P. J. (1941). Molecular size distribution in three dimensional polymers. I. Gelation1. *Journal of the American Chemical Society*, 63(11), 3083-3090.
- Flory, P. J. (1942). Constitution of Three-dimensional Polymers and the Theory of Gelation. *The Journal of Physical Chemistry*, 46(1), 132-140.
- Floss, H. G. et Yu, T.-W. (2005). Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical reviews*, 105(2), 621-632.
- Fox, L. J., Richardson, R. M. et Briscoe, W. H. (2018). PAMAM dendrimer-cell membrane interactions. *Advances in colloid and interface science*, 257, 1-18.
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G. et Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856-8874.
- Friedman, N. D., Temkin, E. et Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical microbiology and infection*, 22(5), 416-422.
- Galanakou, C., Dhumal, D. et Peng, L. (2023). Amphiphilic dendrimers against antibiotic resistance: light at the end of the tunnel? *Biomaterials Science*, 11(10), 3379-3393.
- Ghaffari, M., Dehghan, G., Abedi-Gaballu, F., Kashanian, S., Baradaran, B., Dolatabadi, J. E. N. et Losic, D. (2018). Surface functionalized dendrimers as controlled-release delivery nanosystems for tumor targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122, 311-330.
- Ghai, I. et Ghai, S. (2017). Exploring bacterial outer membrane barrier to combat bad bugs. *Infection and drug resistance*, 261-273.
- Gorzakiewicz, M., Konopka, M., Janaszewska, A., Tarasenko, I. I., Sheveleva, N. N., Gajek, A., Neelov, I. M. et Klajnert-Maculewicz, B. (2020). Application of new lysine-based peptide dendrimers D3K2 and D3G2 for gene delivery: Specific cytotoxicity to cancer cells and transfection in vitro. *Bioorganic Chemistry*, 95, 103504.
- Greiner, M. T., Chai, L., Helander, M. G., Tang, W. M. et Lu, Z. H. (2012). Transition metal oxide work functions: the influence of cation oxidation state and oxygen vacancies. *Advanced Functional Materials*, 22(21), 4557-4568.
- Gruzdev, M., Chervonova, U., Akopova, O. et Kolker, A. (2015). Synthesis and phase behavior of dendrons derived from 3, 4, 5-tris (tetradecyloxy) benzoic acid with different functional groups in focal point. *Journal of Chemical Sciences*, 127, 1801-1810.
- Hao, Z., Wang, M., Cheng, L., Si, M., Feng, Z. et Feng, Z. (2024). Synergistic antibacterial mechanism of silver-copper bimetallic nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1337543.
- Harris, E. D. (1990). Transport of Copper. (p. 421-424). Trace Elements in Clinical Medicine: Proceedings of the Second Meeting of the International Society for

- Trace Element Research in Humans (ISTERH) August 28–September 1, 1989, Tokyo, Springer.
- Hawker, C. J. et Frechet, J. M. (1990). Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 112(21), 7638-7647.
- Heidary, M., Khosravi, A. D., Khoshnood, S., Nasiri, M. J., Soleimani, S. et Goudarzi, M. (2018, Jan 1). Daptomycin. *J Antimicrob Chemother*, 73(1), 1-11.
- Hooper, D. C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases*, 31(Supplement_2), S24-S28.
- Hoyos, P., Perona, A., Juanes, O., Rumbero, Á. et Hernáiz, M. J. (2021). Synthesis of glycodendrimers with antiviral and antibacterial activity. *Chemistry—A European Journal*, 27(28), 7593-7624.
- Hrala, M., Bosák, J., Micenková, L., Křenová, J., Lexa, M., Pirková, V., Tomáščíková, Z., Koláčková, I. et Šmajš, D. (2021). Escherichia coli strains producing selected bacteriocins inhibit porcine enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) under both in vitro and in vivo conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(14), e03121-03120.
- Huisgen, R. (1961). Proceedings of the Chemical Society. October 1961. Proc. Chem. Soc,
- Hunter, C. et Anderson, H. (2009). What is cooperativity? *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(41).
- Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., Weaver, N. D., Wool, E. E., Han, C. et Hayoon, A. G. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221-2248.
- Ioannou, P., Baliou, S. et Samonis, G. (2024). Nanotechnology in the Diagnosis and Treatment of Antibiotic-Resistant Infections. *Antibiotics*, 13(2), 121.
- Ishak, A., Mazonakis, N., Spervasilis, N., Akinosoglou, K. et Tsioutis, C. (2024). Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkae380.
- Islam, M. T., Majoros, I. J. et Baker Jr, J. R. (2005). HPLC analysis of PAMAM dendrimer based multifunctional devices. *Journal of Chromatography B*, 822(1-2), 21-26.
- Jack, D. et Turner, M. (2003). Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochemical Society Transactions*, 31(4), 753-757.
- Jaiswal, S., McHale, P. et Duffy, B. (2012). Preparation and rapid analysis of antibacterial silver, copper and zinc doped sol–gel surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 170-176.
- Janaszewska, A., Lazniewska, J., Trzepiński, P., Marcinkowska, M. et Klajnert-Maculewicz, B. (2019, Aug 1). Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules*, 9(8).

- Kamat, S. et Kumari, M. (2023). Emergence of microbial resistance against nanoparticles: Mechanisms and strategies. *Frontiers in microbiology*, 14, 1102615.
- Kane, R. S. (2010). Thermodynamics of multivalent interactions: influence of the linker. *Langmuir*, 26(11), 8636-8640.
- Karakhanov, E., Maximov, A. et Zolotukhina, A. (2022). Heterogeneous dendrimer-based catalysts. *Polymers*, 14(5), 981.
- Kaur, M., Khatkar, S., Singh, B., Kumar, A. et Dubey, S. K. (2023). Recent Advancements in Sensing of Silver ions by Different Host Molecules: An Overview (2018–2023). *Journal of Fluorescence*, 1-23.
- Kenguva, G., Bandaru, R., Rout, S. R., Greish, K., Kesharwani, P. et Dandela, R. (2022). Chapter 10 - Combination drug delivery approaches for cancer therapy. Dans P. Kesharwani (dir.), *Combination Drug Delivery Approach as an Effective Therapy for Various Diseases* (p. 213-237). Academic Press.
- Kesharwani, P. (2022). *Combination Drug Delivery Approach as an Effective Therapy for Various Diseases*. Academic Press.
- Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E. et Strong, L. E. (2000). Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions. *Current opinion in chemical biology*, 4(6), 696-703.
- Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E. et Strong, L. E. (2006). Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(15), 2348-2368.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H. et Hwang, C.-Y. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, 3(1), 95-101.
- Kim, K., Song, M., Liu, Y. et Ji, P. (2022). Enterotoxigenic Escherichia coli infection of weaned pigs: Intestinal challenges and nutritional intervention to enhance disease resistance. *Frontiers in immunology*, 13, 885253.
- Klajnert, B. et Bryszewska, M. (2001). Dendrimers: properties and applications. *Acta biochimica polonica*, 48(1), 199-208.
- Klein, R. (2018). *Screening and structure-based design of novel ligands for FabF and KPC-2: first steps to counteract an antibiotic crisis* Johannes Gutenberg-Universität Mainz].
- Knapp, C. W., Dolfing, J., Ehlert, P. A. et Graham, D. W. (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental science & technology*, 44(2), 580-587.
- Kolb, H. C., Finn, M. et Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), 2004-2021.
- Kotrange, H., Najda, A., Bains, A., Gruszecki, R., Chawla, P. et Tosif, M. M. (2021, Sep 4). Metal and Metal Oxide Nanoparticle as a Novel Antibiotic Carrier for the Direct Delivery of Antibiotics. *Int J Mol Sci*, 22(17).

- Laird, T. J., Abraham, S., Jordan, D., Pluske, J. R., Hampson, D. J., Trott, D. J. et O'Dea, M. (2021). Porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*: Antimicrobial resistance and development of microbial-based alternative control strategies. *Veterinary Microbiology*, 258, 109117.
- Latha, S. et Selvamani, P. (2015). Dendrimers: Multifunctional Drug Delivery Carriers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5, 1960-1972(1913).
- Lee, C., Kim, J. Y., Lee, W. I., Nelson, K. L., Yoon, J. et Sedlak, D. L. (2008, 2008/07/01). Bactericidal Effect of Zero-Valent Iron Nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environmental science & technology*, 42(13), 4927-4933.
- Leisner, J. J. (2020). The diverse search for synthetic, semisynthetic and natural product antibiotics from the 1940s and up to 1960 exemplified by a small pharmaceutical player. *Frontiers in microbiology*, 11, 976.
- Li, J., Zacharek, S., Chen, X., Wang, J., Zhang, W., Janczuk, A. et Wang, P. G. (1999). Bacteria targeted by human natural antibodies using α -Gal conjugated receptor-specific glycopolymers. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 7(8), 1549-1558.
- Li, K., Guan, G., Zhu, J., Wu, H. et Sun, Q. (2019). Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan-gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 96, 234-243.
- Liu, J., Sonshine, D. A., Shervani, S. et Hurt, R. H. (2010, 2010/11/23). Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano*, 4(11), 6903-6913.
- Liu, Y., Li, R., Xiao, X. et Wang, Z. (2018). Molecules that inhibit bacterial resistance enzymes. *Molecules*, 24(1), 43.
- Llor, C. et Bjerrum, L. (2014, Dec). Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf*, 5(6), 229-241.
- Loskill, P., Pereira, P. M., Jung, P., Bischoff, M., Herrmann, M., Pinho, M. G. et Jacobs, K. (2014). Reduction of the peptidoglycan crosslinking causes a decrease in stiffness of the *Staphylococcus aureus* cell envelope. *Biophysical journal*, 107(5), 1082-1089.
- Mahaseth, T. et Kuzminov, A. (2017). Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 274-281.
- Makii, J. M., Traeger, J. et Delic, J. (2022). Chapter 8 - Antimicrobial prophylaxis. Dans H. Prabhakar (dir.), *Essentials of Evidence-Based Practice of Neuroanesthesia and Neurocritical Care* (p. 77-88). Academic Press.
- Mammen, M., Choi, S. K. et Whitesides, G. M. (1998). Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(20), 2754-2794.
- Marambio-Jones, C. et Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1531-1551.

- Márquez-Miranda, V., Araya-Durán, I., Camarada, M. B., Comer, J., Valencia-Gallegos, J. A. et González-Nilo, F. D. (2016). Self-assembly of amphiphilic dendrimers: The role of generation and alkyl chain length in siRNA interaction. *Scientific reports*, 6(1), 29436.
- Martin, M., Manea, F., Fiammengio, R., Prins, L. J., Pasquato, L. et Scrimin, P. (2007). Metallodendrimers as transphosphorylation catalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 129(22), 6982-6983.
- Matías, J., Berzosa, M., Pastor, Y., Irache, J. M. et Gamazo, C. (2017). Maternal vaccination. immunization of sows during pregnancy against ETEC Infections. *Vaccines*, 5(4), 48.
- Matías, J., Pastor, Y., Irache, J. M. et Gamazo, C. (2020). Protective passive immunity in Escherichia coli ETEC-challenged neonatal mice conferred by orally immunized dams with nanoparticles containing homologous outer membrane vesicles. *Vaccines*, 8(2), 286.
- Melkebeek, V., Goddeeris, B. M. et Cox, E. (2013). ETEC vaccination in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), 37-42.
- Meyers, S. R., Juhn, F. S., Griset, A. P., Luman, N. R. et Grinstaff, M. W. (2008). Anionic amphiphilic dendrimers as antibacterial agents. *Journal of the American Chemical Society*, 130(44), 14444-14445.
- Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., Arimondo, P. B., Glaser, P., Aigle, B. et Bode, H. B. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, 5(10), 726-749.
- Mintzer, M. A., Dane, E. L., O'Toole, G. A. et Grinstaff, M. W. (2012). Exploiting dendrimer multivalency to combat emerging and re-emerging infectious diseases. *Molecular pharmaceuticals*, 9(3), 342-354.
- Mintzer, M. A. et Grinstaff, M. W. (2011). Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chemical Society Reviews*, 40(1), 173-190.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T. et Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- Mousavifar, L., Lewicky, J. D., Taponard, A., Bagul, R., Rivat, M., Abdullayev, S., Martel, A. L., Fraleigh, N. L., Nakamura, A. et Veyrier, F. J. (2022). Synthesis & Evaluation of Novel Mannosylated Neoglycolipids for Liposomal Delivery System Applications. *Pharmaceutics*, 14(11), 2300.
- Mousavifar, L., Touaibia, M. et Roy, R. (2018, 2018/11/20). Development of Mannopyranoside Therapeutics against Adherent-Invasive Escherichia coli Infections. *Accounts of chemical research*, 51(11), 2937-2948.
- Mouton, J. (1999). Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. *Infection*, 27(Suppl 2), S24-S28.
- Mulder, A., Huskens, J. et Reinhoudt, D. N. (2004). Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication. *Organic & biomolecular chemistry*, 2(23), 3409-3424.

- Navez, M., Antoine, C., Laforêt, F., Goya-Jorge, E., Douny, C., Scippo, M.-L., Vermeersch, M., Duprez, J.-N., Daube, G. et Mainil, J. (2023). In Vitro Effect on Piglet Gut Microbiota and In Vivo Assessment of Newly Isolated Bacteriophages against F18 Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Viruses*, 15(5), 1053.
- Neises, B. et Steglich, W. (1978). Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(7), 522-524.
- Newkome, G. R., Yao, Z., Baker, G. R. et Gupta, V. K. (1985). Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *The Journal of Organic Chemistry*, 50(11), 2003-2004.
- Nguyen, T. H. T., Nguyen, H. D., Le, M. H., Nguyen, T. T. H., Nguyen, T. D., Nguyen, D. L., Nguyen, Q. H., Nguyen, T. K. O., Michalet, S. et Dijoux-Franca, M.-G. (2023). Efflux pump inhibitors in controlling antibiotic resistance: outlook under a heavy metal contamination context. *Molecules*, 28(7), 2912.
- Nikaido, H. et Takatsuka, Y. (2009, May). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 769-781.
- Noori, F., Megoura, M., Labelle, M.-A., Mateescu, M. A. et Azzouz, A. (2022). Synthesis of metal-loaded carboxylated biopolymers with antibacterial activity through metal subnanoparticle incorporation. *Antibiotics*, 11(4), 439.
- Noori, F., Neree, A. T., Megoura, M., Mateescu, M. A. et Azzouz, A. (2021). Insights into the metal retention role in the antibacterial behavior of montmorillonite and cellulose tissue-supported copper and silver nanoparticles. *RSC advances*, 11(39), 24156-24171.
- Oliveira, J. M., Salgado, A. J., Sousa, N., Mano, J. F. et Reis, R. L. (2010). Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—A review. *Progress in Polymer Science*, 35(9), 1163-1194.
- Ong, C. T. et Nicolau, D. P. (2004). Chapter 8 - Rationale and utility of therapeutic drug monitoring for the optimization of antibiotic therapy. Dans G. Hempel (dir.), *Handbook of Analytical Separations* (vol. 5, p. 195-219). Elsevier Science B.V.
- Ovung, A. et Bhattacharyya, J. (2021, Apr). Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophys Rev*, 13(2), 259-272.
- Padwa, A. et Pearson, W. H. (2003). *Synthetic applications of 1, 3-dipolar cycloaddition chemistry toward heterocycles and natural products* (vol. 59). John Wiley & Sons.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. et Cheng, Z. (2019, Jan-Feb). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*, 37(1), 177-192.
- Pardeshi, S., Gholap, A., More, M., Togle, N., Rebello, N. et Giram, P. (2023). Dendrimers Based Antibacterial and Antiviral Materials. Dans *Antibacterial and Antiviral Functional Materials, Volume 1* (p. 139-169). ACS Publications.
- Pasqua, M., Grossi, M., Zennaro, A., Fanelli, G., Micheli, G., Barras, F., Colonna, B. et Prosseda, G. (2019, Aug 22). The Varied Role of Efflux Pumps of the MFS

- Family in the Interplay of Bacteria with Animal and Plant Cells. *Microorganisms*, 7(9).
- Patel, P. H. et Hashmi, M. F. (2023). Macrolides. Dans *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Penakalapati, G., Swarthout, J., Delahoy, M. J., McAliley, L., Wodnik, B., Levy, K. et Freeman, M. C. (2017). Exposure to animal feces and human health: a systematic review and proposed research priorities. *Environmental science & technology*, 51(20), 11537-11552.
- Percec, V., Leowanawat, P., Sun, H.-J., Kulikov, O., Nusbaum, C. D., Tran, T. M., Bertin, A., Wilson, D. A., Peterca, M. et Zhang, S. (2013). Modular synthesis of amphiphilic Janus glycodendrimers and their self-assembly into glycodendrimersomes and other complex architectures with bioactivity to biomedically relevant lectins. *Journal of the American Chemical Society*, 135(24), 9055-9077.
- Pieters, R. J. (2007). Intervention with bacterial adhesion by multivalent carbohydrates. *Medicinal research reviews*, 27(6), 796-816.
- Pohl, P. C., Klafke, G. M., Carvalho, D. D., Martins, J. R., Daffre, S., da Silva Vaz, I., Jr. et Masuda, A. (2011, Nov). ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol*, 41(13-14), 1323-1333.
- Priel, S. (2023). The Spicy Science of Dendrimers in the Realm of Cancer Nanomedicine: A Report from the COST Action CA17140 Nano2Clinic. *Pharmaceutics*, 15(7), 2013.
- Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R. et Lu, M. (2015, 2015/08/06). Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nature communications*, 6(1), 7995.
- Rai, M., Yadav, A. et Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W. et Letellier, A. (2016). Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in microbiology*, 7, 1789.
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F. et Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59, 1-19.
- Rincón-Montón, D., Martínez-Salvador, D., Sánchez-Nieves, J., Gómez, R., de la Mata, F. J. et Cano, J. (2023). Removing lead from water with carboxylate dendrimers and magnetic nanoparticles modified with carboxylate dendrimers. *Applied Water Science*, 13(11), 208.
- Rispoli, F., Angelov, A., Badia, D., Kumar, A., Seal, S. et Shah, V. (2010). Understanding the toxicity of aggregated zero valent copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1-3), 212-216.
- Rispoli, G. (2009). Synthesis of multivalent glycoclusters for the selective inhibition of lectins and targeted imaging.

- Röckendorf, N. et Lindhorst, T. K. (2001). Glycodendrimers. *Dendrimers IV: Metal Coordination, Self Assembly, Catalysis*, 201-238.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. et Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I) - catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie*, 114(14), 2708-2711.
- Roy, R. et Touaibia, M. (2007). Application of multivalent mannosylated dendrimers in glycobiology. *Comprehensive Glycoscience*, 821.
- Rutala, W. A. et Weber, D. J. (2010). Guideline for disinfection and sterilization of prion-contaminated medical instruments. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(2), 107-117.
- Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A. et Alqumber, M. A. (2023). Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. (p. 1946). Healthcare, MDPI.
- Sanz del Olmo, N., Carloni, R., Ortega, P., García-Gallego, S. et de la Mata, F. J. (2020). Chapter One - Metallo-dendrimers as a promising tool in the biomedical field: An overview. Dans P. J. Pérez (dir.), *Advances in Organometallic Chemistry* (vol. 74, p. 1-52). Academic Press.
- Seeberger, P. H. et Werz, D. B. (2007). Synthesis and medical applications of oligosaccharides. *Nature*, 446(7139), 1046-1051.
- Sentamu, D. N., Kungu, J., Dione, M. et Thomas, L. F. (2023). Prevention of human exposure to livestock faecal waste in the household: a scoping study of interventions conducted in sub-Saharan Africa. *BMC Public Health*, 23(1), 1613.
- Sharma, R., Naresh, K., Chabre, Y. M., Rej, R., Saadeh, N. K. et Roy, R. (2014). “Onion peel” dendrimers: A straightforward synthetic approach towards highly diversified architectures. *Polymer Chemistry*, 5(14), 4321-4331.
- Sharma, R., Porterfield, J. E., An, H.-T., Jimenez, A. S., Lee, S., Kannan, S., Sharma, A. et Kannan, R. M. (2021). Rationally designed galactose dendrimer for hepatocyte-specific targeting and intracellular drug delivery for the treatment of liver disorders. *Biomacromolecules*, 22(8), 3574-3589.
- Shiabiev, I., Pysin, D., Akhmedov, A., Babaeva, O., Babaev, V., Lyubina, A., Voloshina, A., Petrov, K., Padnya, P. et Stoikov, I. (2023). Towards Antibacterial Agents: Synthesis and Biological Activity of Multivalent Amide Derivatives of Thiocalix [4] Arene with Hydroxyl and Amine Groups. *Pharmaceutics*, 15(12), 2731.
- Shivatara, S. S., Shivatara, V. S. et Wong, C.-H. (2022). Glycoconjugates: synthesis, functional studies, and therapeutic developments. *Chemical reviews*, 122(20), 15603-15671.
- Shutter, M. C. et Akhondi, H. (2019). Tetracycline.
- Singh, J., Jain, K., Mehra, N. K. et Jain, N. K. (2016, 2016/10/02). Dendrimers in anticancer drug delivery: mechanism of interaction of drug and dendrimers. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(7), 1626-1634.

- Singh, M. K., Singh, S., Patil, U. K. et Chauhan, A. S. (2024). Poly (amidoamine) dendrimers a 'soft polymer' for topical application of resveratrol: Ex-vivo & in-vivo study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 97, 105792.
- Singh, S., Ramesh, V., Premalatha, B., Prashad, K. V. et Ramadoss, K. (2013). Alterations in serum lipid profile patterns in oral cancer. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 4(2), 374.
- Singh, S. K., Mohammed, A., Alghamdi, O. A. et Husain, S. M. (2020). Chapter 12 - New approaches for targeting drug resistance through drug combination. Dans M. Y. Wani et A. Ahmad (dir.), *Combination Therapy Against Multidrug Resistance* (p. 221-246). Academic Press.
- Siriwardena, T. N., Stach, M., He, R., Gan, B.-H., Javor, S., Heitz, M., Ma, L., Cai, X., Chen, P. et Wei, D. (2018). Lipidated peptide dendrimers killing multidrug-resistant bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, 140(1), 423-432.
- Skrzyniarz, K., Kuc-Ciepluch, D., Lasak, M., Arabski, M., Sanchez-Nieves, J. et Ciepluch, K. (2023). Dendritic systems for bacterial outer membrane disruption as a method of overcoming bacterial multidrug resistance. *Biomaterials Science*, 11(19), 6421-6435.
- Sleiman, M., Varrot, A., Raimundo, J.-M., Gingras, M. et Goekjian, P. G. (2008). Glycosylated asterisks are among the most potent low valency inducers of Concanavalin A aggregation [10.1039/B814816C]. *Chemical communications*(48), 6507-6509.
- Sneideris, T., Erkamp, N. A., Ausserwöger, H., Saar, K. L., Welsh, T. J., Qian, D., Katsuya-Gaviria, K., Johncock, M. L., Krainer, G. et Borodavka, A. (2023). Targeting nucleic acid phase transitions as a mechanism of action for antimicrobial peptides. *Nature communications*, 14(1), 7170.
- Sowinska, M. et Urbanczyk-Lipkowska, Z. (2014). Advances in the chemistry of dendrimers. *New Journal of Chemistry*, 38(6), 2168-2203.
- Tian, Q., Wei, S., Su, H., Zheng, S., Xu, S., Liu, M., Bo, R. et Li, J. (2022). Bactericidal activity of gallic acid against multi-drug resistance Escherichia coli. *Microbial Pathogenesis*, 173, 105824.
- Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J. et Smith, P. (1985). A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules. *Polymer journal*, 17(1), 117-132.
- Touaibia, M. et Roy, R. (2007). Glycodendrimers as anti-adhesion drugs against type 1 fimbriated E. coli uropathogenic infections. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 7(12), 1270-1283.
- Touaibia, M., Wellens, A., Shiao, T. C., Wang, Q., Sirois, S., Bouckaert, J. et Roy, R. (2007). Mannosylated G(0) Dendrimers with Nanomolar Affinities to Escherichia coli FimH. *ChemMedChem*, 2(8), 1190-1201.
- Turel, I. et Kljun, J. (2011). Interactions of metal ions with DNA, its constituents and derivatives, which may be relevant for anticancer research. *Curr Top Med Chem*, 11(21), 2661-2687.

- Turel, I. et Kljun, J. (2011). Interactions of metal ions with DNA, its constituents and derivatives, which may be relevant for anticancer research. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(21), 2661-2687.
- Twyman, L. J., King, A. S. et Martin, I. K. (2002). Catalysis inside dendrimers. *Chemical Society Reviews*, 31(2), 69-82.
- Uhl, L. et Dukan, S. (2016). Hydrogen peroxide induced cell death: the major defences relative roles and consequences in *E. coli*. *PloS one*, 11(8), e0159706.
- Uhl, L., Gerstel, A., Chabalier, M. et Dukan, S. (2015). Hydrogen peroxide induced cell death: One or two modes of action? *Heliyon*, 1(4).
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A. et Osek, J. (2022). Antibiotic resistance in bacteria—A review. *Antibiotics*, 11(8), 1079.
- van Ameijde, J. et Liskamp, R. M. (2003). Synthesis of novel trivalent amino acid glycoconjugates based on the cyclotrimeratrylene ('CTV') scaffold. *Organic & biomolecular chemistry*, 1(15), 2661-2669.
- van Bambeke, F., Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y. et Tulkens, P. M. (2017). 137 - Mechanisms of Action. Dans J. Cohen, W. G. Powderly et S. M. Opal (dir.), *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (p. 1162-1180.e1161). Elsevier.
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A. et Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet infectious diseases*, 14(8), 742-750.
- Villanueva-Flores, F., Castro-Lugo, A., Ramírez, O. T. et Palomares, L. A. (2020). Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational design of medical nanodevices. *Nanotechnology*, 31(13), 132002.
- Viswanath, V. et Santhakumar, K. (2017). Perspectives on dendritic architectures and their biological applications: From core to cell. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 173, 61-83.
- Wei, Y., Chen, S., Kowalczyk, B., Huda, S., Gray, T. P. et Grzybowski, B. A. (2010). Synthesis of stable, low-dispersity copper nanoparticles and nanorods and their antifungal and catalytic properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(37), 15612-15616.
- Wiener, E., Brechbiel, M., Brothers, H., Magin, R., Gansow, O., Tomalia, D. et Lauterbur, P. (1994). Dendrimer - based metal chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magnetic resonance in medicine*, 31(1), 1-8.
- Wills, E. D. (1985). Chapter 43 - Principles of chemotherapy. Dans E. D. Wills (dir.), *Biochemical Basis of Medicine* (p. 540-558). Butterworth-Heinemann.
- Winnicka, K., Wroblewska, M., Wieczorek, P., Sacha, P. T. et Tryniszewska, E. A. (2013). The effect of PAMAM dendrimers on the antibacterial activity of antibiotics with different water solubility. *Molecules*, 18(7), 8607-8617.

- Xu, Z., Zhang, C., Wang, X. et Liu, D. (2021). Release strategies of silver ions from materials for bacterial killing. *ACS applied bio materials*, 4(5), 3985-3999.
- Zajac, M., Kotyńska, J., Zambrowski, G., Breczko, J., Deptuła, P., Cieśluk, M., Zambrzycka, M., Święcicka, I., Bucki, R. et Naumowicz, M. (2023). Exposure to polystyrene nanoparticles leads to changes in the zeta potential of bacterial cells. *Scientific reports*, 13(1), 9552.
- Zeng, X., Cseh, L., Mehl, G. H. et Ungar, G. (2008). Testing the triple network structure of the cubic Im 3 [combining macron] m (I) phase by isomorphous replacement and model refinement. *Journal of Materials Chemistry*, 18(25), 2953-2961.
- Zessel, K., Mohring, S., Hamscher, G., Kietzmann, M. et Stahl, J. (2014). Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere*, 100, 167-174.
- Zhang, F. et Cheng, W. (2022). The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. *Antibiotics*, 11(9), 1215.
- Zhang, S. et Zhao, Y. (2011). Controlled release from cleavable polymerized liposomes upon redox and pH stimulation. *Bioconjugate chemistry*, 22(4), 523-528.
- Zhang, W., Dhumal, D., Zhu, X., Ralahy, B., Ellert - Miklaszewska, A., Wu, J., Laurini, E., Yao, Y. W., Kao, C. L. et Iovanna, J. L. (2022). Bola - Amphiphilic Glycodendrimers: New Carbohydrate - Mimicking Scaffolds to Target Carbohydrate - Binding Proteins. *Chemistry - A European Journal*, 28(58), e202201400.