



Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum* : identification, synthèse et applications

Samuel Bertrand

► To cite this version:

Samuel Bertrand. Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum* : identification, synthèse et applications. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Angers, 2009. Français. NNT : . tel-00466113

HAL Id: tel-00466113

<https://theses.hal.science/tel-00466113>

Submitted on 22 Mar 2010

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

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

**Les sidérophores de *Scedosporium*
apiospermum : identification, synthèse et
applications**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie des Biomolécules - Synthèse, Structure et Réactivité

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le 28 Septembre 2009

à l'UFR de Pharmacie et Ingénierie de la Santé d'Angers

par Samuel BERTRAND

Devant le jury ci-dessous :

M. Jean Michel CAMADRO (rapporteur) : Directeur de Recherche, Université Paris Diderot

M. Pascal SONNET (rapporteur) : Professeur, Université de Picardie Jules Verne

M. Mohamed El Hourch (examinateur) : Docteur, Directeur de BioAgroPolis et Directeur
de l'Institut en Santé Agro-Environnement

M. Bruno Le Bizec (examinateur) : Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

Directeur de Thèse : M. Olivier DUVAL, Professeur, Université d'Angers

Co-encadrant : M. Gérard LARCHER, Maître de Conférences, Université d'Angers

Laboratoire SONAS, UPRES-EA921

UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé

16, Boulevard Daviers, 49045 ANGERS – France

Remerciements

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration entre deux laboratoires de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé de l'université d'Angers : le laboratoire SONAS (UPRES-EA 921) des Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux et le GEIHP (UPRES-EA 3142) Groupement d'Étude des Interactions Hôte-Pathogène. Cette collaboration autour de ce projet a été encadrée par le Professeur Olivier Duval et le Docteur Gérard Larcher.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur Olivier Duval pour m'avoir dirigé pendant ces cinq années malgré ses autres obligations qui se sont faites de plus en plus pesantes. Vos nombreux conseils avisés sur la chimie et en particulier la synthèse organique ont beaucoup contribué au bon achèvement de cette thèse. Merci pour votre convivialité même dans les moments difficiles.

Je remercie le Docteur Gérard Larcher pour m'avoir coencadré pendant tout ce temps et toujours dans la bonne humeur. Nos longues discussions sur le sujet m'ont permis d'en apprendre beaucoup sur des domaines qui étaient pour moi mal connus, ceux de la biochimie et de la mycologie. Merci pour vos conseils pertinents en la matière. Je pense que cette année fut une double délivrance pour vous. Tout d'abord je vous félicite pour l'obtention de votre Habilitation à Diriger les Recherches. D'autant plus qu'en même temps que vous prépariez ce passage obligé dans la vie d'un chercheur, vous avez participé activement à la correction de mon manuscrit.

Je vous remercie de m'avoir supporté et soutenu pendant ces années qui ont passé très vite... Merci Beaucoup.

Je remercie le directeur du laboratoire SONAS, le Professeur Pascal Richomme, pour m'avoir permis de passer quelques années de thèse au sein de son laboratoire et de m'avoir donné les moyens de travailler dans de bonnes conditions.

Je remercie le docteur Jean-philippe Bouchara, directeur du GEIHP, pour toutes les idées qu'il a eu autour de mon sujet. J'espère avoir répondu à beaucoup de ses questions, et je sais déjà que beaucoup d'autres sont en suspens.

Je remercie le Conseil général de la région Pays de la Loire qui a accepté de financer ce projet au moyen d'une bourse des collectivités locales.

Je remercie également Messieurs Jean-Michel Camadro (Directeur de Recherche, Université Paris Diderot), Pascal Sonnet (Professeur, Université de Picardie Jules Verne), Mohamed El Hourch (Docteur, directeur de BioAgroPolis et directeur de l'Institut en Santé

Agro-Environnement) et Bruno Le Bizec (Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes) de m'honorer en ayant accepté de corriger et de juger ce travail.

Je souhaite exprimer un grand merci à tous les membres du laboratoire SONAS, pour l'ambiance joviale et décontractée qu'ils y font régner, ambiance due en grande partie à la dynamique insufflée par le directeur du laboratoire, le Professeur Pascal Richomme. Merci au Professeur Denis Seraphin pour ses conseils en matière de synthèse. Merci au Docteur Jean-Jacques Helesbeux pour l'écoute, la disponibilité et la bonne humeur tous les jours au sein du laboratoire. Merci au Docteur Anne Landreau pour les gâteaux de la pause café de 10h. Merci aussi à l'ensemble des autres permanents du SONAS : Professeur Gilles Bouet, Docteur Mustayeen Khan, Docteur Marie Lavault, Docteur Anne-Marie Leray-Richomme et Docteur Sabine Mallet. Merci aux thésards d'avant et aux docteurs d'aujourd'hui Joumaa Merza, Enguerran Vanquelef, Francis Chevreuil, Nabila Aliouane et Phuong Huynh pour leur accueil et l'ambiance parfois un peu humide qui régnait dans le laboratoire les jours d'été. Merci aux thésards d'aujourd'hui Benoît Pinel, Kusai Alomar, Amélie Dulac, Jacqueline Ropivia, Sylvie Morel, Khalid Mahmood et Alexis Lavaud pour leur contribution active à la très bonne ambiance qui règne dans le laboratoire, même si l'humidité est moindre ! Merci à tous mes stagiaires Jennifer, Bérangère, Jean-Noël, Elise, Clémence, Antoine, Maxime, et Medhi pour avoir supporté mes injonctions répétées afin que vos projets avancent.

Mes cinq années passées dans ce laboratoire furent trop courtes et trop longues à la fois... J'y ai appris beaucoup !

Je remercie Julia Bienvenue pour sa convivialité et l'aide qu'elle m'a apportée lors de certaines expériences effectuées au sein du GEIHP.

Je remercie le laboratoire d'hydrologie et d'hygiène du Maine et Loire et le laboratoire de toxicologie du CHU d'Angers pour les analyses LC-MS préliminaires.

Je remercie le Professeur Marie-Claire Venier, le docteur Brigitte Pech et Lionel Chabaud pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner pendant 1 an la galénique à la faculté de pharmacie d'Angers en tant qu'attaché temporaire.

Je remercie également Jacqueline Quemard et Gérard Suaudeau pour nous avoir attendu régulièrement lors de la fermeture des portes des bâtiments. Je vous en ai fait voir mais vous êtes restés calmes.

Merci à tous ceux que j'ai croisés dans les couloirs du laboratoire et de l'UFR et que j'ai oubliés.

Je remercie le Professeur Pascal Richomme et le Docteur Cécile Abalain pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans le Centre d'Innovation et de Transfert de Technologie du Végétal Spécialisé (VALINOV) du Pôle de Compétitivité Végépolys. Merci à Caroline Servant pour les longues discussions au sujet des projets, j'espère ne pas t'avoir trop traumatisé avec mes réflexions sur la possibilité de réaliser ou non certaines choses. Merci à tous mes collègues, Annick Bellamy, Ellen Bouty, Emmanuel Pajot, Laëtitia Porcher, Amélie Lhuillier-Chaigneau et Sylvie Tijou pour l'ambiance agréable qu'ils font régner au sein de l'équipe, et pour ces 6 mois qui m'ont permis de me rendre compte que les compétences développées en thèse peuvent être utiles bien au-delà.

Merci à tous ceux qui ont eu le courage de relire ma thèse avant que je la dépose : Gérard, Hélène, Laurent, Mariette, Olivier, Sylvie et Véronique.

Je remercie beaucoup ma famille sans qui je ne serais pas arrivé jusque là. Merci de m'avoir apporté cette curiosité qui m'a donné l'envie de faire une thèse.

Et surtout un grand merci à Hélène sans qui ce temps passé n'aurait pas été le même. Merci d'avoir supporté l'éloignement pendant ces 5 années. Merci d'être toujours présente...

Sommaire

Abréviations	10
Liste des Microorganismes	11
Introduction	12
Chapitre 1 : Généralités.....	15
I. <i>Scedosporium apiospermum</i>, un pathogène fongique.....	16
I.1. Les pathogènes fongiques associés à la mucoviscidose	16
I.2. <i>Scedosporium apiospermum</i>	17
I.2.1. Physiopathologie.....	18
I.2.1.1. Infections superficielles localisées.....	18
I.2.1.2. Colonisation de cavités	19
I.2.1.3. Infections profondes invasives.....	20
I.2.2. Thérapeutique	20
II. Molécules chélatrices du fer : les sidérophores.....	22
II.1. L'acquisition du fer chez les microorganismes.....	22
II.2. Sidérophores et microorganismes	25
II.3. Les sidérophores, facteurs de pathogénicité chez les microorganismes	27
II.4. Les applications des chélateurs du fer.....	28
II.4.1. Les applications thérapeutiques.....	28
II.4.1.1. Le traitement des surcharges en fer et autres métaux	28
II.4.1.2. Le traitement des infections.....	33
II.4.1.1. L'activité anti-oxydante.....	35
II.4.1.2. L'inhibition spécifique d'enzymes	37
II.4.2. Les autres applications	38
II.4.2.1. La dépollution des sols	38
II.4.2.2. La régulation de la croissance des plantes	39
II.4.2.3. Le recyclage des déchets nucléaires	39
II.4.2.4. Le dosage de substances.....	39
Chapitre 2 : Les sidérophores de <i>Scedosporium apiospermum</i>	40

I. Méthodes d'étude des sidérophores	41
I.1. Les méthodes de détection des sidérophores	41
I.1.1. Les méthodes chimiques.....	41
I.1.1.1. Méthodes au chrome azurol S.....	41
I.1.1.2. Méthode au perchlorate ou au chlorure ferrique	43
I.1.1.3. Détection des sidérophores de type phénol/catéchol	43
I.1.1.4. Détection des sidérophores de type hydroxamate	44
I.1.1.5. Détection des sidérophores de type acide α -hydroxycarboxylique ...	45
I.1.2. Les méthodes biologiques.....	45
I.2. Production des sidérophores par les microorganismes.....	46
I.3. Purification des sidérophores	47
I.3.1. Méthodes d'extraction	48
I.3.2. Méthodes de purification	51
I.4. Caractérisation des sidérophores	51
II. Matériel et Méthodes :	51
II.1. Microorganismes.....	51
II.1.1. Les souches fongiques utilisées.....	51
II.1.2. Entretien des souches	53
II.1.3. Préparation de l'inoculum	53
II.2. Mise en évidence de la sécrétion de sidérophores sur milieu gélosé CAS	53
II.3. Étude des paramètres de production des sidérophores.....	54
II.3.1. Culture en milieu liquide basal.....	54
II.3.2. Cinétique de production	54
II.3.3. Influence de l'agitation.....	54
II.3.4. Influence de la concentration en fer dans le milieu de culture	55
II.4. Détection des types de sidérophores présents dans le milieu de culture	55
II.4.1. Test d'Arnou.....	55
II.4.2. Absorbance à 318 nm	56
II.4.3. Test d'Atkin.....	56
II.4.4. Oxydation periodique	56
II.5. Analyse des sidérophores de <i>S. apiospermum</i>	56
II.5.1. Extraction liquide/liquide	56
II.5.2. Extraction par la résine Amberlite XAD-4.....	57
II.5.2.1. Etude des paramètres de l'extraction : plan d'expérience	57
II.5.2.2. Procédure optimisée	60

II.5.3. Identification des sidérophores par RP-CLHP-MS	60
II.6. Etude de la captation du fer à partir de protéines d'hôte.....	61
II.6.1. Echange du fer entre sidérophores fongiques et protéines d'hôte	61
II.6.2. Dosage du fer.....	61
II.6.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée (urée-PAGE) 61	
II.7. Analyse de crachats de patients atteints de mucoviscidose et présentant une colonisation fongique respiratoire	62
III. Résultats :	63
III.1. Détection sur milieu gélosé CAS	63
III.2. Optimisation des conditions de production des sidérophores par <i>S.</i> <i>apiospermum</i>	65
III.3. Identification des sidérophores de <i>S. apiospermum</i>	66
III.3.1. Etude des types de sidérophores produits par <i>S. apiospermum</i>	66
III.3.2. Identification des hydroxamates produits par <i>S. apiospermum</i>	67
III.4. Influence du fer dans le milieu sur la production de sidérophores	70
III.5. Interaction des sidérophores avec les protéines d'hôte.....	70
III.5.1. Dosage du fer	70
III.5.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée.....	70
III.6. Profil de sécrétion des sidérophores	72
III.7. Optimisation de l'extraction des sidérophores sur résine Amberlite XAD-4 74	
III.7.1. Comparaison de la méthode d'extraction liquide/liquide par rapport à celle sur Amberlite XAD-4	74
III.7.2. Influence des paramètres sur la méthode d'extraction par Amberlite XAD-4 : plan d'expérience.....	75
III.8. Applications du protocole d'extraction sur résine Amberlite XAD-4	80
III.8.1. A l'étude des sidérophores produits par d'autres champignons impliqués dans la mucoviscidose	80
III.8.1.1. Détection sur milieu gélosé CAS	80
III.8.1.2. Identification des sidérophores par RP-CLHP-Visible-MS	81
III.8.2. A la détection des sidérophores dans les crachats de malades atteints de mucoviscidose et présentant une colonisation fongique.....	87
IV. Discussion :	87
V. Conclusion :	106
 Chapitre 3 : La synthèse de sidérophores	 108

I. Généralités sur la synthèse de sidérophores de type hydroxamate.....	109
I.1. Biosynthèse des sidérophores de type coprogène	109
I.2. Exemple de synthèse de sidérophores de type coprogène	110
I.2.1. Synthèse de l'acide dimérumique.....	110
I.2.2. Synthèse de l'acide rhodotorulique.....	112
I.3. Synthèse du synthon N^5 -acyl- N^5 -hydroxyornithine.....	115
I.3.1. Synthèse de l'hydroxylamine par réaction de substitution nucléophile.....	116
I.3.2. Synthèse de l'hydroxylamine par addition sur une double liaison	117
I.3.3. Synthèse de l'hydroxylamine par formation d' N -hydroxyimine	118
I.3.4. Synthèse de l'hydroxylamine par oxydation de l'amine.....	118
I.3.1. Synthèse de l'hydroxylamine par oxydation d'imine	118
I.3.2. Synthèse de l'hydroxylamine par réduction de groupement nitro	119
I.3.3. Conclusion :	120
II. Analyse rétrosynthétique des sidérophores de <i>S. apiospermum</i>.....	120
II.1. La fusarinine.....	121
II.2. L'acide dimérumique	123
II.3. Le N^α -méthyl coprogène B	123
II.1. Conclusion.....	123
III. Synthèse de la fusarinine	125
III.1. Synthèse de la partie acide 3-déshydroxymévalonique	125
III.1.1. Formation du 5-(alkyloxy)pent-2-ynate d'alkyle	126
III.1.2. Formation du (2Z)-5-(alkyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène d'alkyle	127
III.1.3. Formation du (2E)-5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'alkyle	130
III.1.1. Formation de l'acide (2E) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque.....	132
III.1.2. Conclusion	133
III.2. Synthèse de la partie N -hydroxyornithine	135
III.2.1. Par réaction de Mitsunobu	135
III.2.1.1. Formation du (2S) 2-(t -butyloxycarbonylamino)-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoate de t -butyle.....	137
III.2.1.2. Formation du (2S) 2-(t -butyloxycarbonylamino)-5-hydroxypentanoate de t -butyle.....	139
III.2.1.3. Formation du (2S) N^5 -(benzyloxycarbonyl)- O -(t -butyloxycarbonyl)-2-(t -butyloxycarbonyl amino)-5-(hydroxylamino)-pentanoate de t -butyle	139

III.2.1.4. Formation du (2S) <i>O</i> -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-2-(<i>t</i> -butyloxycarbonyl amino)-5-(hydroxylamino)-pentanoate de <i>t</i> -butyle.....	141
III.2.1.5. Conclusion.....	143
III.2.2. Par oxydation directe de l'amine terminale.....	143
III.2.2.1. Formation du (2S) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-aminopentanoate de <i>t</i> -butyle	144
III.2.2.2. Formation du (2S) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5- (benzoyloxyamino)pentanoate de <i>t</i> -butyle.....	146
III.2.3. Conclusion	148
III.3. Synthèse de la fusarinine protégée.....	148
IV. Conclusions	150
V. Matériel et méthodes	151
Conclusion	174
Bibliographie.....	180
Liste des Figures	201
Liste des Tableaux.....	206
Annexes.....	207

Abréviations

2,3DHB : acide 2,3-dihydroxybenzoïque	avec une source d'ionisation par électro-nébulisation positif
Ac : groupement acétyle	LDA : diisopropylamidure de lithium
ADN : acide désoxyribonucléique	LMA : Laboratoire de Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers
aq. : aqueux	mCPBA : acide métachloroperoxybenzoïque
ARN : acide ribonucléique	MBL : milieu de culture basal liquide
Boc : groupement tertibutyloxycarbonyle	Me : groupement méthyle
BPO : peroxyde de dibenzoyl	MPP : l'acide monoperphthalique
CAS : Chrome Azurol S	MW : micro-ondes
Cbz : groupement benzyloxycarbonyl	ND : non détecté
CCM : chromatographie sur couche mince	NR : non référencé
CLHP : chromatographie liquide haute performance	NOESY : spectre RMN par effet NOE
CMI : Concentration Minimum Inhibitrice (ou MIC)	PBS : tampon phosphate 0,01M salin (NaCl 0,14M), pH 7,2
Cp : groupement cyclopentadiényle	Ph : groupement Phényle
DCC : dicyclohexylcarbodiimide	ROS : espèces oxygénées réactives, « reactive oxygen species »
DEAD : diéthylazodicarboxylate	T _{amb} : température ambiante
DFB : déféroxamine B	TBDMS : groupement tertibutyldiméthylsilanyl
DIBAL: hydruure de diisobutylaluminium	TBDPS : groupement tertibutyldiphénylsilanyl
DMAP : para-(diméthylamino)-pyridine	TBE : solution contenant du trihydroxyméthylaminométhane, de l'acide borique et de l'EDTA
DME : diméthoxyéthane	<i>t</i> Bu : groupement tertibutyle
DMF : diméthylformamide	TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
DMF-DBA : ditertibutylacétale de diméthylformamide	THF : tétrahydrofurane
DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl	THP : groupement tétrahydropyranyl
EDDA : acide éthylènediaminodi(o-hydroxyphénylacétique)	Tosyl : groupement paratoluènesulfonyl
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique	t _r : temps de rétention
Et : groupement éthyle	YNB : Yeast Nitrogen Base
Fm : groupement fluorénylméthyl	YPD : Yeast extract-Peptone-Dextrose (extrait de levure-peptone-glucose)
HAT : histone acétylase	YPDA : Yeast extract-Peptone-Dextrose Agar
HDAC : histone déacétylase	
HDTMA : hexadécyltriméthylammonium	
IHEM : Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, section Mycologie de Bruxelles (Belgique)	
<i>i</i> Pr : groupement isopropyle	
kDa : Kilodalton	
LC-ESI+-MS : chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse	

Liste des Microorganismes

A. flavus : *Aspergillus flavus*
A. fumigatus : *Aspergillus fumigatus*
A. nidulans : *Aspergillus nidulans*
A. terreus : *Aspergillus terreus*
B. subtilis : *Bacillus subtilis*
C. albicans : *Candida albicans*
C. glabrata : *Candida glabrata*
C. guilliermondii : *Candida guilliermondii*
C. krusei : *Candida krusei*
C. parapsilosis : *Candida parapsilosis*
C. pseudotropicalis : *Candida pseudotropicalis*
C. stellatoidea : *Candida stellatoidea*
E. coli : *Escherichia coli*
E. dermatitidis : *Exophiala dermatitidis*
H. influenzae : *Haemophilus influenzae*
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
P. boydii : *Pseudallescheria boydii*
P. denitrificans : *Paracoccus denitrificans*
P. falciparum : *Plasmodium falciparum*
P. frequentans : *Pencillium frequentans*
P. vivax : *Plasmodium vivax*
S. apiospermum : *Scedosporium apiospermum*
S. aurantiacum : *Scedosporium aurantiacum*
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
S. epidermidis : *Staphylococcus epidermidis*
S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*

Introduction

Introduction

La mucoviscidose est une maladie héréditaire très répandue. Elle touche environ une naissance sur 3500 [1]. Cette maladie provoque des sécrétions anormalement visqueuses et adhésives qui touchent principalement l'appareil respiratoire et le tube digestif. Dans ce contexte, les causes majeures de mortalité sont les infections pulmonaires. Celles-ci sont initialement causées par des bactéries, suivies par les champignons une fois que ces premières ont été éradiquées par les traitements antibiotiques [2, 3]. Les pathogènes fongiques rencontrés dans ce contexte de mucoviscidose sont en France par ordre d'importance : *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum* et *A. terreus* [3]. *Scedosporium apiospermum* est de loin le plus mal connu malgré la grande variété d'infections souvent fatales qu'il provoque. En outre, la thérapeutique actuelle est peu efficace sur ce champignon [4].

La présence de fer dans les sécrétions pulmonaires des malades atteints de mucoviscidose semble jouer un rôle crucial dans l'installation de pathogènes. Notre travail a consisté à étudier l'acquisition du fer chez ce pathogène [5]. Une meilleure connaissance du métabolisme du fer chez *S. apiospermum* permettrait d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques.

Le fer joue un rôle fondamental dans la croissance des organismes vivants [6]. Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que le transport, le stockage et l'activation de l'oxygène moléculaire, dans la réduction des ribonucléotides et de l'azote, et dans le transport des électrons. Le fer ferrique (III), abondant dans le milieu extérieur, précipite irréversiblement sous forme d'oxydes et d'hydroxydes [7], le rendant très peu biodisponible dans l'environnement. De même, lorsque l'agent pathogène infecte son hôte, le fer lié aux protéines de l'hôte telles que la transferrine et la ferritine [8], lui sera peu accessible. Les microorganismes ont donc développé des systèmes d'acquisition du fer spécifiques et performants pour assurer leur survie, dont la sécrétion de sidérophores [5]. Ces molécules présentent, présentent une haute affinité pour le fer (III). Elles sont sécrétées lorsque les microorganismes sont soumis à un stress en fer et jouent un rôle important dans l'interaction hôte-pathogène [9].

Notre étude se propose d'identifier et de caractériser les sidérophores par *S. apiospermum* et de mettre en lumière certaines interactions entre ces molécules et les protéines de l'hôte au niveau pulmonaire. L'étude de ces sidérophores a ensuite été étendue à plusieurs souches de *S. apiospermum* ainsi qu'à d'autres espèces fongiques impliquées dans

les infections respiratoires touchant les malades atteints de mucoviscidose. Nous avons envisagé d'utiliser les sidérophores comme marqueurs spécifiques de ces pathogènes [5] fongiques ce qui permettrait la mise au point d'une méthode de diagnostic précoce et non invasive des infections pulmonaires à *S. apiospermum*.

Par ailleurs, les sidérophores peuvent être l'objet d'applications thérapeutiques. Ceci peut s'exprimer de diverses manières. De part leur capacité à soustraire le fer de l'hôte, ils sont de bon candidats aux thérapeutiques anti-infectieuses, anti-cancéreuses ou pour le traitement des surcharges en fer [10, 11]. Ils peuvent également constituer des vecteurs d'antibiotiques [12] ou d'antifongiques [13] après conjugaison avec des principes actifs. De plus, l'utilisation d'analogues structuraux à ces sidérophores peut permettre d'envisager des molécules capables d'interférer dans le métabolisme du fer de l'agent pathogène, voir de bloquer les récepteurs impliqués dans la captation du fer.

Nos travaux ont également consisté à réaliser la synthèse des sidérophores de *S. apiospermum* dans le but d'accéder à ces nouvelles options thérapeutiques

Chapitre 1 : Généralités

I. *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique

Scedosporium apiospermum est un pathogène émergent compte tenu du nombre croissant de cas cliniques rapportés [4, 14, 15]. Il est plus particulièrement impliqué dans les infections respiratoires des patients atteints de mucoviscidose [16, 17].

I.1. Les pathogènes fongiques associés à la mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie héréditaire la plus fréquente dans la population de race blanche dite encore caucasienne. Il s'agit d'une exocrinopathie généralisée, frappant de nombreuses glandes dont les glandes sudoripares. L'appareil respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, foie et voies biliaires), mais également le tractus génital sont principalement touchés. L'atteinte des glandes à mucus semble liée à la production de sécrétions visqueuses (d'où le nom donné à la maladie, mucoviscidose, qui vient de mucus visqueux), adhésives, et favorables à l'adhérence des microorganismes.

Les causes majeures de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose sont les infections pulmonaires [1]. Celles-ci débutent chez les patients les plus jeunes par des infections bactériennes à *Staphylococcus aureus* (70%), *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*, suivies par *Pseudomonas aeruginosa* [2, 3, 8].

Ce contexte lésionnel et inflammatoire entretenu par les bactéries, s'avère ensuite favorable à l'implantation de champignons qui vont coloniser les bronches et provoquer une dépréciation des fonctions respiratoires du patient [3]. Une étude épidémiologique [3], menée pendant cinq ans sur 128 patients atteints de mucoviscidose et âgés de 4 à 35 ans, a montré que les principaux champignons isolés dans les expectorations sont par ordre d'importance *A. fumigatus* (46% des cas), *S. apiospermum* (9%) et plus rarement *Aspergillus terreus* et *Exophiala dermatitidis* [3, 16-19]. Outre ces champignons filamenteux, les levures, telles que *Candida albicans*, sont également retrouvées (61%). Cette espèce est même la plus fréquente dans les expectorations des patients mais sans qu'aucun effet pathogène direct ne lui soit reconnu. Il est important de noter que chez ces malades, les altérations mucociliaires, les désordres immunitaires locaux, ainsi que les antibiothérapies répétées ou les traitements immunosuppresseurs sont autant de facteurs prédisposant à la survenue de ces infections fongiques.

Scedosporium apiospermum est, selon les études, le second ou le troisième champignon retrouvé chez les patients atteints de mucoviscidose [16, 17, 20, 21]. Les infections peuvent

être relativement tardives puisque les premiers isollements ont été effectués chez des patients âgés de 14 ans [17]. Dans tous les cas, elles apparaissent systématiquement après les infections bactériennes. Ceci suggère que les altérations du système respiratoire engendrées par les bactéries constitueraient un préalable à la colonisation fongique [3].

I.2. *Scedosporium apiospermum*

Scedosporium apiospermum est un champignon filamenteux (Figure 1), dont la forme imparfaite (asexuée) est l'ascomycète *Pseudallescheria boydii* [4, 14].

Du fait de sa grande variabilité génétique, la phylogénie actuelle de *S. apiospermum* et *P. boydii* est en pleine évolution. Récemment une étude a montré qu'il existait un complexe d'espèces [22-24] ce qui a entraîné la dénomination de nouvelles espèces telles que *Scedosporium aurantiacum* et *Pseudallescheria minutispora*.

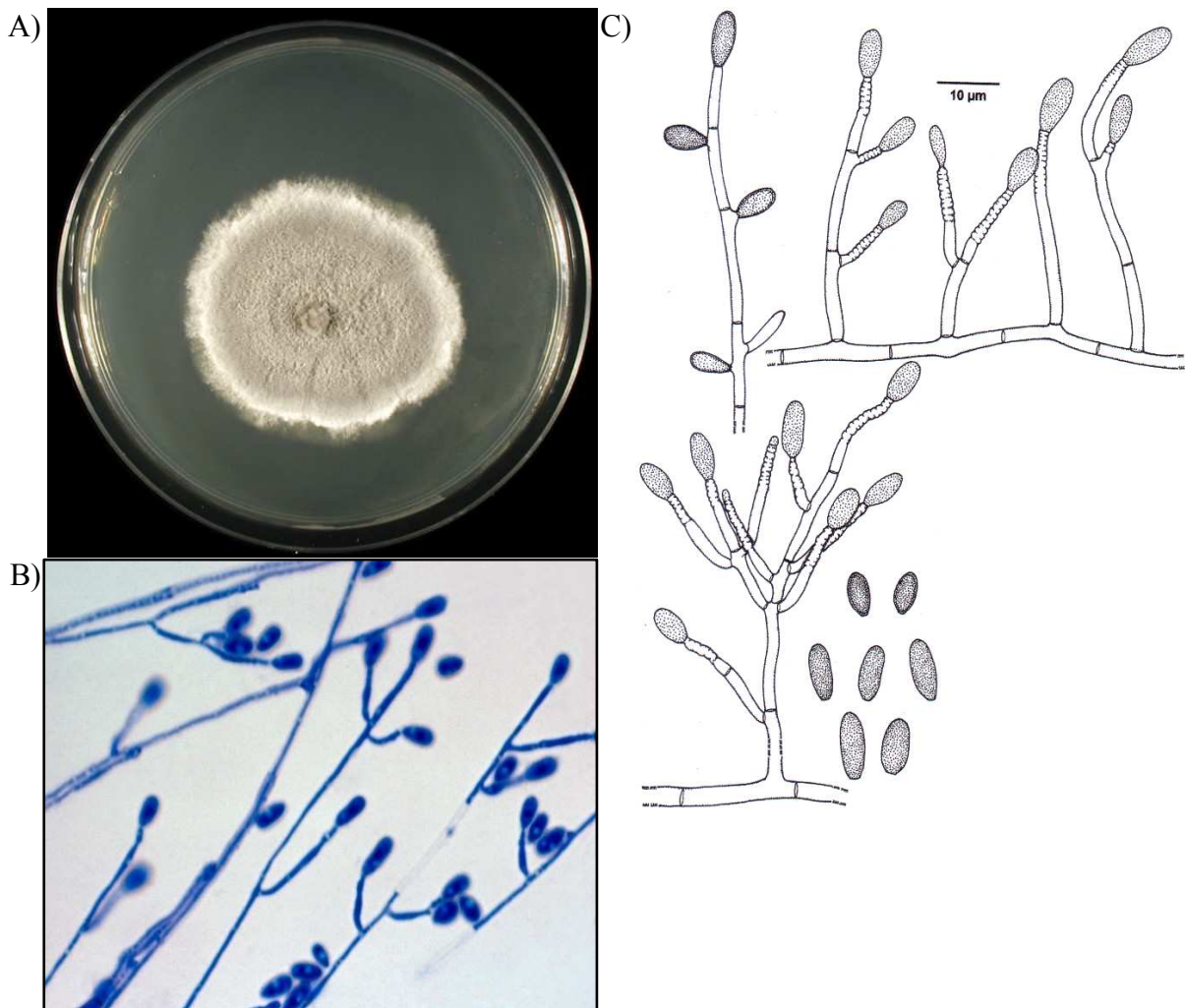


Figure 1 : Aspect macroscopique (A) et microscopique [4] (B, C) de *S. apiospermum*

I.2.1. Physiopathologie

Scedosporium apiospermum a été isolé pour la première fois dans l'oreille d'un enfant ayant des otites chroniques en 1899 [4, 25]. En tant que pathogène opportuniste, il peut avoir d'autres localisations chez l'homme et être ainsi à l'origine d'un grand nombre de formes cliniques telles que sinusites, pneumonies nécrosantes, allergies broncho-pulmonaires, infections de la peau, kératites, arthrites, ostéomyélites, abcès du cerveau, endocardites.

Scedosporium apiospermum se développe principalement chez les personnes immunodéprimées du fait de son opportunisme. Les causes d'immunodépression chez l'homme peuvent avoir des origines variées : d'origine génétique affectant directement le système immunitaire, ou indirectement (mucoviscidose), d'origine infectieuse telle que le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), ou d'origine iatrogène telle que les traitements immunosuppresseurs dans le cas de greffes. Cependant ces infections peuvent apparaître chez des personnes sans état d'immuno-dépression et des cas ont également été rapportés chez les animaux [4].

Selon une étude récente, *S. apiospermum* fait partie de ces quelques espèces de champignons appartenant aux genres *Scedosporium*, *Pseudallescheria* et *Petriella* qui auraient acquis au cours de l'évolution la thermotolérance leur permettant de survivre chez les animaux endothermes tels que les mammifères. La pression de sélection exercée par l'hôte leur aurait permis d'acquérir leur statut de pathogènes opportunistes [26].

Les atteintes que provoque *S. apiospermum* peuvent être classées en trois groupes : les infections superficielles localisées, les colonisations de cavités et les infections profondes invasives.

I.2.1.1. Infections superficielles localisées

Ce pathogène fongique est connu comme pouvant être à l'origine de mycétomes suite à une inoculation traumatique [4, 27]. La majorité de ces infections est localisée au niveau des pieds [4, 28], mais *S. apiospermum* montre également une prédilection pour les articulations des genoux ou des coudes pouvant déclencher des arthrites [29] (Figure 2). Si de surcroît le patient est immunodéprimé, ces infections peuvent s'étendre et devenir fatales.

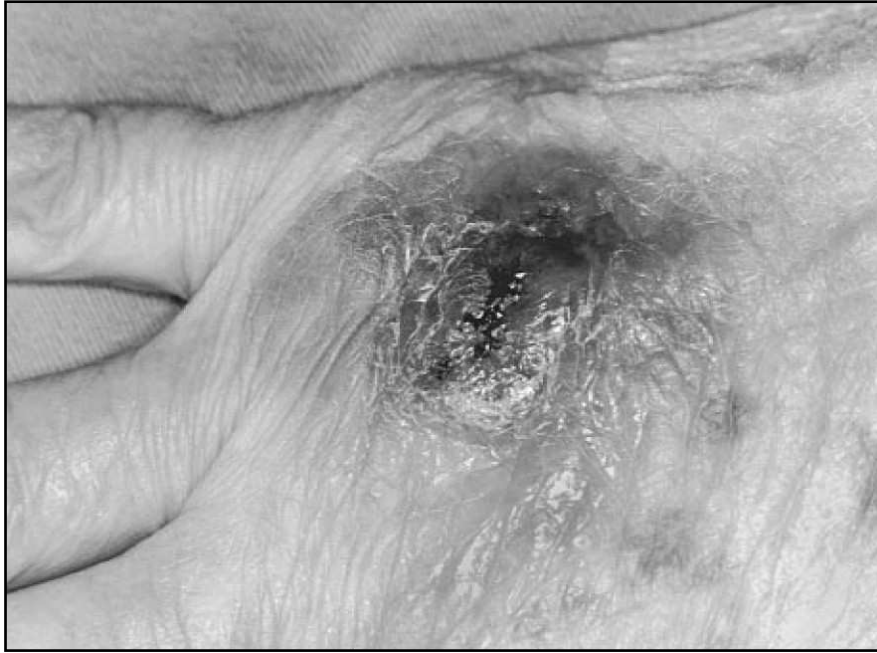


Figure 2 : Ulcérations provoquées par *S. apiospermum* au niveau de l'articulation des doigts [27]

Dans le cas d'infections cutanées, le champignon peut se disséminer et atteindre l'os. Il peut alors engendrer des destructions importantes pouvant mener à des ostéomyélites. Dans le cas où ces atteintes sont associées à un terrain immunodéprimé, l'infection peut s'étendre par diffusion lymphatique et devenir invasive [28, 30].

D'autres infections peuvent toucher l'œil et être à l'origine de kératites et plus rarement d'endophtalmies.

I.2.1.2. Colonisation de cavités

Au-delà de la colonisation pulmonaire dans le contexte de la mucoviscidose (voir Chapitre 1-I.1), *S. apiospermum* est connu pour sa faculté à coloniser des cavités telles que les sinus ou le septum nasal, pouvant déclencher des sinusites chroniques [4]. L'inflammation peut ensuite s'étendre à l'oreille interne et provoquer des otites [31] qui peuvent évoluer vers des infections plus profondes [32].

Au niveau broncho-pulmonaire, les scédosporioses réalisent des tableaux cliniques assez voisins de ceux des aspergilloses. *Scedosporium apiospermum* peut en effet coloniser des cavités néoformées ou séquellaires, comme pour *A. fumigatus* [33, 34]. Au niveau bronchique, on décrit des atteintes comparables à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.

I.2.1.3. Infections profondes invasives

Les infections profondes à *S. apiospermum* sont d'origine et de nature variées [4]. Elles sont généralement suite à des interventions médicales ou chirurgicales, ou peuvent succéder à des infections superficielles sur terrain immunodéprimé [14, 35-39]. Un cas clinique a été rapporté [40] d'une transplantation pulmonaire réalisée chez un patient atteint de mucoviscidose et où malgré les traitements antifongiques, l'infection pulmonaire est devenue invasive.

Les infections profondes à *S. apiospermum* sont fréquemment diagnostiquées chez les personnes ayant survécu à une noyade [41]. Récemment, des cas de scedosporioses systémiques ont été rapportés chez les personnes ayant survécu au tsunami qui a touché le sud-est asiatique en décembre 2004 [42]. La contamination des malades s'est opérée à partir des boues et de l'eau croupie ou polluée, milieux propices à la dissémination de *S. apiospermum* [4].

Les localisations cérébrales sont en général suite à un traumatisme crânien ou une atteinte primitive pulmonaire, par noyade par exemple. Habituellement, elles se présentent sous forme d'abcès du cerveau [42], associés ou non à un syndrome méningé.

D'autres atteintes de *S. apiospermum* ont été décrites comme des endocardites survenues à la suite des greffes de valvules cardiaques et/ou de la pose d'un stimulateur cardiaque. Plus rarement, le champignon peut se retrouver au niveau rénal, hépatique, thyroïdien ou prostatique.

Scedosporium apiospermum est aussi capable de coloniser simultanément plusieurs organes (système nerveux, muscles, os) [33, 43].

I.2.2. Thérapeutique

Le traitement des atteintes localisées (mycétomes) est du ressort de la chirurgie. Dans les arthrites, le curetage des lésions est souvent nécessaire. Il faut pratiquer, chaque fois que cela est possible, l'exérèse des tissus lésés. Quant au traitement médical, celui-ci est plus aléatoire [4, 44]. En effet, *S. apiospermum* est résistant à l'amphotéricine B [45], à la 5-fluorocytosine [46] et à la majorité des dérivés azolés [47] (Figure 3). Les meilleures réponses thérapeutiques sont observées avec les azolés de type kétoconazole et l'itraconazole qu'il faut prescrire à dosage adéquat sur de longues périodes [25, 38, 43].

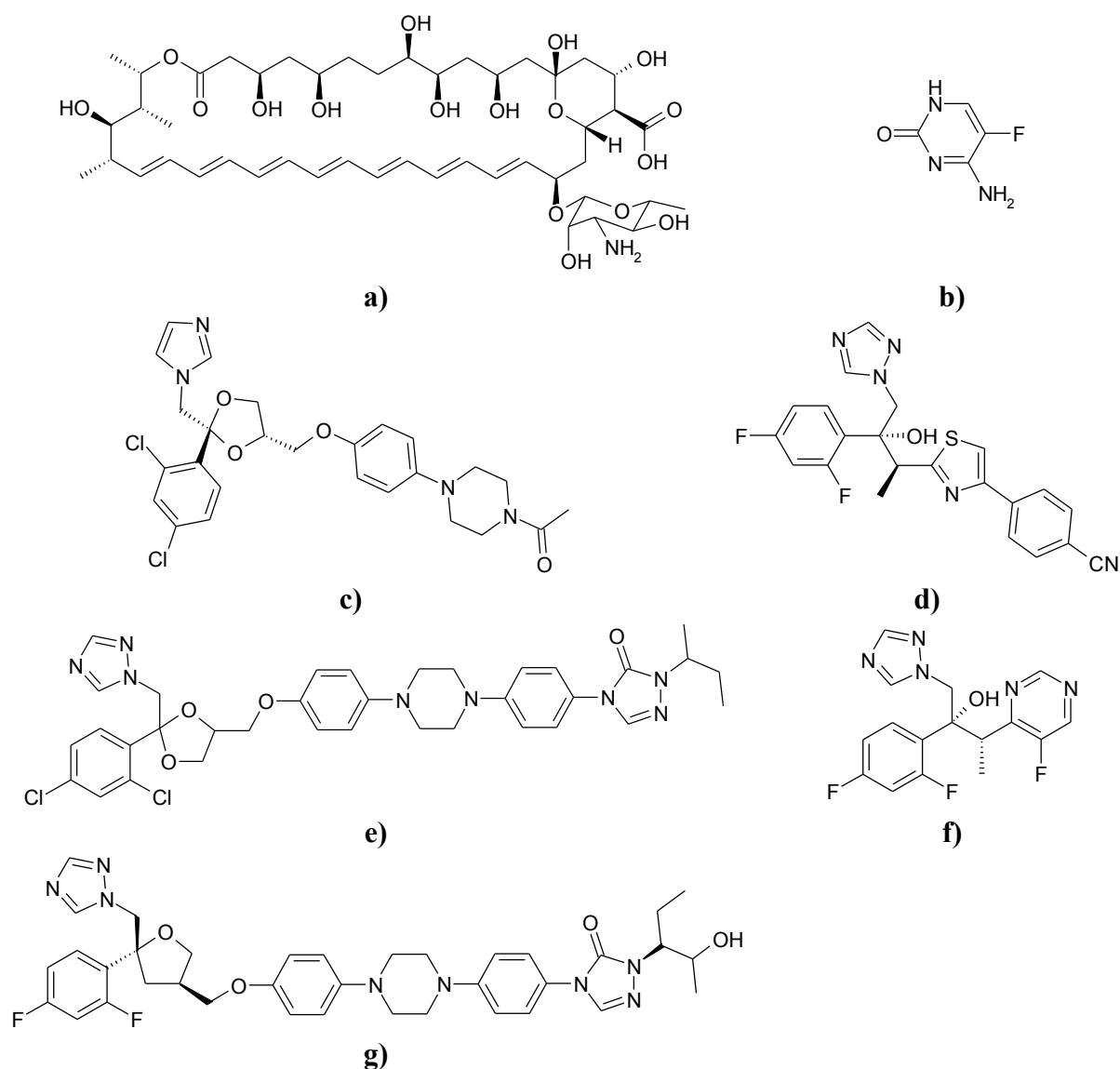


Figure 3 : Antifongiques utilisés en thérapeutique [48] : a) amphotéricine B, b) 5-fluorocytosine, c) kétoconazole, d) ravuconazole, e) itraconazole, f) voriconazole, g) posaconazole

Parmi les nouvelles molécules antifongiques, les échinocandines montrent une très faible activité sur *S. apiospermum* [49]. Par contre, les derniers triazolés exercent de bien meilleures activités : variables selon la souche avec le posaconazole [25, 50, 51], constantes avec le voriconazole et le ravuconazole [52, 53]. Ces activités obtenues *in vitro* sont à relativiser par rapport à l'action que peuvent avoir ces molécules *in vivo*. Pour preuve, l'amphotéricine B n'est pas efficace *in vitro* alors que l'activité antifongique *in vivo* semble bien meilleure. Certains auteurs ont tenté d'établir une relation entre l'activité mesurée *in vitro* et celle obtenue *in vivo*. Ils ont ainsi montré qu'une CMI inférieure à $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ *in vitro* pour un antifongique était nécessaire pour obtenir une activité significative *in vivo* [54].

Pour palier au manque d'efficacité de ces molécules, il est pratiqué une association d'antifongiques, dont la plus prometteuse est la combinaison amphotéricine B avec fluconazole [45, 55, 56]. Une autre pratique, en particulier pour les infections disséminées, consisterait à associer la prise d'antifongiques classiques en y associant une stimulation du système immunitaire de l'hôte [46] par l'interféron- γ [34], et l'interleukine 15 [57].

II. Molécules chélatrices du fer : les sidérophores

II.1. L'acquisition du fer chez les microorganismes

Parmi les éléments les plus abondants à la surface de notre planète, le fer constitue le quatrième élément. Il est essentiel au fonctionnement des organismes vivants. Bien que très abondant au niveau des roches constituant la croûte terrestre, le fer, sous forme d'oxyde ou d'hydroxyde ferrique, est en fait très peu disponible pour les êtres vivants [7]. En milieu aérobie, le fer existe principalement sous sa forme oxydée (degré d'oxydation +3), à une très faible concentration en milieu aqueux. En effet, lorsque la concentration des ions ferriques dépasse 10^{-18} mol.L⁻¹, ces derniers réagissent avec les ions HO⁻ pour former des précipités d'hydroxydes ferriques Fe(OH)₃ [5, 58].

Le fer est un élément essentiel pour toute forme de vie car il est impliqué dans des fonctions biologiques diverses et essentielles. Il est le cofacteur de nombreuses enzymes intervenant dans le transfert d'électrons (respiration mitochondriale) ou d'oxygène (hémoglobine), et dans la désactivation de l'oxygène radicalaire (catalases, peroxydases) [59].

Pour se fournir en fer, les microorganismes ont développé diverses stratégies de captation du fer leur permettant de survivre et de s'adapter à leur environnement [6, 60-62]. La mise en œuvre de ces stratégies (Figure 4) dépend à la fois de la disponibilité du fer dans l'environnement, de la forme sous laquelle il existe (ionique, complexe, héminique), ainsi que de ses différents degrés d'oxydation.

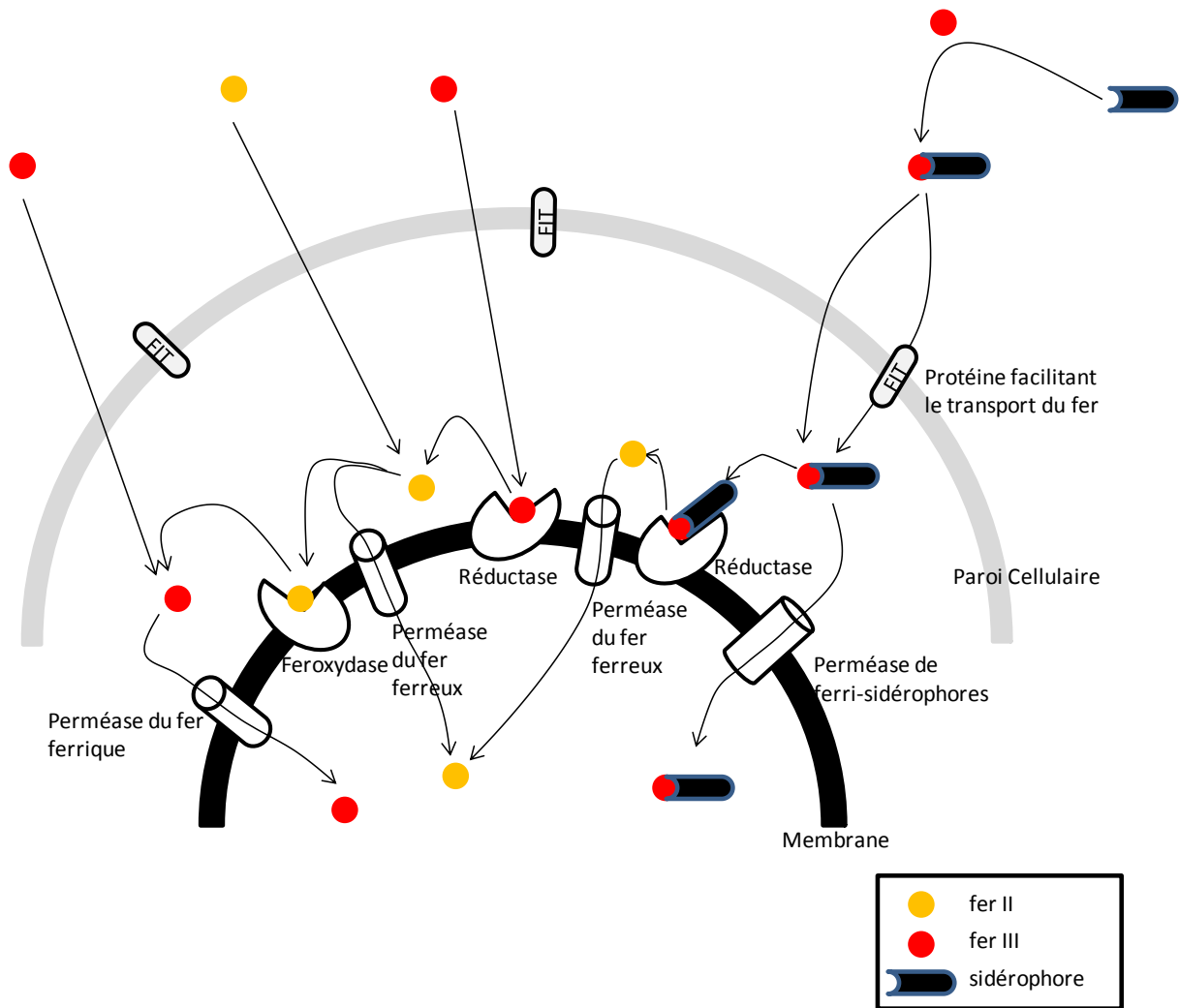


Figure 4 : Les différents mécanismes d'acquisition du fer par les champignons [60, 61]

La membrane plasmique des microorganismes comporte plusieurs enzymes entrant en jeu dans les différentes étapes d'acquisition du fer. Les perméases du fer ferreux permettent une acquisition directe du fer ferrique présent dans l'environnement après action d'une réductase. Cela représente le système réductif d'acquisition du fer qui fonctionne normalement lorsque le fer est à concentration suffisante dans le milieu. Une partie du fer ferrique peut être captée par une perméase ou après action d'une feroxydase sur le fer ferreux.

Lorsque le fer se fait rare, les microorganismes sécrètent de petits acides organiques dans le but d'acidifier l'environnement et ainsi d'augmenter la solubilité du fer ferrique [63], le rendant plus accessible. A ce mécanisme s'ajoute la sécrétion de molécules chélatrices du fer ferrique appelées sidérophores [6, 62, 64]. Elles permettront de rapporter le fer extracellulaire au microorganisme.

Les sidérophores peuvent même aller jusqu'à entrer en compétition avec certaines protéines d'hôte (transferrine, lactoferrine, ferritine) pour leur soustraire le fer [62, 65, 66]. Ils

forment avec le fer ferrique des complexes stables appelé ferri-sidérophores [67] qui diffusent à travers la paroi du microorganisme par des canaux ou sont pris en charge par des protéines de transport du fer (FIT, protéine facilitant le transport du fer). Une fois arrivés au niveau membranaire, les ferri-sidérophores seront pris en charge par des perméases et le fer parvient ainsi dans la cellule. Plus précisément, le fer complexé au sidérophore pénètre dans le microorganisme selon deux manières (Figure 5) : transport par internalisation du ferri-sidérophore à travers la membrane grâce à une perméase (système navette), ou séparation du fer du sidérophore (système taxi), puis action d'une réductase et pénétration du fer ferreux grâce à une perméase, ou parfois réoxydation du fer ferreux en ferrique et captation par une perméase du fer ferrique.

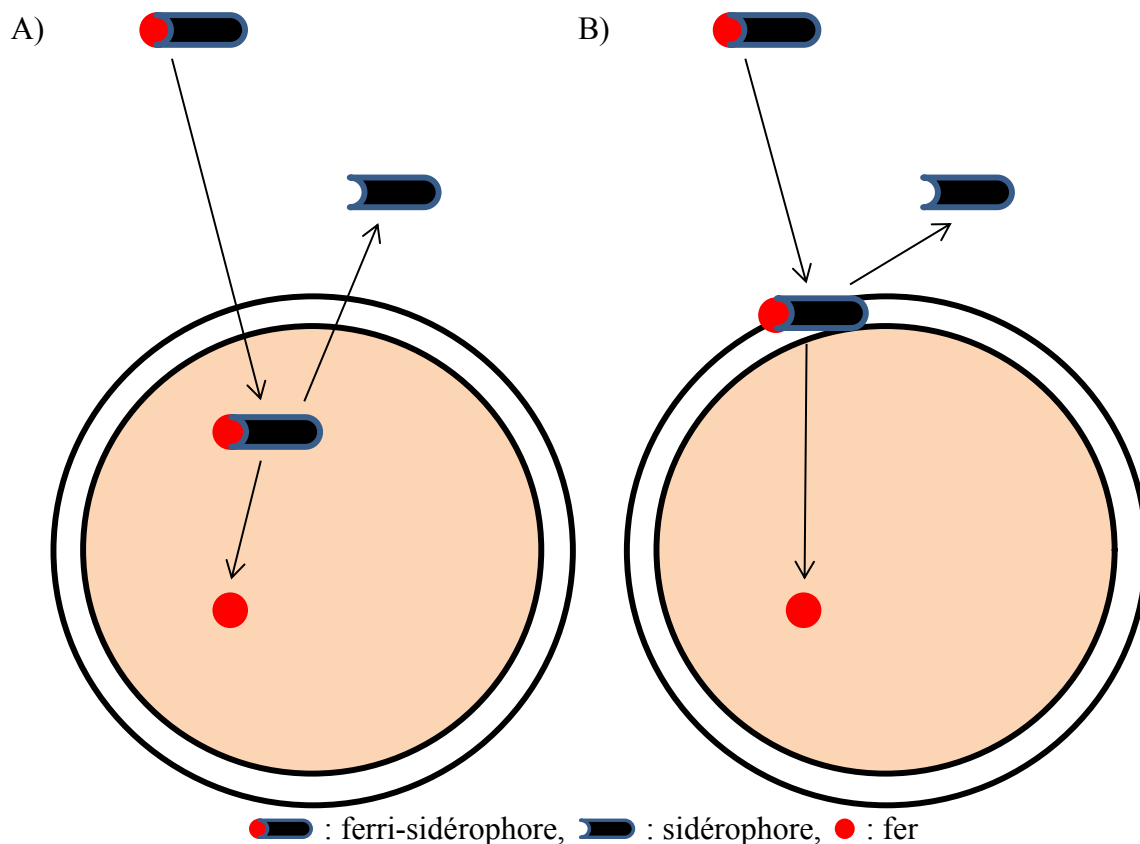


Figure 5 : Mécanismes de transport du fer : A) système navette, B) système taxi

La régulation de ces mécanismes est principalement basée sur les besoins en fer du microorganisme et la concentration en fer disponible dans le milieu de culture. Les sidérophores ne sont sécrétés qu'en condition de stress en fer pour le microorganisme, c'est-à-dire pour une concentration en fer III dans le milieu inférieur ou égal à $0,1\mu\text{M}$ [68].

II.2. Sidérophores et microorganismes

Les sidérophores sont des molécules dont les masses moléculaires sont comprises entre 300 et 1300 Da et qui présentent une très forte affinité pour le fer ($K_d \sim 10^{30}$) [69, 70]. Ils sont produits par une grande variété de microorganismes (bactéries et champignons) et par certaines plantes (phytosidérophores des graminées) [71, 72]. Ils sont classés selon la fonction chimique impliquée dans la chélation du fer (Figure 6) : phénol/catéchol, hydroxamate et acide α -hydroxycarboxylique (Figure 8).

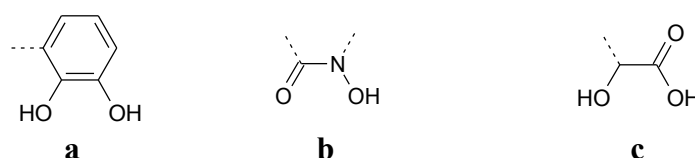


Figure 6 : Classification des sidérophores selon la fonction chimique : a) phénol/catéchol, b) hydroxamate, c) acide α -hydroxycarboxylique

Cette classification succincte ne doit pas masquer la grande variété structurale de ces molécules à l'intérieur de chaque classe (Figure 8). Ces molécules varient généralement par la longueur de la liaison entre les différentes fonctions chélatrices, par le nombre de fonctions impliquées, ou encore par l'organisation tridimensionnelle de ces groupements. Tous les sidérophores n'obéissent pas à cette règle de classification (Figure 7). En effet, plusieurs fonctions peuvent être impliquées chez un même sidérophore, ou encore la chélation du fer peut faire intervenir d'autres fonctions que celles décrites.

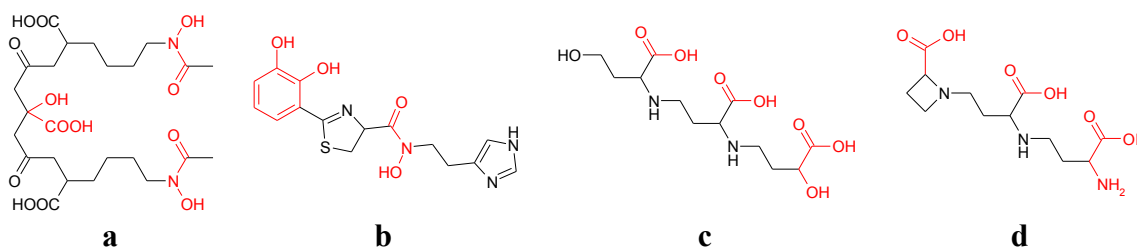


Figure 7 : Exemples de sidérophores n'appartenant à aucune classe définie : a) aéro bactéine, b) anguibactine, c) acide avénique, d) nicotianamine

Des sidérophores appartenant aux trois classes ont été retrouvés chez les bactéries tandis que les champignons semblent ne pas posséder de sidérophores du type phénol/catéchol [5]. Généralement, ce sont les sidérophores de type hydroxamate que l'on retrouve, à l'exception des mucormycoses qui ont la particularité de produire des sidérophores de type acide α -hydroxycarboxylique [73].

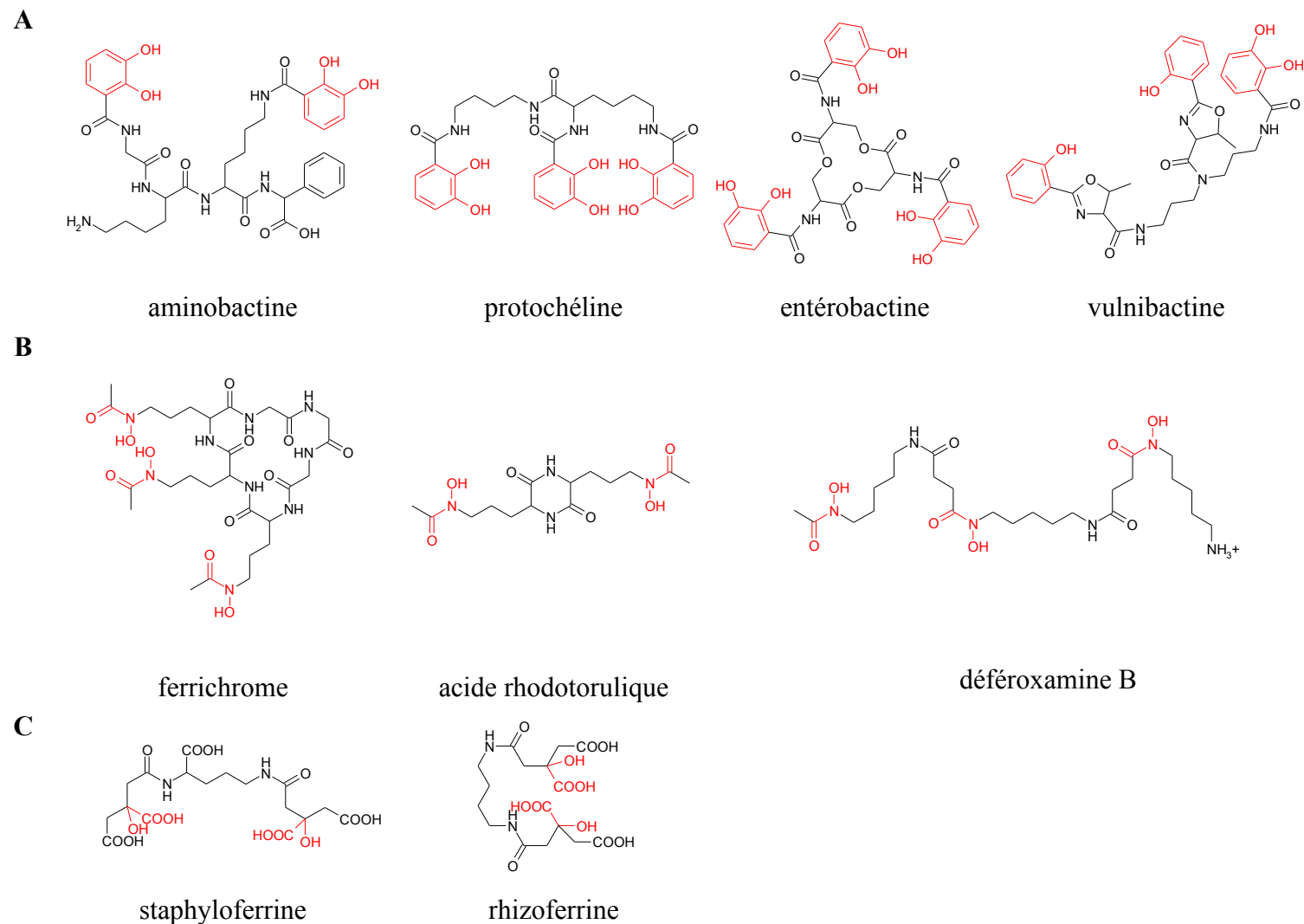


Figure 8 : Exemples de sidérophores appartenant à la classe des phénols/cathécolds (A), des hydroxamates (B) et des acides α -hydroxycarboxyliques (C)

II.3. Les sidérophores, facteurs de pathogénicité chez les microorganismes

Les microorganismes pathogènes ont recours à un certain nombre de facteurs pour s'installer chez leur hôte et déclencher une infection. Ces facteurs appelés facteurs de virulence ou de pathogénicité vont fournir à l'agent pathogène [74, 75] :

- la capacité de se fixer à l'hôte (adhérence aux tissus de l'hôte),
- la capacité d'envahir l'hôte (dégradation des protéines d'hôte pour fournir des nutriments),
- la capacité de se défendre contre l'hôte (contournement des défenses de l'hôte).

Dans le cas de *S. apiospermum*, certains facteurs, vraisemblablement impliqués dans la dégradation des tissus de l'hôte, ont été caractérisés comme des métallo- et des sérine-protéases [76, 77]. Une Cu,Zn-superoxyde dismutase permettant au champignon de s'opposer au stress oxydatif déclenché par l'hôte, a également été identifiée [78].

En ce qui concerne les sidérophores, ceux-ci peuvent également être considérés comme des facteurs de virulence [6, 64]. Premièrement, les sidérophores permettent au champignon de mieux survivre en captant le fer dans les tissus de l'hôte qui en ont une très faible teneur. Deuxièmement, leur capacité à former des complexes stables avec le fer (III) leur confère un rôle perturbateur dans le métabolisme du fer de l'hôte, d'autant que les complexes ferri-sidérophores sont généralement plus stables que les complexes fer-protéine [8, 79, 80]. En effet, il a été démontré chez *A. fumigatus* et *S. aureus* que les sidérophores entrent en compétition avec la transferrine de l'hôte pour la complexation du fer. Troisièmement, les sidérophores microbiens peuvent soustraire le fer inclus dans la transferrine qui assure le transport du fer dans le sérum humain [65, 81]. De même pour *Escherichia coli*, *S. epidermidis* et *S. aureus*, il a été montré qu'ils étaient capables de réquisitionner le fer de la ferritine, protéine de stockage du fer dans les cellules [66]. Cependant cette capacité à détourner directement le fer des protéines de l'hôte n'est pas générale chez les microorganismes. Par exemple, chez *P. aeruginosa* cette capacité n'est rendue possible qu'après dégradation des protéines par l'action protéolytique d'une élastase [82, 83].

Diverses études sont venues confirmer le rôle des sidérophores dans la virulence des microorganismes. Chez *A. fumigatus*, la déficience du gène codant pour la *L*-ornithine *N*⁵-oxygénase, impliquée dans la biosynthèse des sidérophores (Figure 9) [84], a montré une moindre virulence du champignon chez un modèle murin d'aspergillose

invasive [9, 85]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des mutants de *P. aeruginosa* [86] ou *S. aureus* [87], ne produisant plus de sidérophores.

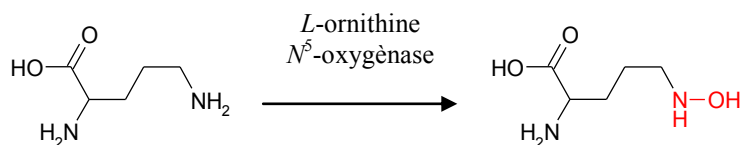


Figure 9 : Action de la *L*-ornithine N⁵-oxygénase sur l'ornithine

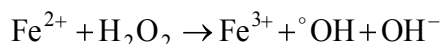
II.4. Les applications des chélateurs du fer

Les sidérophores, et plus généralement les chélateurs du fer, font l'objet d'applications thérapeutiques, et de nouvelles voies de traitement sont explorées. En outre, des applications dans d'autres domaines que la thérapeutique sont envisagées comme l'agronomie et la protection de l'environnement.

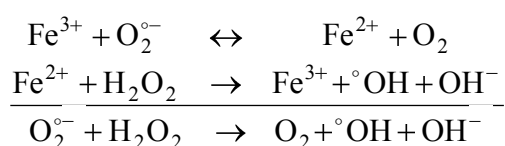
II.4.1. Les applications thérapeutiques

II.4.1.1. Le traitement des surcharges en fer et autres métaux

Le fer sous forme ferreux participe à la formation d'espèces oxygénées réactives (« Reactive Oxygen Species », ROS) dont les radicaux libres [88] *via* la réaction de Fenton [89] :



ou la réaction d'Haber-Weiss [90] :



Ces radicaux libres sont à l'origine de dommages tissulaires, de dégradation de l'ADN, d'altération des membranes cellulaires et d'augmentation de la perméabilité vasculaire [91].

Certaines pathologies comme l'hémochromatose idiopathique qui résulte d'une accumulation lente et continue de fer, aboutissent à des surcharges en fer chez les patients [92]. D'autres pathologies, comme par exemple la β -thalassémie [93] ou la drépanocytose [10, 94, 95], sont traitées par des transfusions régulières induisant à terme une surcharge en fer (chaque poche de sang contient 250 mg de fer). De même des surcharges en métaux tels que le fer et l'aluminium apparaissent chez des insuffisants rénaux soumis à des dialyses répétées [96].

Si ces surcharges en fer ne sont pas traitées, l'excès de fer va induire une augmentation de la formation des radicaux libres à l'origine de dégâts irréversibles sur les organes tels que le cœur. Le fer n'étant que très peu éliminé naturellement, des traitements doivent être entrepris pour assurer son élimination rapide. Le traitement généralement prodigué est une thérapie par chélation. Des molécules chélatrices du fer sont fournies au malade. En formant des complexes stables avec le fer, ceux-ci sont éliminés par voie rénale entraînant ainsi une diminution du fer chez le patient. La molécule actuellement la plus utilisée est le Desféral® (le mésylate de déféroxamine B).

Des surcharges en fer cérébrales ont également été observées dans certaines maladies neuro-dégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, ou la maladie d'Huntington [10, 95, 97-99]. Cette forte concentration en fer dans certaines zones du cerveau peut être à l'origine de la formation de radicaux libres impliqués dans les processus de neuro-dégénérescence. Cette formation peut être favorisée par une coordination incomplète de l'atome de fer par divers composés. Il se trouve que la dopamine, neuromédiateur du système nerveux central, possède une structure de type catéchol (Figure 10) et peut jouer ce rôle de chélateur qui lors d'une chélation partielle pourrait accentuer la formation de radicaux libres [100]. Le traitement de ces surcharges reste problématique car les chélateurs du fer utilisés en thérapeutique ne sont pas capables de traverser la barrière hémato-encéphalique. Certaines molécules naturelles ou de synthèse sont tout de même connues pour former des complexes stables avec le fer et pour traverser la barrière hémato-encéphalique (Figure 11) [101].

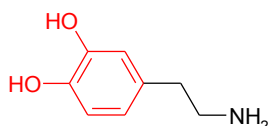


Figure 10 : Noyau catéchol présent dans la structure de la dopamine

En dehors du fer, les sidérophores sont capables de complexer d'autres ions métalliques (aluminium, plutonium, ...) [92]. Ainsi, ils peuvent être utilisés pour le traitement des empoisonnements aux actinides, en facilitant l'élimination de ces derniers [102].

Plusieurs chélateurs du fer sont utilisés en thérapeutique [10, 95, 103] dont le plus connu, la déféroxamine B. Ce sidérophore d'origine naturelle est produit par *Streptomyces pilosus* [104]. D'autres chélateurs obtenus par synthèse sont également utilisés, comme par exemple le défériprone et le déférasirox (Figure 12).

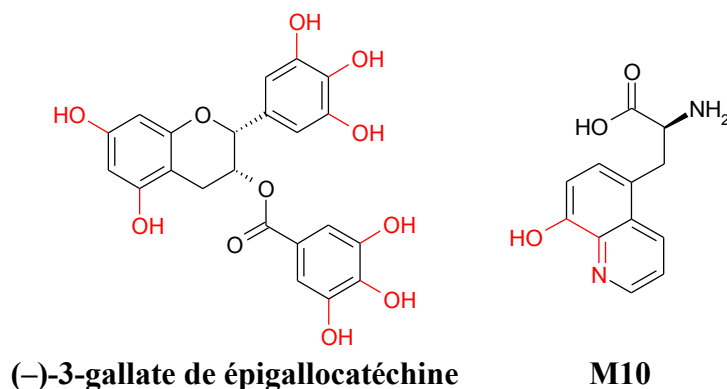


Figure 11 : Molécules chélatrices du fer capables de traverser la barrière hémato-encéphalique [101]

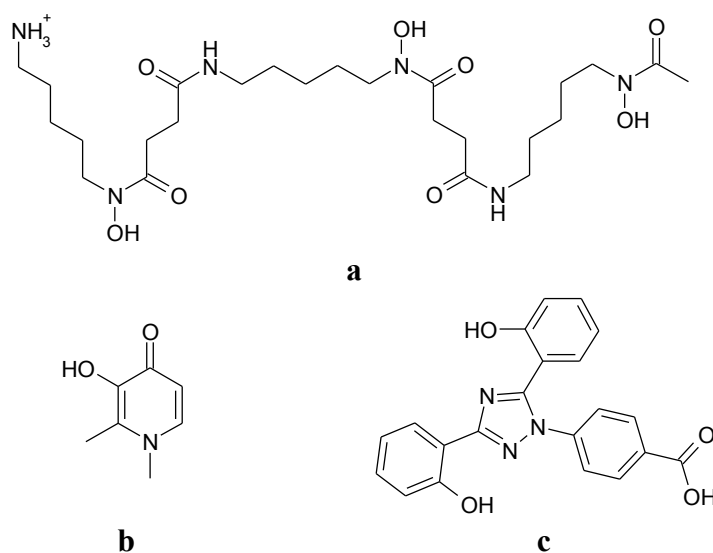


Figure 12 : Chélateurs du fer utilisés en thérapeutique : a) déféroxamine B, b) déféripnone, c) déférasirox

Bien que la déféroxamine B soit la molécule la plus utilisée en thérapeutique, elle présente de nombreux inconvénients. Elle n'est pas active par voie orale et des injections longues, douloureuses et fréquentes doivent être effectuées pour obtenir une certaine efficacité thérapeutique (Tableau 1). En outre, la déféroxamine B peut facilement être détournée par divers microorganismes. Ainsi des cas de mucormycoses à *Rhizopus* ont été rapportés chez des patients subissant des dialyses répétées et de ce fait traités par la déféroxamine B contre l'accumulation de fer et d'aluminium [105-109]. Il s'est avéré que *Rhizopus* détournait la déféroxamine B à son profit pour assurer sa croissance.

Afin d'éviter ce problème, de nouveaux chélateurs du fer ont été développés. Ainsi des modifications structurales ont été réalisées afin d'éviter la captation du complexe ferri-

sidérophore par les microorganismes [110, 111]. Deux chélateurs du fer sont apparus récemment en thérapeutique : le déféripone [93] et le déférasirox [112, 113] (AMM en France en 2006). Outre l'avantage de ne pouvoir être utilisés par les microorganismes, ces molécules peuvent être absorbées par voie orale [93, 113, 114]. Idéalement, un bon chélateur utilisé en thérapeutique doit être sélectif du fer, actif par voie orale, soluble dans l'eau et dans les lipides pour pouvoir accéder facilement à tous les tissus, et le moins toxique possible [11]. Les avantages et les inconvénients des trois molécules utilisées en thérapeutique sont dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des trois principaux chélateurs du fer utilisés en thérapeutique

Composé	Déféroxamine B	Déféripone	Déférasirox
Masse molaire (g/mol)	657	139	373
Propriétés chélatrices	hexadentate	bidentate	tridentate
Dose recommandée (mg/kg/jour)	30-50	75-100	20-30
Fréquence	8-12 h 5 jours/semaine	Oral, 3 fois/jour	Oral, 1 fois/jour
Temps de demi-vie	20-30 min	3-4 h	12-16 h
Excrétion	urines et selles	urines	selles
Effets secondaires	toxicité oculaire et auditive ; retard de croissance ; allergies locales	perturbations gastro-intestinales ; douleurs articulaires ; troubles hématologiques	perturbations gastro-intestinales ; éruptions ; toxicité oculaire et auditive ; augmentation réversible de la créatininémie

Les caractéristiques physicochimiques de la déféroxamine B : grande taille (supérieure à 600 g/mol) et faible solubilité lipidique, font qu'elle ne peut être administrée que par voie parentérale (injections de 8 à 12 heures, 5 à 7 fois par semaine). Au contraire, le déféripone et le déférasirox de petite taille, peuvent être absorbés par voie orale [70]. La déféroxamine B est un ligand hexadentate et une seule molécule suffit pour couvrir les six sites de coordination du fer ferrique. Par contre, le déféripone est un ligand bidentate, trois molécules sont indispensables pour entièrement coordonner le fer [10] ; pour le déférasirox, tridentate [70], deux molécules sont nécessaires (Figure 13). Théoriquement, des concentrations « non-optimisées » en déféripone et déférasirox pourraient conduire à la formation de complexes où l'ensemble des sites de coordination ne serait pas rempli par le ligand et donc complété par de l'eau (Figure 14), ce qui pourrait accentuer la toxicité du fer par induction de la formation de radicaux libres [100]. Cependant aucune preuve de ce phénomène n'a encore été montrée dans les études animales et cliniques [11].

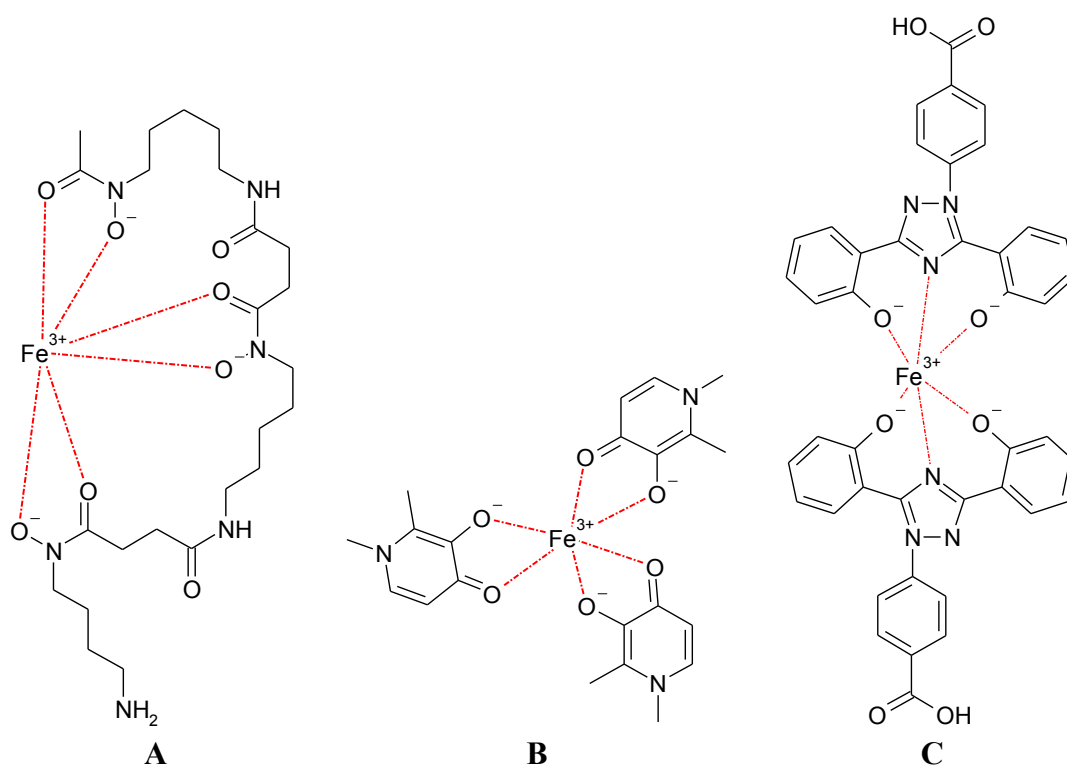


Figure 13 : Structure des ferri-sidérophores utilisés en thérapeutique :

A) déféroxamine B, B) déféripnone, C) déférasirox

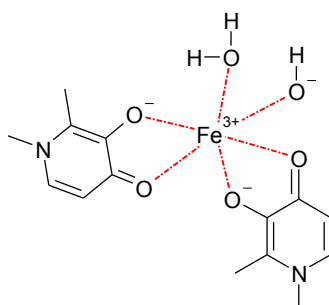


Figure 14 : Exemple de complexe où le fer ferrique n'est pas entièrement complexé par insuffisance en ligands déféripnone

Concernant le temps de demi-vie, plus une molécule est présente longtemps dans la circulation, plus la protection contre l'excès de fer est efficace. Ainsi, les temps de demi-vie des nouvelles molécules (quelques heures) ont largement été augmentés par rapport à celui de la déféroxamine B qui est de l'ordre de la demi-heure (Tableau 1). La solubilité est également un paramètre important. Les complexes solubles dans l'eau, formés avec la déféripnone et la déféroxamine B seront éliminés par les urines, tandis qu'avec le déférasirox, le complexe est plutôt liposoluble et sera donc préférentiellement éliminé dans les selles. Ce dernier cas pose un problème sur le suivi de l'élimination du fer, qui ne peut se faire facilement que par l'analyse des urines [11].

II.4.1.2. Le traitement des infections

Dans le domaine infectieux, certains chélateurs du fer ont montré des activités antimicrobiennes et antiparasitaires intéressantes. Il est possible de bloquer le développement de microorganismes ou de parasites, par séquestration du fer nécessaire à leur croissance en utilisant des chélateurs très performants. Leur action consiste soit en une chélation compétitive du fer, soit en permettant à une molécule antimicrobienne de pénétrer dans l'agent pathogène [92, 115].

Concernant les agents du paludisme (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*), ceux-ci se développent dans la circulation sanguine de l'hôte d'où ils peuvent récupérer le fer nécessaire à sa multiplication. Ces parasites, au taux de réplication élevé, ont un fort besoin en fer qui se trouve dans les hématies (hémoglobine). Le traitement par des chélateurs du fer vise à créer un déficit pour diminuer la vitesse de réplication du parasite. Ainsi les chélateurs naturels ou de synthèse, tels que la déféroxamine B ont montré leur capacité à inhiber la croissance cellulaire des parasites aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* lors d'applications en clinique [116].

Dans le cadre d'une activité antifongique, des hydroxamates, appelés néoénactines (Figure 15), forment une nouvelle famille d'actifs sur une grande variété de champignons pathogènes [117-119]. Leur structure contient un groupement hydroxamate capable de chélater le fer.

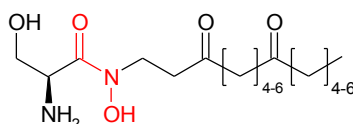


Figure 15 : Néoénactines à activité antifongique

D'autres chélateurs, comme l'albomycine (Figure 16), montrent une forte activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. pneumoniae* [12]. En fait, l'activité antibactérienne de cette molécule est essentiellement due à la partie séryl-thioribosyl pyrimidine qui inhibe la séryl-t-ARN synthétase du microorganisme. En effet, cette partie ne peut exercer son activité que si elle peut passer au travers de la paroi cellulaire du pathogène. Ainsi, son couplage à un groupement de type tri-hydroxamate permet à la molécule de pénétrer dans le microorganisme et d'y exercer son activité antibactérienne. D'autres molécules naturelles résultant d'un couplage entre une partie sidérophore leur permettant de traverser les barrières cellulaires et une partie à activité antibactérienne existent comme la ferrimycine et la salmycine (Figure 16) [12, 120].

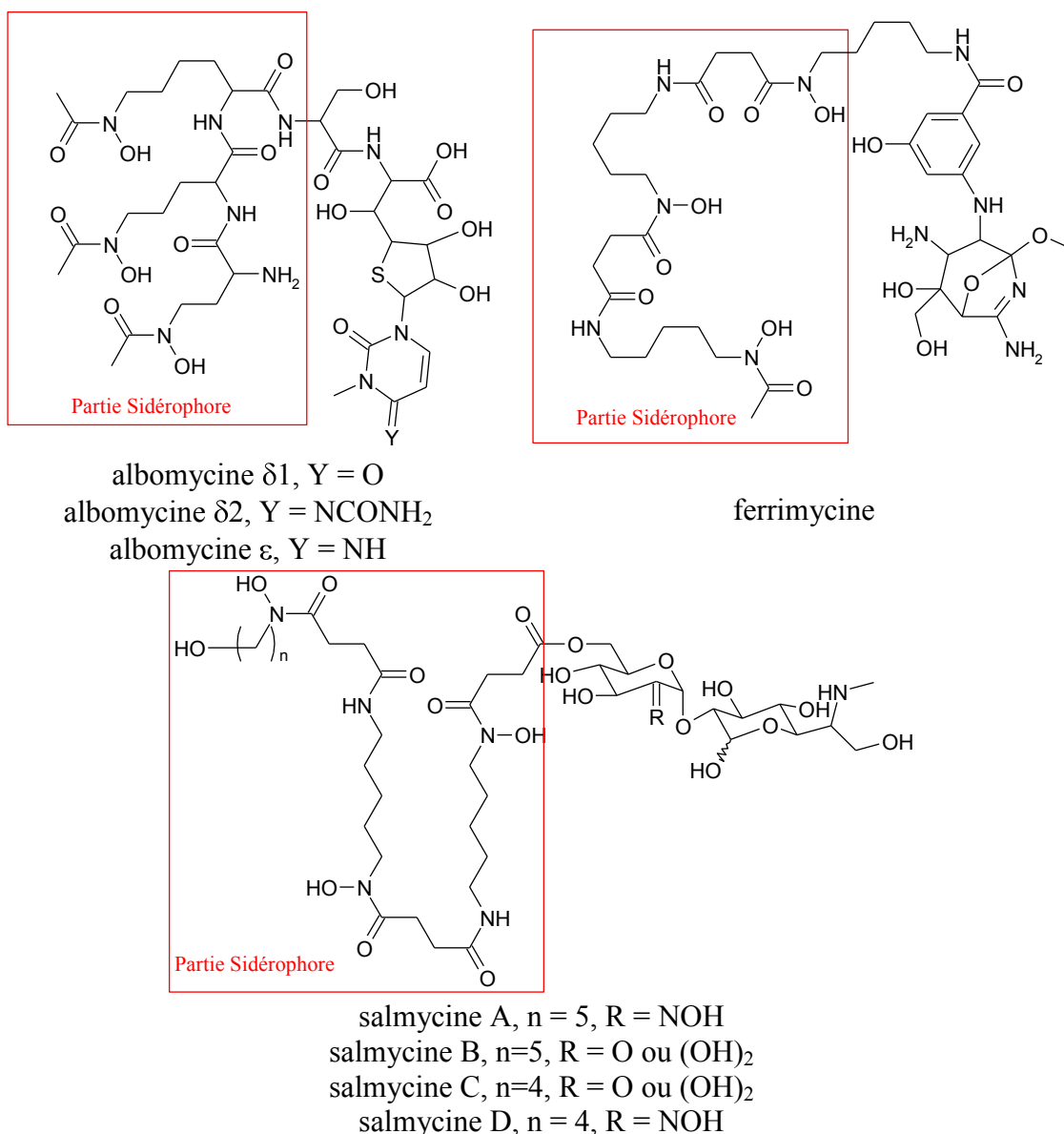


Figure 16 : Structure de l'albomycine, de la ferrimycine et de la salmycine [120, 121]

Cette stratégie, dite « du cheval de Troie » [122], constitue une méthode de vectorisation d'une molécule. Dans cette optique, des composés de ce type ont été synthétisés (Figure 17) afin d'améliorer l'activité antibactérienne et antifongique de certains médicaments par rapport au principe actif seul [92, 103, 122-124]. Dans certains cas, l'activité peut encore être améliorée en greffant plusieurs principes actifs sur le même sidérophore [125]. Des études ont montré que l'action de ces conjugués pouvait être fortement dépendante de la présence de fer dans le milieu avec des répercussions quant à leur efficacité sur les microorganismes [13, 124]. Des cas de résistance à ces conjugués sont apparues. Cependant, des mutations dans les mécanismes d'acquisition du fer entraînent généralement une perte du pouvoir pathogène de ces microorganismes [120, 126].

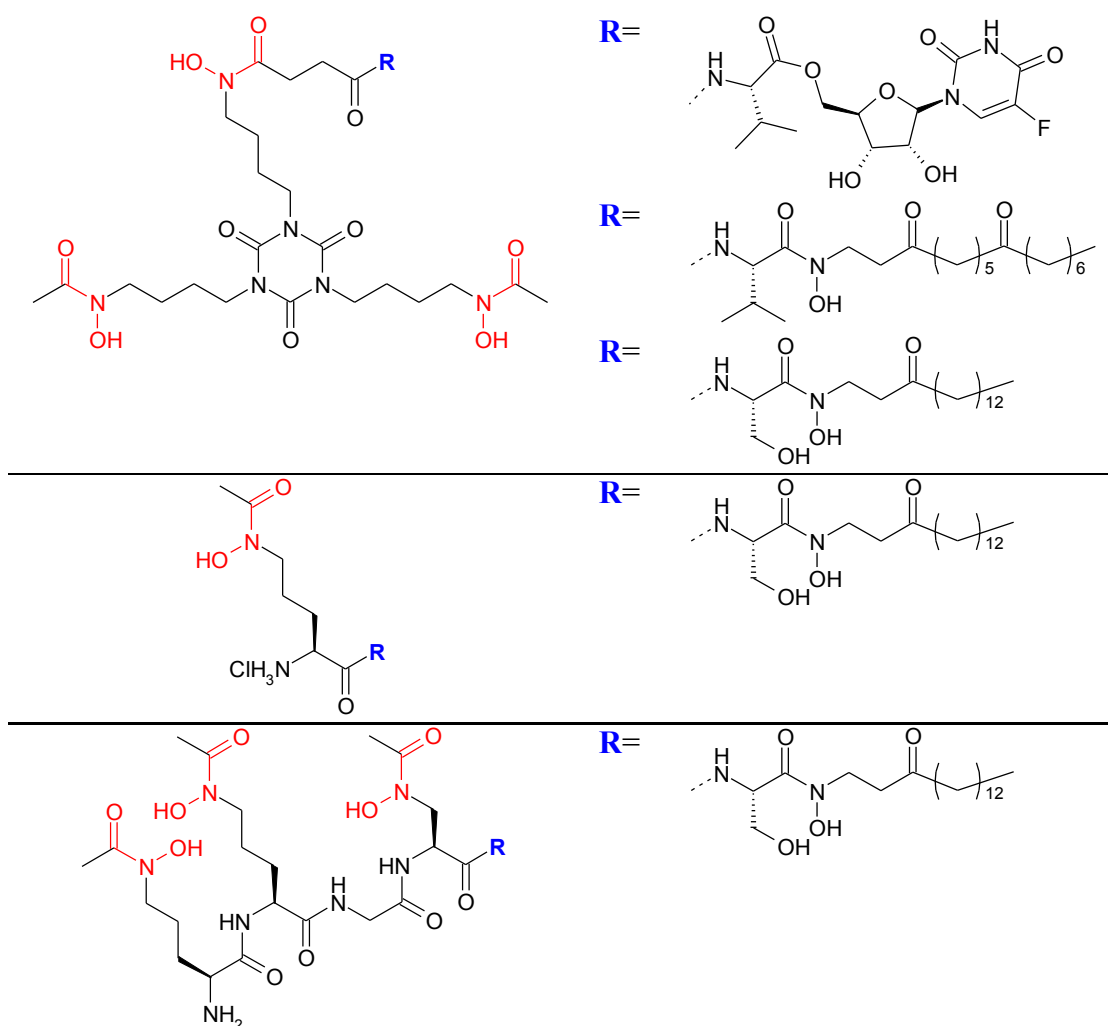


Figure 17 : Exemples de conjugués sidérophore-molécule à activité antifongique [13, 127] (en rouge les groupements permettant la chélation du fer)

Plus récemment, des conjugués antibactériens ont été liés à des implants ou cathéters grâce à leur capacités à chélater fortement les métaux. Leur présence permet de réduire le risque d'infections [128].

II.4.1.1. L'activité anti-oxydante

Un sidérophore tel que l'acide dimérumique (Figure 18) présente des propriétés antioxydantes. En effet, il est capable de neutraliser les radicaux libres tel que $\text{HO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) [129]. En outre, il protégerait le tissu hépatique de dommages provoqués par le tétrachlorure de méthylène (CCl_4). L'action antioxydante de l'acide dimérumique s'explique par les échanges électroniques entre ses fonctions hydroxamates et les radicaux libres entraînant une diminution de ces derniers [130]. De plus,

en chélatant le fer libre, il limite la formation de ces radicaux par la réaction de Fenton. Cette double action anti-oxydante est également connue pour la déféroxamine B [88, 95].

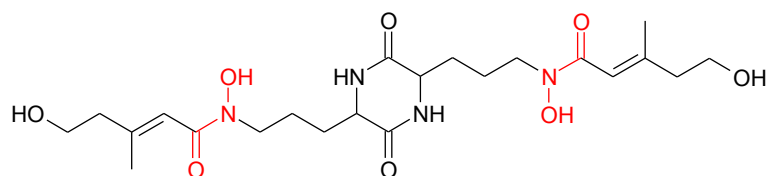


Figure 18 : Structure de l'acide dimérumique

Par ailleurs, les chélateurs du fer peuvent s'opposer aux effets secondaires de produits variés tels que le paraquat (dichlorure de N,N'-diméthyl-4,4'-bipyridinium) et la doxorubicine (Figure 19).

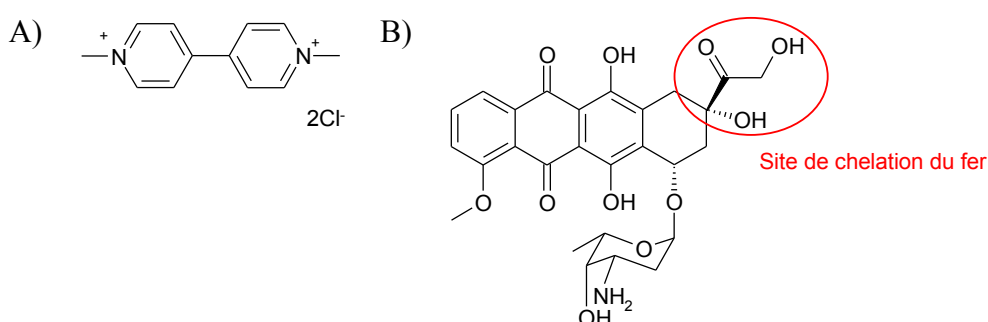


Figure 19 : Structure chimique du paraquat (A) et de la doxorubicine (B)

Le paraquat est un herbicide de contact, commercialisé sous forme de dichlorure de paraquat, et utilisé dans les cultures semencières et les vergers. Il peut également agir comme dessiccant et défoliant pour les fanes de coton et de pommes de terre. Malheureusement, le paraquat tend à s'accumuler dans les poumons des personnes qui manipulent ce produit et peut être à l'origine de dommages hépatiques. Sa toxicité provient de sa réaction avec la réductase du cytochrome P₄₅₀, qui engendre la formation de radicaux hydroxyles à l'origine de dommages hépatiques. Ainsi le traitement par des chélateurs du fer permet de minimiser cette toxicité [95].

La doxorubicine (et les autres molécules de ce type) est capable d'interagir avec l'ADN probablement en s'y intercalant, aboutissant ainsi à l'inhibition de la topoisomérase II. Cette molécule est extrêmement efficace, et est utilisée en premier choix pour le traitement des leucémies, des lymphomes et d'une grande variété de tumeurs solides. Cependant la doxorubicine possède un site de chélation capable de prendre le fer à la ferritine et d'engendrer la formation de radicaux libres. Cet effet indésirable touche particulièrement le tissu cardiaque où la doxorubicine tend à s'accumuler et entraîne une toxicité cumulative. Un

traitement à la déféroxamine B permet de protéger l'organisme humain des dommages induits par un traitement à la doxorubicine [95].

II.4.1.2. L'inhibition spécifique d'enzymes

Les enzymes contenant du fer peuvent être divisées en deux catégories : celles de type héminique où le fer est au centre d'un noyau tétrapyrrolique, appelé hème, et celles de type non-héminique. Pour les enzymes héminiques, le fer est difficilement accessible et les chélateurs du fer ne peuvent le soustraire au noyau tétrapyrrolique. Ils sont en général peu actifs sur ces enzymes. Par contre, les enzymes non-héminiques sont plus facilement inhibées. C'est le cas des lipoxygénases et des réductases ribonucléotidiques [95].

Les lipoxygénases catalysent des réactions d'oxydation des acides gras. L'inhibition de la 5-lipoxygénase aboutit à une baisse de production des leucotriènes impliqués dans les manifestations de maladies telles que l'asthme, l'arthrite, le psoriasis. Les chélateurs du fer, et en particulier les hydroxamates, sont capable de limiter cette production de leucotriènes [131, 132].

Des chélateurs du fer, comme l'hadacine [133-136], la déféroxamine B [137] et la déferrithiocine [138] (Figure 20), sont également connus pour leur activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses. Cette activité anticancéreuse s'explique par une moindre disponibilité du fer nécessaire à la prolifération des cellules cancéreuses. Il a été rapporté que la surcharge en fer dans l'hémochromatose génétique est fréquemment associée au développement de carcinomes hépatocellulaires [10, 95]. Les chélateurs du fer semblent donc constituer un moyen thérapeutique intéressant pour lutter contre la prolifération tumorale [103, 137]. Plus précisément, leur action se situe au niveau de l'inhibition d'enzymes dépendantes du fer telles que les réductases ribonucléotidiques qui catalysent une étape essentielle lors de la synthèse de l'ADN. Leur inhibition aboutira à un arrêt du cycle cellulaire. Parmi les chélateurs du fer utilisés dans le traitement de certains cancers, il y a les catéchols qui ont montré une activité importante *in vitro* contre les lignées cellulaires leucémiques [139]. Toujours sur le même principe, des activités antivirales ont été obtenues contre le virus de l'herpès par blocage de la réplication de son ADN grâce à des chélateurs du fer [139].

Malheureusement, la plupart de ces chélateurs présentent une certaine toxicité, en particulier pour la moelle osseuse, ce qui limite leur utilisation dans le traitement de certains cancers.

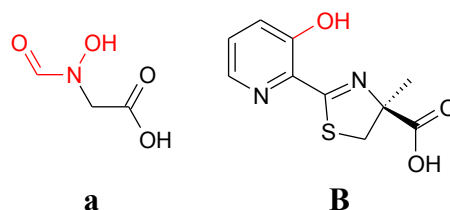


Figure 20 : Sidérophores à activité antiproliférative : a) hadacine, b) déferrithiocine

Outre les enzymes fer-dépendantes, certains chélateurs du fer montrent des activités vis-à-vis d'enzymes zinc-dépendantes comme les histones désacétylases (HDAC) [140-143]. Ces dernières sont essentielles dans la transcription des gènes. La perte de groupements acétyles des histones induites par ces HDAC provoque le repliement de l'ADN (Figure 21) empêchant toute transcription des gènes, en particulier ceux de l'apoptose. Lorsque ces enzymes sont inhibées par les chélateurs de métaux, l'expression des gènes est possible. L'apoptose peut de ce fait être déclenchée permettant l'élimination des cellules anormales cancéreuses. Il en résulte que les molécules capables de réguler l'activité des HDAC telles que les chélateurs de métaux peuvent être utiles en thérapie anticancéreuse [143].

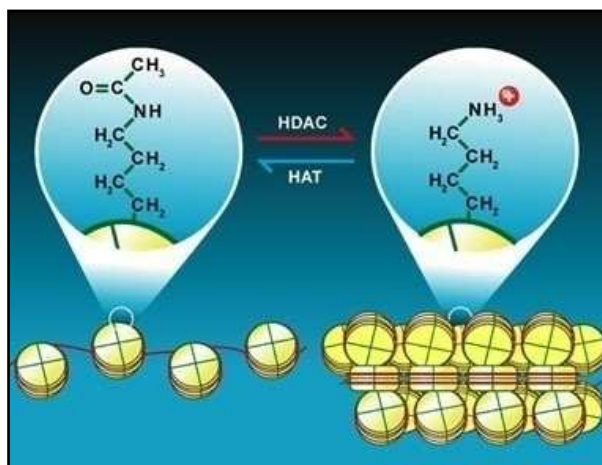


Figure 21 : Mécanisme d'action des HDAC et HAT (HDAC: histone déacétylase, HAT: histone acétylase) [143]

II.4.2. Les autres applications

Au-delà de leur intérêt thérapeutique, les chélateurs du fer sont étudiés pour d'autres applications. Ces applications sont issues de leur forte affinité pour les métaux en général.

II.4.2.1. La dépollution des sols

Les chélateurs du fer ont une forte affinité pour d'autres métaux comme les actinides (neptunium, plutonium, etc.), le cuivre, le zinc, le cadmium ou le plomb. Ils peuvent donc être

utilisés pour la récupération de métaux contenus dans les déchets ou dans les sols contaminés [5, 144], comme par exemple l'uranium (VI) [145], le fer et l'aluminium [146].

Ces composés peuvent également présenter des activités enzymatiques pouvant être mis à profit dans la dépollution. Ainsi, il a été observé que les acides hydroxamiques présentaient une activité similaire à la phénoloxydase [147], enzyme utilisée pour dégrader la lignine et la chlorolignine contenues dans les effluents rejetés par l'industrie papetière [148].

II.4.2.2. La régulation de la croissance des plantes

Plusieurs études ont montré la présence de sidérophores dans le sol [63, 149]. Ces sidérophores seraient issus des microorganismes ou des plantes (phytosidérophores) qui les sécrètent afin d'assurer l'apport en fer pour leur croissance. Ainsi, les sidérophores sont utilisés dans les engrais de manière à réguler l'apport en fer chez les plantes, et donc favoriser leur croissance [92, 150].

II.4.2.3. Le recyclage des déchets nucléaires

Lors du retraitement des sources d'énergie nucléaire (uranium, plutonium, neptunium, etc.) une étape d'extraction à l'aide de solvants permet la séparation de l'uranium du plutonium. Cependant des difficultés de contrôle des états d'oxydation du neptunium entraînent une mauvaise purification du plutonium qui se retrouve pollué. L'utilisation d'un chélateur durant cette étape permettrait d'améliorer la pureté de ces sources énergétiques [5].

II.4.2.4. Le dosage de substances

Le dosage du fer peut être réalisé en passant par la formation de complexe ferri-sidérophore. La forte affinité pour le fer permet de le soustraire à d'autres complexes tels que la chlorophylle, la transferrine, et ainsi de le doser. Ce dosage est réalisé par CLHP avec pour étalon la déféroxamine B [151].

De nouvelles applications analytiques sont apparues plus récemment. Elles concernent l'utilisation de sondes électrochimiques qui comportent des surfaces modifiées par l'ajout de molécules complexantes du fer et permettant ainsi le dosage spécifique du fer [152]. Ces sondes au delà de leur interaction avec le fer, peuvent également servir *in vivo* à la détection de composés tels que l'oxyde nitrique [153].

Chapitre 2 :
Les sidérophores de
Scedosporium apiospermum

I. Méthodes d'étude des sidérophores

Les sidérophores sont des molécules synthétisées par les microorganismes tels que les bactéries et les champignons, et qui se retrouvent à des concentrations très faibles dans leur environnement. Pour les étudier, il est impératif de stimuler leur production en tenant compte des conditions de culture de ces microorganismes. S'ensuit leur détection pour laquelle diverses méthodes existent : méthodes chimiques générales en milieu solide ou liquide (chrome azurol S - CAS, chlorure ferrique, ...), méthodes plus spécifiques permettant de classer les sidérophores. Ces dernières comprennent des réactions chimiques de caractérisation ou des tests biologiques.

Une fois détectés, les sidérophores devront être identifiés. L'étude consiste en une extraction du milieu de culture suivie d'une analyse structurale permettant de ranger le sidérophore dans l'une des classes connues.

I.1. Les méthodes de détection des sidérophores

Pour détecter et quantifier la production de sidérophores par les microorganismes, un grand nombre de méthodes existe [154-156]. Ces méthodes peuvent être chimiques ou biologiques, générales ou spécifiques d'une classe de sidérophores (catécholes, hydroxamates ou acide α -hydroxycarboxylique).

I.1.1. Les méthodes chimiques

Ces méthodes sont basées sur des réactions chimiques. Certaines sont générales, d'autres sont spécifiques d'un type de sidérophores. Ces dernières utilisent les propriétés du groupement chimique impliqué dans la chélation avec le fer.

I.1.1.1. Méthodes au chrome azurol S

La culture sur milieu gélosé contenant du chrome azurol S (CAS) permet de détecter la sécrétion de sidérophores par les microorganismes [154]. Le principe est que le milieu de culture possède initialement une couleur bleue due au complexe fer-CAS-hexadécyltriméthylammonium (complexe Fer/CAS/HDTMA) qui vire au rouge-orangé suite au déplacement du fer par le sidérophore produit par le microorganisme. Cette compétition pour le fer se fera au profit du sidérophore formant ainsi le ferri-sidérophore de couleur rouge-orangée (Figure 22).

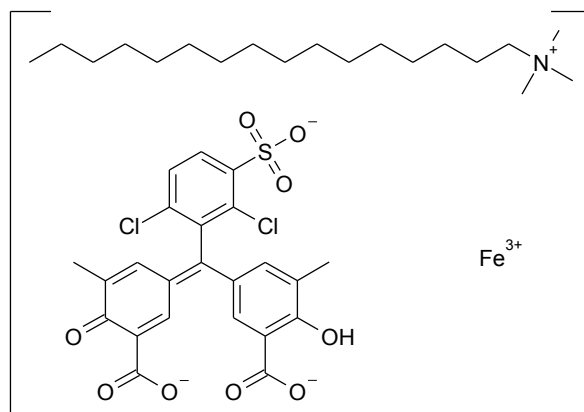


Figure 22 : Complexe fer/CAS/HDTMA de couleur bleue

Après plusieurs jours de culture, un halo rouge/orangé se forme autour de la colonie fongique en croissance. Il contraste avec la coloration bleue du milieu de culture (Figure 23). L'examen visuel permet de s'assurer de la faculté des microorganismes à produire des sidérophores. Le calcul du rapport $\frac{\text{diamètre du halo}}{\text{diamètre de la colonie fongique}}$ permet de comparer les différences de production entre les souches fongiques.



Figure 23 : Détection des sidérophores sécrétés par un microorganisme cultivé sur milieu gélosé CAS

Cependant, cette méthode présente des limites, notamment la présence de composés toxiques tels que le HDTMA pouvant inhiber la croissance du microorganisme. C'est le cas pour les bactéries Gram-positives ou pour certains champignons. Il est alors possible de contourner cette difficulté en procédant en deux étapes : tout d'abord cultiver le microorganisme sur un milieu solide déplété en fer, puis couler le milieu CAS au dessus du milieu de culture après quelques jours de culture [157]. La diffusion des sidérophores d'une couche à l'autre provoque alors un changement de couleur du milieu CAS, et une lecture des diamètres des halos et des colonies est possible.

Les résultats obtenus par cette méthode sont de nature semi-quantitative et ne permettent pas de quantifier précisément la production de sidérophores. Une méthode de dosage en milieu liquide utilisant le CAS a été mise au point pour l'évaluation des sidérophores sécrétés dans les surnageants de culture. La couleur du milieu va virer progressivement du bleu au rouge-orangé en fonction de la sécrétion de sidérophores. La diminution de l'absorbance (630 nm) sera corrélée à la production de sidérophores [65, 154].

I.1.1.2. Méthode au perchlorate ou au chlorure ferrique

Il est possible de quantifier directement la production de sidérophores par mesure de l'absorbance lors de leur complexation avec le fer. Ces ferri-sidérophores sont généralement de couleur rouge-orangée. Pour détecter leur présence, un excès de fer ferrique est ajouté au surnageant de culture sous forme de chlorure ferrique (FeCl_3) ou de perchlorate ferrique ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$) en milieu acidifié par l'acide chlorhydrique. La mesure d'absorbance s'effectue alors entre 400 et 500 nm. Dans le cas de la féroxamine B, la longueur d'onde du maximum d'absorption se situe à 435 nm (Figure 24). Il est donc possible de relier la quantité de sidérophores à la mesure d'absorbance à une longueur d'onde choisie [155, 158].

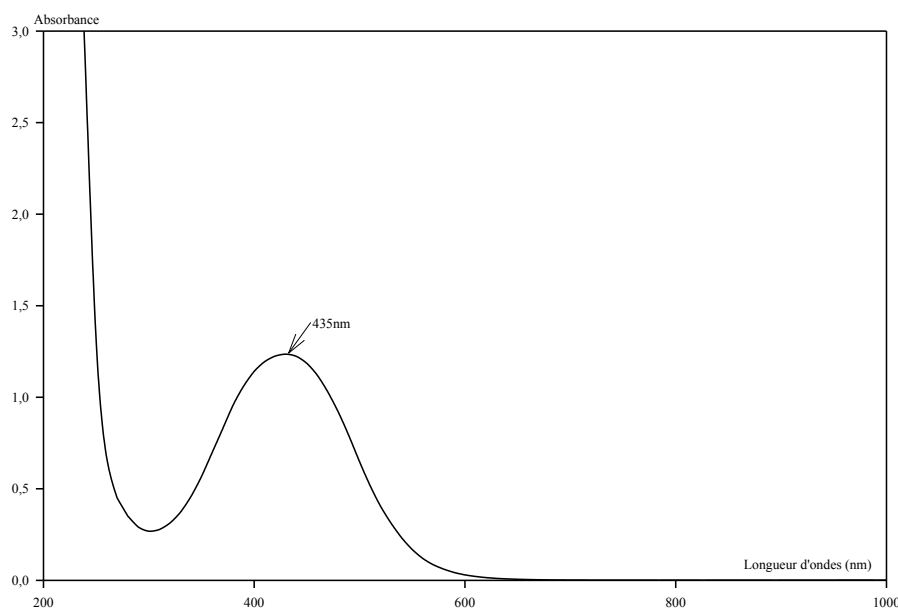


Figure 24 : Spectre d'absorbance de la féroxamine B dans l'UV-visible

I.1.1.3. Détection des sidérophores de type phénol/catéchol

Arnow a mis au point une méthode qualitative permettant la mise en évidence des sidérophores de type phénol/catéchol [155, 159, 160]. Ce test est basé sur la réaction du

groupement catéchol qui, en présence de nitrite de molybdate, donne une coloration jaune en milieu acide qui doit être suivie en milieu basique d'un virage au rouge.

Il est également possible de déterminer la présence de groupements de type phénol/catéchol par spectrophotométrie. En effet, ils présentent une bande d'absorption caractéristique à 318 nm [155, 161]. Après étalonnage, cette méthode permet également de les quantifier.

I.1.1.4. Détection des sidérophores de type hydroxamate

L'utilisation des méthodes générales (FeCl_3 ou $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$) en milieu acide permet de détecter spécifiquement les sidérophores de type hydroxamate car les complexes formés par les sidérophores de type phénol/catéchol ne sont pas stables dans ces conditions [156, 162, 163].

Csáky a mis au point un test spécifique et sensible [156, 162]. Ce test est basé sur la dégradation par de l'acide sulfurique des hydroxamates puis de leur oxydation par du diiode pour former des acides nitreux [68]. Ce test présente l'inconvénient de n'être que semi-quantitatif car la réaction n'est pas quantitative [164]. Pour pallier à cet inconvénient, il est possible de réaliser une oxydation de ces groupements par l'acide periodique, qui fournit un produit absorbant spécifiquement à 264 nm [155, 159, 160]. Après étalonnage, une quantification est possible.

Une dernière méthode, appelée Test de Snow, basée sur la réduction du sel de tétrazolium après l'hydrolyse de la fonction hydroxamate en milieu basique, fait apparaître une coloration rouge caractéristique pour les groupements hydroxamates [165, 166].

Au-delà de la mise en évidence des sidérophores de type hydroxamate, des études approfondies par spectrophotométrie UV-visible peuvent fournir des précisions sur la structure mono-, di- ou tri-hydroxamate de ces sidérophores [166]. Par exemple, la mesure en spectrophotométrie UV-visible à différents pHs permet de mettre en évidence le nombre de groupements hydroxamates présents dans un sidérophore :

- tri-hydroxamates : peu de variation d'absorbance pour un pH variant entre 4 et 7,
- di-hydroxamates : une grande variation d'absorbance est observée à un pH de 4-5 due à la dissociation du sidérophore,
- mono-hydroxamate : à un pH inférieur à 4, une variation du maximum d'absorbance est observée aux alentours de 500-520 nm.

I.1.1.5. Détection des sidérophores de type acide α -hydroxycarboxylique

La détection des sidérophores de type acide α -hydroxycarboxylique utilise la présence de fonctions acides carboxyliques dans ces sidérophores. L'ajout de ces sidérophores à une solution légèrement basique, va provoquer des modifications de pH qui seront visualisées par virage de la phénolphthaléine [166].

Une seconde méthode consiste à former des complexes avec le sulfate de cuivre (II) en milieu acide, qui vont présenter un maximum d'absorption compris entre 190 nm et 280 nm [150, 166].

I.1.2. Les méthodes biologiques

Les méthodes biologiques, en général plus sensibles et plus spécifiques, utilisent des microorganismes [68]. Elles sont basées sur la capacité des sidérophores ajoutés au milieu de culture à induire la croissance de microorganismes [156, 162, 167]. Pour réaliser ces expériences, les milieux en surfusion sont inoculés par une bactérie, puis coulés en boîte de Pétri. Ensuite est déposé sur le milieu de culture un disque de diffusion imbibé de sidérophores qui va entraîner ou pas la croissance de la bactérie. Un halo de bactérie va alors se former autour du disque à analyser, halo qui sera plus ou moins important en fonction de la quantité de sidérophores contenue dans le disque.

Cette expérience peut également être menée en inoculant le microorganisme à tester au centre de la gélose. Si le microorganisme sécrète un sidérophore, celui-ci va diffuser et induire la croissance d'une bactérie témoin (Figure 25).

Pour ne pas fausser les résultats, les bactéries-témoins utilisées ne produisent pas naturellement de sidérophores. Voici quelques exemples de bactéries utilisées : *Aureobacterium flavescens* JG9 pour la détection de sidérophores de type hydroxamate [168], des mutants enb-1 et enb-7 de *Salmonella typhimurium* LT-2 pour la détection des phénols/catéchols [68] et *Morganella morganii* SBK3 pour les sidérophores de type acide α -hydroxycarboxylique [158].

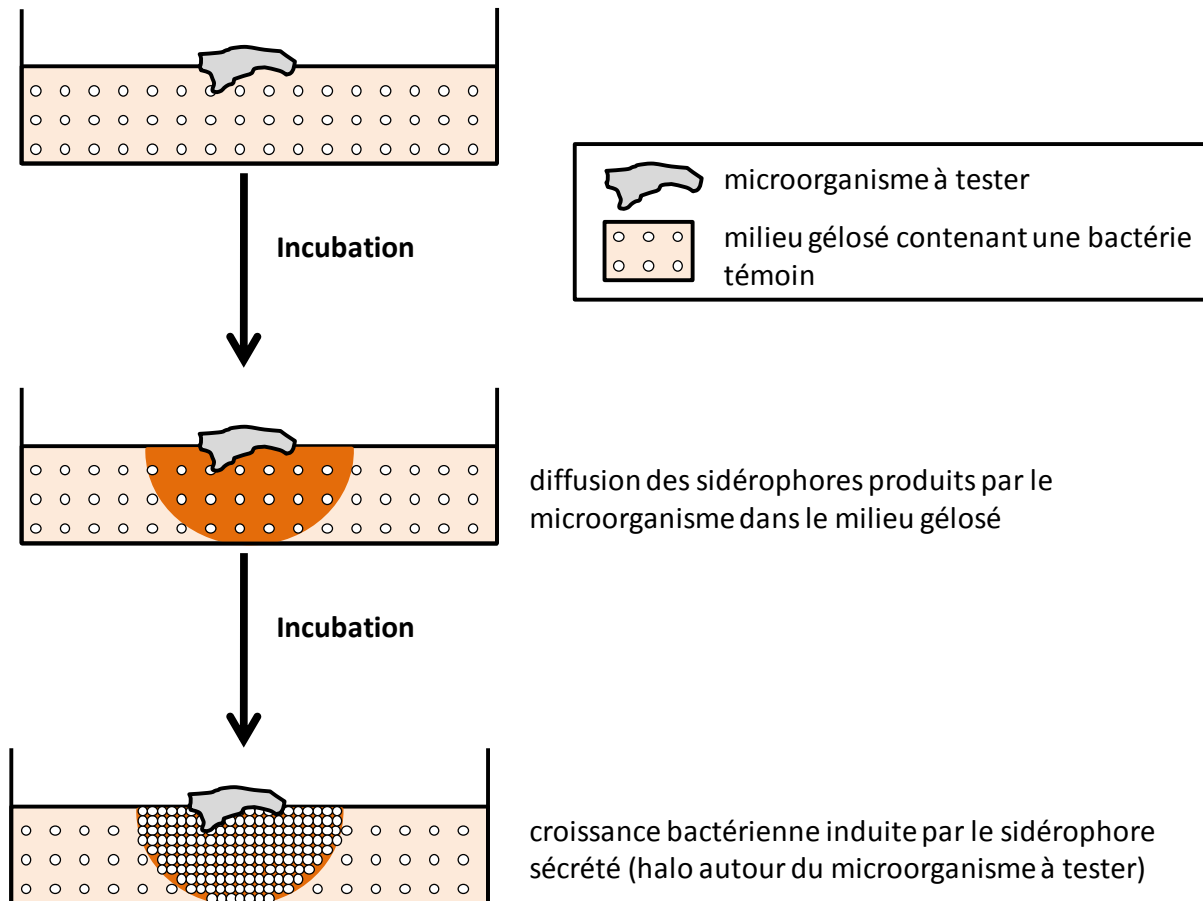


Figure 25 : Test biologique en milieu gélosé pour la mise en évidence de la production de sidérophores

I.2. Production des sidérophores par les microorganismes

En général, les quantités de sidérophores sécrétés sont relativement faibles, même si les champignons ont tendance à en synthétiser en plus grandes quantités que les bactéries [6]. Différents facteurs peuvent stimuler la production de sidérophores par les microorganismes.

Un des principaux facteurs est la concentration en fer du milieu. En effet, il a été observé que la production de sidérophores est fortement stimulée par la déplétion en fer du milieu de culture [60, 68, 169, 170]. En effet, les sidérophores ne sont sécrétés par le microorganisme que lorsque celui-ci subit un stress ferrique. On parle de carence lorsque la concentration en fer du milieu de culture est inférieure à $0,1 \mu\text{M}$ [68, 171]. Cette valeur peut varier en fonction du microorganisme. Pour bon nombre d'espèces, $10 \mu\text{M}$ en fer constituent une valeur seuil.

Afin de dépléter un milieu de culture en fer, plusieurs moyens sont utilisés :

- l'extraction du fer par la 8-hydroxyquinoline dans du chloroforme ; cette molécule possède une grande affinité pour le fer,
- le passage du milieu de culture sur résine de type polyaminocarboxylate (Chelex) capable de retenir les ions fer [172],
- l'ultrafiltration du milieu de culture après ajout d'ovotransferrine qui va fixer le fer, technique valable pour de petits volumes de milieux à traiter.

Actuellement, il est possible de se procurer des milieux de culture commerciaux déplétés en fer et autres métaux (Cu, Zn). Une autre solution permet de provoquer un stress ferrique chez les microorganismes. Elle consiste en l'ajout d'une molécule chélatrice du fer dans le milieu de culture, telles que l'EDDA, 2,2-dipyridyl [65, 173]. Pour s'assurer qu'il n'y ait aucune source de fer dans le milieu, la verrerie de laboratoire est généralement nettoyée à l'acide nitrique 4 N.

Un autre facteur ayant une influence sur la production de sidérophores est la source de carbone utilisée par le microorganisme. Il est connu que pour la production d'aérobactine par *Aerobacter aerogenes* l'utilisation de succinate à la place du glucose permet d'avoir une production plus importante de sidérophores [174]. Cet effet est généralement constaté pour les microorganismes aérobies [68].

Le pH peut exercer une influence notable sur la production de sidérophores [63]. Le maintien d'un pH neutre, voire légèrement basique, rend le fer moins soluble, donc moins disponible pour les microorganismes, ce qui stimule la sécrétion de sidérophores [68].

L'addition d'ions métalliques peut avoir également un effet sur la production de sidérophores, comme les ions Al^{3+} et Cr^{3+} [68]. Ces ions se substituent au fer pour former des complexes avec les sidérophores inutilisables par les microorganismes. Le microorganisme répondra en augmentant sa production de sidérophores.

I.3. Purification des sidérophores

Pour purifier les sidérophores, ils doivent être extraits du milieu de culture, qui est un mélange relativement complexe de sels, de petites molécules organiques (vitamines, sucres, acides aminés, ...) et de protéines sécrétées par le microorganisme.

Les méthodes d'extractions consistent à isoler des molécules en fonction de leur polarité. Les sidérophores sont des molécules de polarité moyenne, pouvant former généralement un grand nombre de liaisons hydrogène [68, 162, 175]. Historiquement, les

extractions se faisaient en utilisant deux liquides non miscibles dans lesquels les molécules se répartissaient. Ces extractions liquide/liquide restent des méthodes de choix [172, 176-179], mais plus récemment d'autres méthodes utilisant des résines adsorbantes ont vu le jour [180-182].

L'efficacité de ces méthodes dépend de la nature des sidérophores et de leur état complexé ou non au fer [175].

I.3.1. Méthodes d'extraction

Plusieurs solvants ou mélange de solvants sont utilisés pour assurer l'extraction des sidérophores. Celle-ci peut s'effectuer en une ou deux étapes (Figure 26).

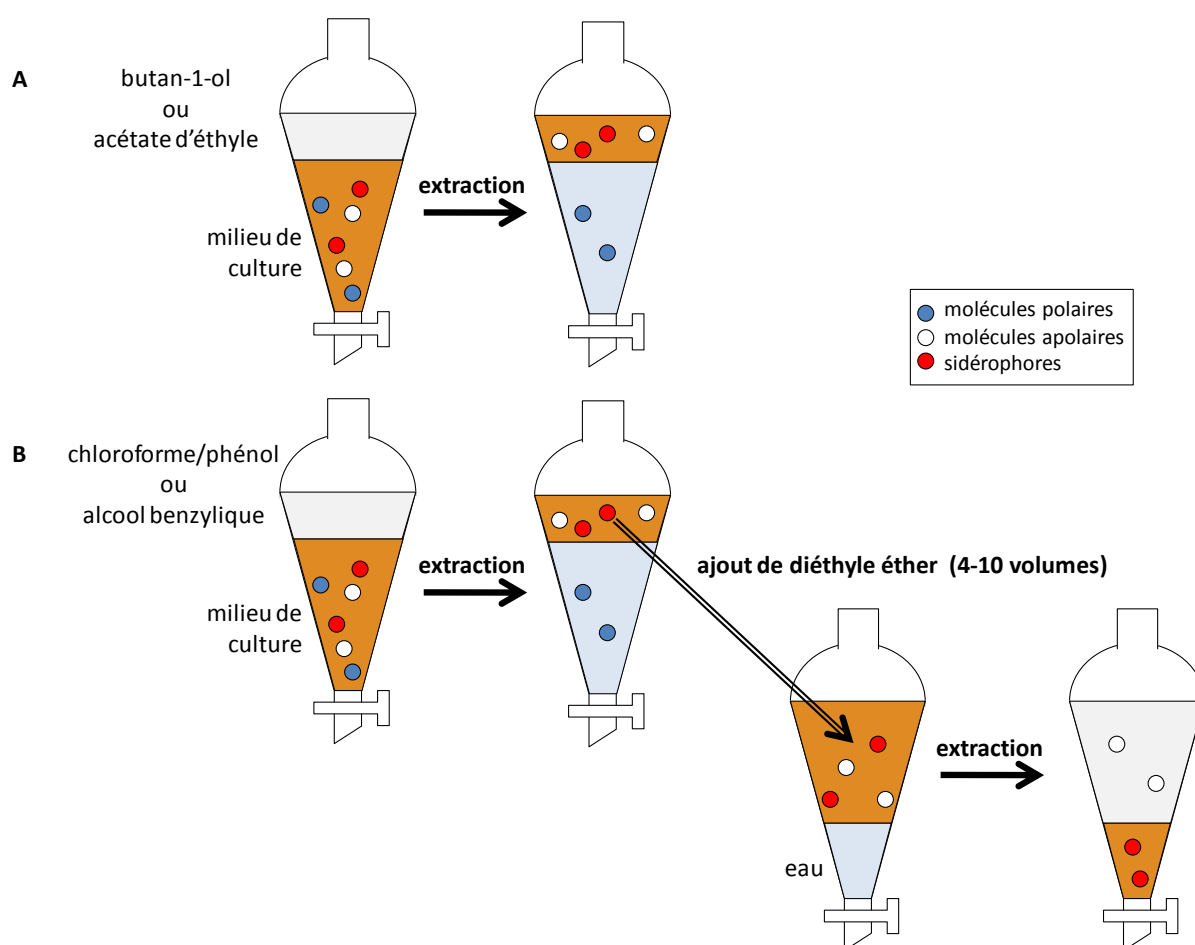


Figure 26 : Méthodes d'extraction des sidérophores ; A, extraction en une étape, B, extraction en deux étapes

Une extraction simple (Figure 26-A) peut être suffisante, à l'aide de solvants organiques tel que le butan-1-ol [183] ou l'acétate d'éthyle [182], pour extraire les sidérophores du milieu de culture.

Cependant, la méthode la plus utilisée, consiste en une première extraction à l'aide d'un mélange eau/chloroforme-phénol, suivie d'une seconde extraction par l'eau après ajout d'un grand volume de diéthyle éther (4-10 volumes) [175, 177-179, 183-185]. Pour remplacer le phénol qui est toxique, l'utilisation d'alcool benzylique est maintenant préférée à la phase chloroforme-phénol [65, 168, 172, 176, 186-191]. La séparation des phases est alors plus délicate en raison de la formation d'une émulsion, c'est pourquoi du sulfate d'ammonium est ajouté dans le milieu de culture. Cette double extraction (extraction alcool benzylique/diéthyle éther/eau) va aboutir à l'élimination d'une part des sels et des molécules insolubles dans les solvants organiques (même polaires) et d'autre part des molécules apolaires (Figure 26-B).

De nouvelles méthodes d'extraction peuvent être utilisées. Celles-ci présentent les avantages d'être plus performantes et/ou plus rapides. Parfois, elles sont utilisées lorsque les premières méthodes ont échoué [175].

Une de ces méthodes consiste en l'utilisation de résines adsorbantes de type Amberlite XAD de faible polarité (Figure 27). Une large gamme existe [192, 193] et plusieurs d'entre elles sont utilisées pour l'extraction des sidérophores (Tableau 2) : XAD-2 [168, 175, 181, 194-196], XAD-4 [182, 197, 198], XAD-16 [189] et Lewatit OC 1031 [199]. D'autres méthodes permettent l'extraction des sidérophores *via* le passage du milieu de culture au travers d'une résine échangeuse d'ions de type Dowex 2X8 [180, 200]. L'utilisation de ces résines peut être complétée par une extraction alcool benzylique/diéthyle éther/eau pour améliorer la pureté de l'extrait [186].

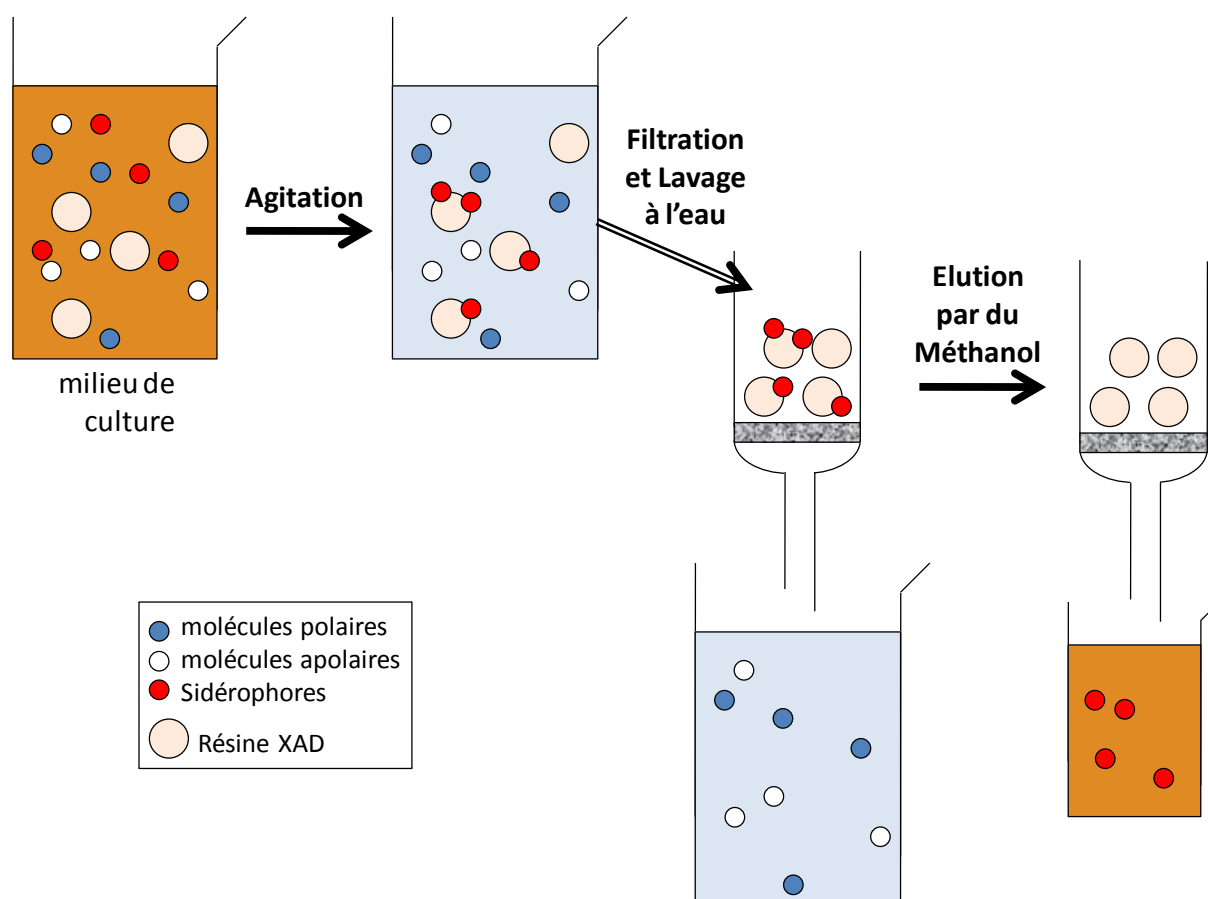


Figure 27 : Extraction sur résine de type Amberlite XAD

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes résines [192, 193]

résine		type de résine	surface active (m ² /g)	porosité (ml/ml)	taille des particules (mm)	pores (Å)
Amberlite	XAD-2	phénylique	> 300	0,41	0.3-0.8	90
	XAD-4	phénylique	> 750	≥ 0,50	0,3-1,2	55-80
	XAD-16	phénylique	> 800	≥ 0,55	0,3-1,2	200-250
Lewatit OC 1031		phénylique	-	-	-	-

Pour des analyses rapides, les extractions peuvent être réalisées grâce à des cartouches SPE ou contenant des résines C₁₈ (Sep-Pak RP-C₁₈). Les extraits peuvent ensuite être directement analysés par CLHP [201, 202].

I.3.2. Méthodes de purification

Une fois extraits du milieu de culture, les sidérophores doivent être purifiés. Plusieurs méthodes de purification sont à disposition [175] :

- la chromatographie sur silice [188] ou la chromatographie en phase inverse [191, 194] : la séparation est basée sur la polarité des molécules ; les molécules étant généralement polaires, la séparation sur phase inverse est la plus utilisée ;
- la chromatographie par exclusion stérique [190] : la séparation s'effectue par passage de molécules à travers une résine poreuse séparant les molécules selon leur masse molaire [203] ;
- la chromatographie par échange d'ions [184, 190] : la séparation se fait alors selon la charge des molécules en fonction du pH.

Devant les difficultés à purifier les sidérophores, les protocoles de purifications font en général appel à une combinaison de méthodes chromatographiques [172, 180, 200].

I.4. Caractérisation des sidérophores

Une fois le sidérophore obtenu à l'état purifié, leur caractérisation devient possible. Pour cela, la Résonance Magnétique Nucléaire (^1H -RMN et ^{13}C -RMN) [200] combinée à de la Spectrométrie de Masse (SM) [162] permet de connaître sa structure chimique. Dans le cas de la RMN, le fer doit être éliminé du ferri-sidérophore. Sa présence est préjudiciable à la bonne conduite des analyses. Pour cela, l'utilisation de 8-hydroxyquinoléine, qui va former avec le fer un complexe plus stable qu'avec le sidérophore, constitue une méthode de choix pour l'éliminer [65, 162].

II. Matériel et Méthodes :

II.1. Microorganismes

II.1.1. Les souches fongiques utilisées

Un grand nombre de souches fongiques d'origines variées a été utilisé (Tableau 3). Elles appartiennent aux espèces suivantes : *S. apiospermum*, *S. aurantiacum*, *P. boydii*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, ou encore *E. dermatitidis*.

Tableau 3 : Origines des champignons testés

isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose					
Microorganismes	Référence IHEM	Référence LMA	Source	Date	Lieu
<i>S. apiospermum</i>	14263	49800204 col.1	crachat	09/01/98	Angers
	15579	49900353 col.1	crachat	13/10/99	Angers
	14451	49801877 col.1	crachat	24/02/98	Giens
	14268	49800544 col.1	crachat	08/01/98	Giens
	15149	49807676 col.1	crachat	22/09/98	Giens
	14354	49800814 col.2	crachat	19/01/98	Giens
	14462	49802292 col.1	crachat	04/03/98	Tours
	14467	49802293	crachat	03/03/98	Tours
<i>S. aurantiacum</i>	15458	49808390 col.1	crachat	26/10/98	Angers
	NR	40704806 col.a	crachat	06/06/07	Angers
<i>A. fumigatus</i>	22075	1.97.04131 col.1	crachat	21/05/97	Angers
<i>A. terreus</i>	NR	4.02.06202 col.1	crachat	2002	Angers
<i>A. flavus</i>	NR	4.06.07735 col.1	crachat	2006	Angers
<i>E. dermatitidis</i>	NR	4.04.09550 col.1	crachat	2004	Angers
isolats cliniques de <i>S. apiospermum</i> hors du contexte de la mucoviscidose					
Microorganismes	Référence IHEM	Référence LMA	Source	Date	Lieu
<i>S. apiospermum</i>	15155*	4595.90	broncho-aspiration	19/09/90	Angers
	3817	NR	Liquide céphalo-rachidien	1986	Rotterdam (Pays-bas)
	6908	NR	Lésions cutanées	1992	Huy (Belgique)
	NR	40706082	Lésions cutanées	17/07/07	Nice
	NR	40108529 col.1	Sinusite	07/09/01	Angers
	15550	49809066	Sinusite	26/10/98	Poitiers
	15544	49807582 col.1	mycétome sous-cutané	19/05/98	Tours
	13952	49705080	Mycétome	20/06/97	Angers
	13945	49301383	Mycétome	03/12/93	Angers
	7656	NR	Mycétome	1989	Lyon
	7657	NR	Œil	1989	Lyon
Souches environnementales de <i>S. apiospermum</i>					
Microorganismes	Référence IHEM	Référence LMA	Source	Date	Lieu
<i>S. apiospermum</i>	13947	49400055	plumes d'étourneau	27/12/93	Locarn
	20812	70400315	terre de pot de fleur chez patient atteint de mucoviscidose	17/06/05	Angers
	20828	70400322 col.1	terre de pot de fleur chez patient atteint de mucoviscidose	16/06/04	Angers
	20950	70400391 col.1	terre de pot de fleur	16/06/04	St Christophe du Luat
	20934	270400388 col.2	terre de pot de fleur	16/06/04	St Christophe du Luat
	21021	70400403 col.1	terre de pot de fleur	15/06/04	L'Huisserie
	22358	70400397 col.1	terre de pot de fleur	17/06/05	Beaucouzé
	NR	70100108	terre prélevée directement dans le sol	01/03/01	Giens
<i>P. boydii</i>	13938	49400096	plumes d'étourneau	27/12/93	Locarn
	13948	49101383	boue de station d'épuration	14/01/91	Pornic

* : souche de référence du laboratoire ; NR : non référencé

Les souches ou isolats cliniques sont issus de deux collections : l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie, section Mycologie de Bruxelles (IHEM) et le Laboratoire de Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers (LMA). Certaines souches ne sont pas référencées dans les collections officielles (NR).

II.1.2. Entretien des souches

Les souches sont conservées à long terme sous forme lyophilisée en ampoules. Pour les mettre en culture, les lyophilisats sont réhydratés avec 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue est ensemencée en étoile sur un milieu gélosé Yeast Peptone-Dextrose-Agar (YPDA), additionné de 0,05% de chloramphénicol. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées pendant 3 jours à l'étuve à 37°C. Puis, un réisolement sur milieu YPDA est effectué afin de s'assurer de la pureté de la souche. Lors de nos expériences, les souches seront entretenues par repiquage régulier sur milieu YPDA.

II.1.3. Préparation de l'inoculum

Après une incubation à 37°C de 3 à 10 jours selon le champignon, le mycélium est récupéré par raclage des cultures sur milieu gélosé par 2 fois 10 ml d'eau ultra-pure stérile. Deux lavages en eau distillée stérile sont effectués par centrifugation (1500 g, 5 min). Le culot mycélien est ensuite utilisé pour ensemencer le milieu de culture.

II.2. Mise en évidence de la sécrétion de sidérophores sur milieu gélosé CAS

La production de sidérophores a été mise en évidence par le test au chrome azurol S en milieu gélosé [154]. Les milieux de culture gélosés ont été préparés selon : 1/10 d'une solution d'indicateur CAS (Sigma Chemical) et de 9/10 de milieu Yeast Morphology Agar (YMA, Difco Laboratories). L'inoculation a été effectuée par piquûre centrale des géloses en boîte de Pétri. Après une incubation de 14 jours à 37°C, apparaît un halo rouge-orangé autour de la colonie fongique attestant de la sécrétion de sidérophores. La mesure des diamètres du halo et de la colonie fongique permet d'établir un rapport pour chaque souche reflétant la quantité de sidérophores sécrétée.

La comparaison des résultats a été effectuée par le test de Student, selon la formule suivante $t_c = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{n_1 \times s_1^2 + n_2 \times s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$ (m : moyenne, n : nombre de mesures, s : écart type). Les

résultats sont comparés à la valeur critique correspondant au nombre de degré de liberté (Annexe 4).

II.3. Étude des paramètres de production des sidérophores

II.3.1. Culture en milieu liquide basal

Afin de stimuler la production de sidérophores par le champignon, le milieu de culture basal liquide (MBL) est constitué d'un milieu commercial déplété en fer et cuivre (YNB, Yeast Nitrogen Base, QBiogene) reconstitué à 2,6% en eau ultra-pure stérile et additionné de 0,075% d'un mélange d'acides aminés (CSM, complete supplement mixture, QBiogene) (Annexe 1) [204]. L'ensemble est autoclavé pendant 15 min à 121°C.

Pour la production des sidérophores, 0,5 ml d'une suspension fongique est ajouté à 50 ml de MBL contenus dans des fioles stériles de 200 ml. Les milieux sont mis à incuber selon des durées variables à 37°C. Après incubation, les milieux de culture sont centrifugés à 50 000 G pendant 30 min à 4°C. Les surnageants sont filtrés sur membranes Millipore® de porosité 0,45 µm puis lyophilisés et enfin repris par 1 ml d'eau ultra-pure stérile afin d'effectuer les réactions de détection des sidérophores. En parallèle, les culots de mycélium sont lavés par centrifugations (1 500 g, 5 min) en eau ultra-pure stérile puis lyophilisés pour la détermination du poids sec en champignon.

II.3.2. Cinétique de production

Une cinétique de production des sidérophores a été réalisée en incubant les milieux à 37°C pendant 10 jours au maximum. A différents temps d'incubation, c'est-à-dire 2, 3, 5, 6 et 10 jours, les filtrats de culture en triple ont été récupérés afin de quantifier la production en sidérophore. Parallèlement, les expériences ont été menées en ajustant le pH du MBL à 4, 7 et 8.

II.3.3. Influence de l'agitation

Cette étude a été effectuée après avoir fixé le pH et le temps d'incubation pour une production optimale de sidérophores. L'agitation a été effectuée à l'aide d'un agitateur magnétique.

II.3.4. Influence de la concentration en fer dans le milieu de culture

Temps d'incubation, pH et agitation ayant été fixés, l'influence du fer dans le milieu de culture sur la production de sidérophores a été étudiée en ajoutant des concentrations variables : 0, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{mol/L}$ en chlorure ferrique.

II.4. Détection des types de sidérophores présents dans le milieu de culture

Les réactions de caractérisation ont été effectuées sur des surnageants de culture concentrés. Pour une détection des sidérophores de type phénol/catéchol, le test d'Arnow [205] et la détection à 318 nm [161] ont été effectués. La détection des sidérophores de type hydroxamate a été effectuée par le test d'Atkin [162, 163] et l'oxydation par de l'acide periodique [160]. Le catéchol, l'acide 2,3 dihydroxybenzoïque et l'acide acétohydroxamique, l'acide benzohydroxamique ainsi que la déféroxamine B mésylate (DFB) ont été fournis par Sigma et utilisés comme témoins des réactions spécifiques des sidérophores de type phénol/catéchol et de type hydroxamate. De plus, pour quantifier la production de sidérophores de type hydroxamate, des courbes étalons ont été établies à partir de dilutions en cascade au demi pour des concentrations allant de 1 mM à 8 μM pour la DFB. Pour cette raison, les concentrations en sidérophores sont indiquées en μmol de DFB-équivalent. Pour tenir compte de la croissance fongique, les résultats sont exprimés en activité spécifique, c'est-à-dire :

$$\text{Activité Spécifique} = \frac{\mu\text{mol DFB-équivalent}}{\text{mg de mycélium}}$$

II.4.1. Test d'Arnow

A 1 ml de surnageant de culture concentré sont ajoutés 1 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N et 1 ml d'une solution de nitrite de molybdate (mélange de nitrate de sodium à 10% et molybdate de sodium à 10% en eau ultra-pure). La présence de catéchols est mise en évidence par une coloration jaune qui vire au rouge après l'ajout d'1 ml d'une solution de soude 1 N.

II.4.2. Absorbance à 318 nm

Une mesure directe d'absorbance du surnageant de culture est effectuée à 318 nm. Celle-ci est alors reportée sur une gamme étalon en acide 2,3-dihydroxybenzoïque.

II.4.3. Test d'Atkin

A 0,1 ml de surnageant de culture est ajouté 0,9 ml d'une solution de perchlorate de fer III (perchlorate ferrique à 5 mM en acide perchlorique 0,1 N). Les absorbances à 490 nm sont alors reportées sur une gamme étalon obtenue avec la DFB.

II.4.4. Oxydation periodique

A 0,2 ml de surnageant de culture sont ajoutés 1,3 ml d'une solution d'acide periodique à 2,19 mM et 1,3 ml d'eau ultra-pure. Ensuite une goutte de glycérol est ajoutée et l'ensemble est homogénéisé par agitation. Les absorbances à 264 nm sont alors reportées sur une gamme étalon obtenue avec la DFB.

II.5. Analyse des sidérophores de *S. apiospermum*

Afin d'entreprendre l'analyse des sidérophores de *S. apiospermum*, le milieu de culture MLB optimal a été réparti à raison de 100 ml par fiole de 200 ml puisensemencé par 1 ml d'inoculum. Après 3 jours d'incubation sans agitation à 37°C, le surnageant de culture est récupéré par filtration sur papier filtre Whatman puis sur membrane de porosité 0,45µm.

II.5.1. Extraction liquide/liquide

A 100 ml de filtrat de culture sont ajoutés 0,1 g de chlorure ferrique ainsi que 66 g de sulfate d'ammonium. L'ensemble est mis sous agitation pendant une nuit à 4°C afin de précipiter les protéines. La suspension obtenue est filtrée sous vide sur Celite® (Figure 28).

Après une extraction par 4 × 50 ml d'alcool benzylique, la phase organique est séchée par addition de sulfate de magnésium. Un dernier lavage par 50 ml d'alcool benzylique est effectué après filtration sur coton hydrophile. Puis, 1250 ml de diéthyle éther (5 volumes) sont ajoutés et les sidérophores sont extraits par 4 fois 100 ml d'eau ultra-pure. La phase aqueuse est lavée par 50 ml de diéthyle éther et l'extrait obtenu est soumis à une évaporation sous vide.

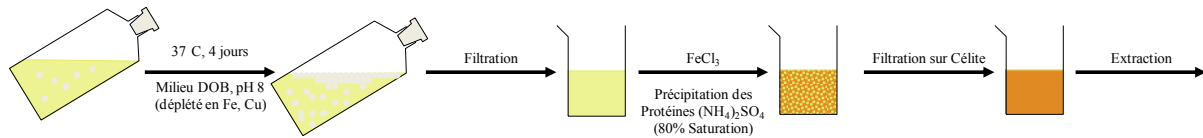


Figure 28 : Etapes de préparation de l'extrait avant l'extraction des sidérophores de *S. apiospermum*

II.5.2. Extraction par la résine Amberlite XAD-4

II.5.2.1. Etude des paramètres de l'extraction : plan d'expérience

L'étude des différents facteurs a été effectuée *via* un plan d'expérience [206-208] construit grâce au logiciel NemrodW [209]. Différents paramètres ont été retenus (Tableau 4) :

- le type de sidérophore, sa structure pouvant influencer sur l'efficacité de leur extraction,
- l'agitation lors de l'adsorption sur la résine Amberlite XAD-4,
- le temps de contact du filtrat de culture avec la résine,
- la composition du milieu de culture,
- l'addition de chlorure ferrique au milieu de culture avant l'extraction,
- la précipitation des protéines avant l'extraction,
- le pH du milieu de culture.

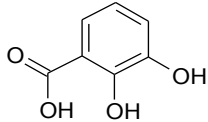
De plus, lors du contact milieu de culture/résine XAD-4, l'interaction entre le temps de contact et l'agitation est analysée. Deux sidérophores témoins ont été choisis : de type hydroxamate, la déféroxamine B et de type phénol/catéchol, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (2,3DHB).

Le plan d'expérience a été effectué *via* une matrice $2^5 \times 3^2$, donnant 288 combinaisons d'expériences éventuelles. Le modèle de résolution utilise cette équation de définition du plan d'expérience (Y représente la réponse de la manipulation effectuée et b le facteur multiplicatif appliqué au facteur X correspondant s'il influait seul) :

$$Y = b_0 + b_{1A} \times X_{1A} + b_{2A} \times X_{2A} + b_{3A} \times X_{3A} + b_{4A} \times X_{4A} + b_{5A} \times X_{5A} + b_{6A} \times X_{6A} + b_{6B} \times X_{6B} + b_{7A} \times X_{7A} + b_{7B} \times X_{7B} + b_{2A3A} \times X_{2A} \times X_{3A}$$

Parmi les combinaisons d'expériences déterminées par le logiciel, un ensemble de 16 expériences ont été choisies puis réalisées (Tableau 5, Tableau 6).

Tableau 4 : Domaine expérimental étudié pour l'extraction par la résine Amberlite XAD-4

N° du facteur	Facteur	Nombre de niveaux	Niveaux
X1	type de sidérophore	2	(1) hydroxamate (déféroxamine B)
			(2) catéchol 
X2	temps de contact avec la résine	2	(1) 1h
			(2) 17h
X3	agitation	2	(1) Non
			(2) Oui
X4	quantité de FeCl ₃	2	(1) 0 g
			(2) 0,1 g
X5	milieu de culture	2	(1) YPD
			(2) Czapek sans fer
X6	précipitation des protéines	3	(1) Non
			(2) 1h
			(3) 17h
X7	pH du milieu de culture	3	(1) 4
			(2) 7
			(3) 8

Les numéros entre parenthèses correspondent aux valeurs des paramètres

Tableau 5: Matrice d'expériences

N° Exp. NemrodW	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
7	1	2	2	1	1	1	1
12	2	2	1	2	1	1	1
21	1	1	2	1	2	1	1
27	1	2	1	2	2	1	1
41	1	1	1	2	1	2	1
54	2	1	2	1	2	2	1
72	2	2	2	1	1	3	1
90	2	1	1	2	2	3	1
113	1	1	1	1	2	1	2
128	2	2	2	2	2	1	2
132	2	2	1	1	1	2	2
173	1	1	2	2	1	3	2
194	2	1	1	1	1	1	3
206	2	1	2	2	1	1	3
255	1	2	2	2	2	2	3
275	1	2	1	1	2	3	3

Tableau 6 : Plan d'expérimentation pour l'étude de l'extraction des sidérophores par la résine XAD-4

N° exp.	Type de sidérophore ¹	Temps de contact avec la résine (h)	Agitation	FeCl ₃ (g/ml)	Milieu	Précipitation des protéines	pH
7	DFB	17	Oui	0	YPD	Non	4
12	2,3DHB	17	Non	0.1	YPD	Non	4
21	DFB	1	Oui	0	Czapek	Non	4
27	DFB	17	Non	0.1	Czapek	Non	4
41	DFB	1	Non	0.1	YPD	oui 1h	4
54	2,3DHB	1	Oui	0	Czapek	oui 1h	4
72	2,3DHB	17	Oui	0	YPD	Oui 17h	4
90*	2,3DHB	1	Non	0.1	Czapek	Oui 17h	4
113*	DFB	1	Non	0	Czapek	Non	7
128*	2,3DHB	17	Oui	0.1	Czapek	Non	7
132	2,3DHB	17	Non	0	YPD	oui 1h	7
173	DFB	1	Oui	0.1	YPD	Oui 17h	7
194	2,3DHB	1	Non	0	YPD	Non	8
206	2,3DHB	1	Oui	0.1	YPD	Non	8
255	DFB	17	Oui	0.1	Czapek	oui 1h	8
275	DFB	17	Non	0	Czapek	Oui 17h	8

* expérimentation effectuée en duplicate

Pour chacune des expériences, les sidérophores sont apportés en solution à des concentrations de 750 µmol/L pour le 2,3DHB et de 250 µmol/L pour la DFB.

A 100 ml de milieu de culture (YPD ou de Czapek), 1 ml de DFB ou 5 ml de 2,3DHB sont ajoutés. Le volume est ajusté à 120 ml par de l'eau ultra-pure. Ensuite, est ajouté ou pas au milieu de culture 0,1 g de chlorure ferrique. Puis, 5 ml d'eau ultra-pure sont ajoutés en rinçant le sabot de pesée. La précipitation des protéines du milieu de culture, est réalisée par addition de sulfate d'ammonium à 80% de saturation. Après 1 h ou 17 h d'incubation à 4°C, la suspension est filtrée pour éliminer les protéines précipitées puis lavée par 20 ml d'eau ultra-pure. Dans le cas où la précipitation des protéines n'est pas effectuée, seulement 20 ml d'eau ultra-pure sont ajoutés. Ensuite 10 g de résine Amberlite XAD-4 sont mis en contact avec le milieu de culture pendant 1 h ou 17 h avec ou sans agitation. La résine est récupérée par filtration sur verre fritté, puis lavée par 4 × 20 ml d'eau ultra-pure. Enfin, les sidérophores sont recueillis par 4 lavages de 20 ml de méthanol. Après évaporation sous vide du méthanol, la masse brute de l'extrait est déterminée. Repris par 1 ml d'eau distillée dans le cas de la DFB et 5 ml d'eau distillée dans le cas du 2,3-DHB, les extraits sont ensuite analysés par CLHP (voir II.5.3).

Afin de valider les résultats obtenus sur des sidérophores commerciaux, ce protocole a été appliqué aux sidérophores de *S. apiospermum*. Les paramètres utilisés ont été fixés d'après les résultats du plan d'expérience, seule la présence de fer dans le filtrat de culture a été testée.

II.5.2.2. Procédure optimisée

Les résultats du plan d'expérience ont permis de définir cette procédure optimisée d'extraction.

A 100 ml de surnageant de culture sont ajoutés 66 g de sulfate d'ammonium, puis l'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure à 4°C. La suspension obtenue est filtrée sur büchner à travers un papier filtre. Puis 10 g de résine Amberlite XAD-4 (Aldrich) sont ajoutés et la suspension est mise sous agitation pendant 17h. La résine est ensuite récupérée par filtration sur verre fritté, puis lavée 4 × 50 ml d'eau ultra-pure. Enfin, les sidérophores sont récupérés par 4 lavages avec 20 ml de méthanol. L'extrait ainsi obtenu est ensuite soumis à une évaporation sous vide.

Dans le cadre de l'extraction spécifique des sidérophores de *S. apiospermum*, 0,1 mg de fer est ajouté à 100 ml du surnageant de culture avant l'extraction.

II.5.3. Identification des sidérophores par RP-CLHP-MS

L'extrait est dissous dans de l'eau ultra-pure à une concentration d'1 g/L. Vingt µl sont injectés pour l'analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP) effectuée sur une pompe binaire. Le support chromatographique utilisé est une phase inverse Polymerex RP-1 (40×4.00 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex). Sous un débit de 1 ml.min⁻¹, l'élution est réalisée selon un gradient composé d'une solution d'acide formique à 0,1% (phase A) et de méthanol acidifié à 0,1% par de l'acide formique (phase B). Le gradient linéaire débute par un mélange de 95% de phase A et 5% de phase B pour finir après 20 min par 100% de phase B maintenue pendant 10 min. La détection s'effectue en continu par spectrophotométrie UV-visible à 254 nm et à 435 nm.

Dans le cas d'une chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse (ionisation par électrospray, le débit dans le spectromètre est de 150 ml.min⁻¹), l'élution est réalisée selon un gradient linéaire débutant par un mélange de 95% de phase A et 5% de phase B pour finir après 20 min par 5% de phase A et 95% de phase B maintenue pendant 10 min.

La mesure des aires sous les pics permet de quantifier la production de sidérophores qui varie en fonction des souches. Sur un chromatogramme, l'aire sous les pics (a) est

proportionnelle à la masse de produit (m) selon un facteur k, donc $m_{\text{sidérophore}} = k_{\text{sidérophore}} \times a_{\text{sidérophore}}$. Ainsi la production de sidérophores peut être quantifiée de façon relative par l'équation suivante :

$$\frac{m_{\text{sidérophore}}}{k_{\text{sidérophore}}} = \frac{m_{\text{Extrait Brut}} \times a_{\text{sidérophore injecté}}}{C_{\text{massique en extrait}} \times V}$$

m : masse
k : coefficient
a : aire sous le pic
C : concentration massique
V : volume injecté

II.6. Etude de la captation du fer à partir de protéines d'hôte

II.6.1. Echange du fer entre sidérophores fongiques et protéines d'hôte

Dans un flacon stérile de 200 ml, 100 ml de MLB sont inoculés par 10 ml de suspension fongique potérisée (DO 0,6). Dans le milieu est immergé un boudin de dialyse contenant 10 ml de MLB additionné d'holo-transferrine à 25 μM , de lactoferrine à 25 μM ou de ferritine (Sigma). Après une incubation de 7 et 14 jours à 37°C, le milieu contenu dans le boudin de dialyse est récupéré pour dosage du fer et analyse électrophorétique.

II.6.2. Dosage du fer

Le dosage du fer total est effectué par la méthode à la ferrozine [210, 211] (voir Annexe 2). Après traitement en milieu acide citrique (pH inférieur à 2), le fer est séparé des protéines puis réduit en fer ferreux par ajout d'ascorbate de sodium. Enfin, le complexe formé par le fer et la ferrozine, de couleur bleue, permet un dosage spectrophotométrique à 570 nm.

II.6.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée (urée-PAGE)

Le dialysat est de nouveau dialysé contre 3 bains d'eau ultra-pure, puis lyophilisé et enfin soumis à une analyse électrophorétique [82].

Le gel inférieur pour électrophorèse est préparé comme suit : 4,5 g d'urée et 625 μl d'un tampon 20 fois concentré constitué de 2 M de trishydroxyméthylammonométhane, de 0,2 M d'acide borique et de 0,032 M d'EDTA à pH 8,4 (tampon TBE 20 fois concentré), sont ajoutés à 2,7 ml d'une solution d'acrylamide à 30%. Le volume final est ajusté à 12,5 ml avec de l'eau ultra-pure et la polymérisation du gel est assurée par 10 mg de persulfate d'ammonium et 20 μl de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Après

polymérisation, le gel supérieur est coulé comme suit : 1,3 ml de tampon TBE 20 fois concentré, 1,3 ml d'une solution d'acrylamide à 30%, 6,1 ml d'eau ultra-pure, 5 mg de persulfate d'ammonium et 10 µl de TEMED. Le tampon de migration électrophorétique est constitué de tampon TBE 1 fois concentré. Les protéines témoins (holo-transferrine, apo-transferrine, lactoferrine, ferritine) ainsi que les lyophilisats de milieu de culture, sont repris en tampon TBE 1 fois concentré additionné de saccharose et de bleu de bromophénol.

La migration électrophorétique est réalisée dans une cuve Mini-Protean II (Bio-Rad) pendant 5 h à 100 V. Les protéines sont révélées par une coloration de type Sipro Ruby (Biorad) [65]. Le gel est laissé une nuit en contact de la solution de révélation sous agitation et protégé de la lumière, puis il est lavé 1 h par de l'acide acétique aqueux 7% avant d'être analysé par fluorescence (longueur d'excitation 280 nm et d'émission 600 nm).

II.7. Analyse de crachats de patients atteints de mucoviscidose et présentant une colonisation fongique respiratoire

Les crachats utilisés dans cette étude sont des expectorations issues de malades atteints de mucoviscidose. Ils sont conservés à -20°C.

Sur l'ensemble de ces crachats a été effectuée une analyse mycologique par culture sur gélose semi-sélective [16, 17, 21, 212] montrant la présence de différents champignons filamenteux dans les expectorations (Tableau 7).

Les expectorations ont été suspendues dans 100 ml d'eau ultra-pure ajustée à pH 8. Les sidérophores ont été extraits suivant la procédure optimisée puis analysés par RP-CLHP-UV-visible-MS.

Tableau 7 : Analyse mycologique des crachats

crachat	masse (g)	espèces fongiques
4070 333	2,239	<i>S. apiospermum</i>
4070 2222	4,747	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>S. apiospermum</i>
4070 2290	3,125	<i>S. apiospermum</i>
4070 3455	7,630	<i>C. albicans</i>
4070 3865	13,78	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>
4070 4821	1,018	<i>C. albicans</i> , <i>S. apiospermum</i>
4070 5208	2,623	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>S. apiospermum</i>
4070 5437	7,417	<i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>
4070 5462	5,619	<i>C. albicans</i>

III. Résultats :

III.1. Détection sur milieu gélosé CAS

L'ensemble des souches fongiques, constitué de 25 souches de *S. apiospermum*, 2 souches de *S. aurantiacum* et 2 souches de *P. boydii*, d'origines très variées : isolats cliniques (patients atteints de mucoviscidose ou non) et souches environnementales, a montré une production en sidérophores attestée par l'apparition d'un halo rouge/orangé autour de chaque colonie fongique (Figure 29).

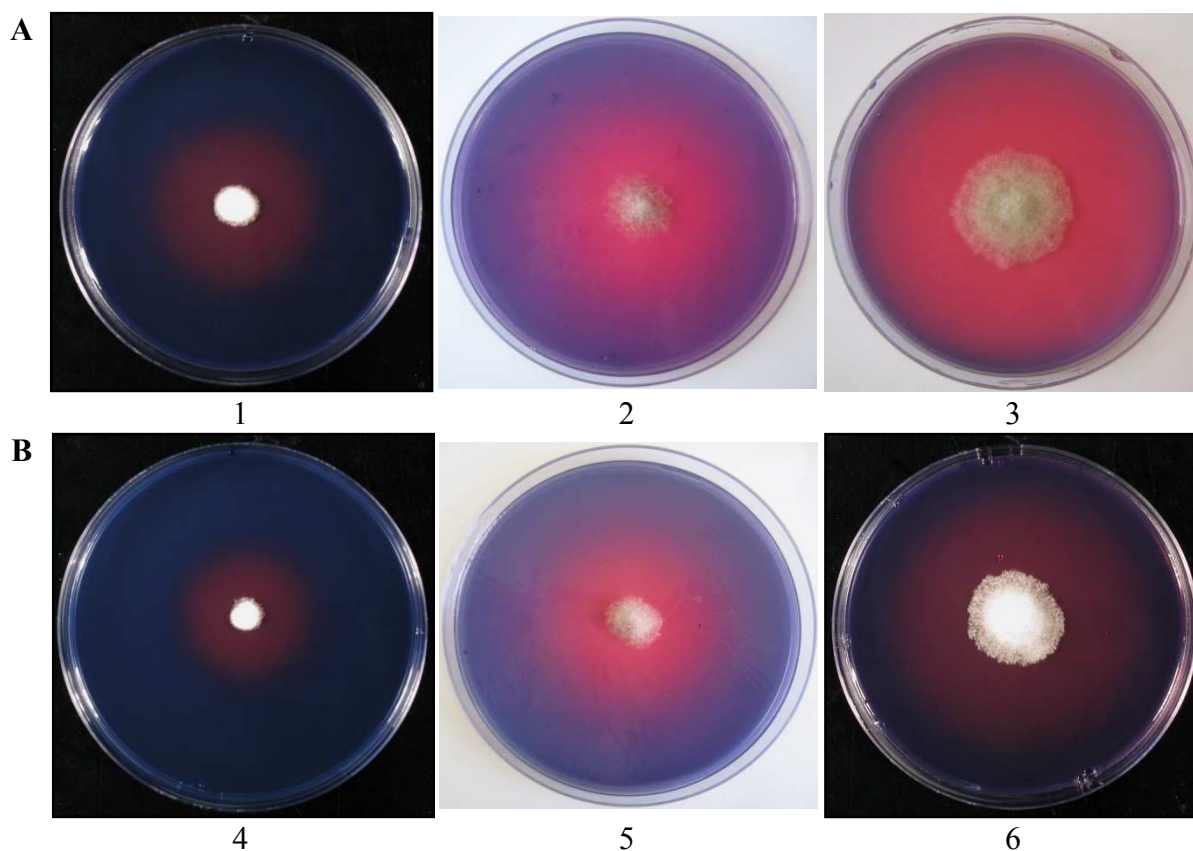


Figure 29 : Détection sur milieu gélosé CAS de la sécrétion de sidérophores par diverses souches fongiques : A, isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose : *S. apiospermum* IHEM 14451 (1) et IHEM 15149 (2) et *S. aurantiacum* LMA 40704806 col.a (3) ; B, isolats cliniques de *S. apiospermum* IHEM 15155 (4) et IHEM 13945 (5), et souche environnementale de *S. apiospermum* IHEM 20812 (6)

Pour chacune des souches, les diamètres des halos formés par les sidérophores ont été mesurés, ainsi que les diamètres des colonies afin d'établir les rapports CAS (Tableau 8 et Tableau 9). Les moyennes et écarts-types des rapports CAS sont données dans le

Tableau 10.

Tableau 8 : Détection de la production de sidérophores sur milieu gélosé CAS d'isolats cliniques fongiques

isolats cliniques		référence	origine	rapport CAS*
mucoviscidose	<i>S. apiospermum</i>	IHEM 14263	crachats	4,6 ± 0,6
		IHEM 15579	crachats	5,2 ± 1,1
		IHEM 14451	crachats	4,2 ± 0,0
		IHEM 14268	crachats	1,5 ± 0,2
		IHEM 15149	crachats	5,0 ± 0,5
		IHEM 14354	crachats	7,5 ± 2,1
		IHEM 14467	crachats	5,8 ± 2,3
	<i>S. aurantiacum</i>	IHEM 15458	crachats	5,5 ± 0,5
non-mucoviscidose	<i>S. apiospermum</i>	LMA 40704806 col.a	crachats	2,8 ± 0,0
		IHEM 15155	broncho-aspiration	5,3 ± 1,4
		IHEM 3817	liquide céphalo-rachidien	4,8 ± 0,6
		IHEM 6908	lésions cutanées	4,0 ± 0,4
		LMA 40706082	lésions cutanées	2,4 ± 0,4
		LMA 40108529 col.1	sinusite	8,9 ± 2,8
		IHEM 15550	sinusite	11,1 ± 2,8
		IHEM 15544	mycétome sous-cutané	8,3 ± 3,3
		IHEM 13952	mycétome	5,1 ± 1,0
		IHEM 13945	mycétome	4,0 ± 0,6
		IHEM 7656	mycétome	3,2 ± 0,1
		IHEM 7657	œil	8,5 ± 1,3

* : le rapport CAS correspond au rapport des diamètres du halo sidérophore et de la colonie fongique

Tableau 9 : Détection de la production de sidérophores sur milieu gélosé CAS de souches fongiques environnementales

	référence	origine	rapport CAS*
<i>S. apiospermum</i>	IHEM 13947	plumes d'étourneau	2,9 ± 0,1
	IHEM 20812	terre de plante en pot chez un patient atteint de mucoviscidose	2,6 ± 0,0
	IHEM 20828	terre de plante en pot chez un patient atteint de mucoviscidose	4,6 ± 0,5
	IHEM 20950	terre de plante en pot	4,3 ± 0,3
	IHEM 20934	terre de plante en pot	5,2 ± 0,3
	IHEM 21021	terre de plante en pot	4,1 ± 0,9
	IHEM 22358	terre de plante en pot	5,4 ± 0,4
	LMA 70100108	sol	8,2 ± 1,6
<i>P. boydii</i>	IHEM 13938	plumes d'étourneau	4,3 ± 0,0
	IHEM 13948	boue de station d'épuration	1,4 ± 0,2

* : le rapport CAS correspond au rapport des diamètres du halo sidérophore et de la colonie fongique

Tableau 10 : Comparaison des valeurs statistiques de la production de sidérophores sur milieu gélosé CAS

échantillon		nombre de valeurs de l'échantillon	moyenne	écart type
isolats cliniques	mucoviscidose	26	4,67	1,96
	non-mucoviscidose	30	6,14	3,12
	total	56	5,46	2,72
souches environnementales		29	4,41	1,79

L'utilisation du test de Student (Tableau 11, Annexe 4) pour la comparaison des différentes populations montre qu'il y a une différence significative à 5% ($t_c > 1,987$) de production de sidérophores entre les isolats cliniques hors contexte mucoviscidose et ceux provenant du contexte mucoviscidose, ou les souches d'origine environnementale. De plus la comparaison entre les isolats cliniques dans leur ensemble et les souches d'origine environnementales montre qu'il y a une différence significative à 10% ($t_c > 1,662$). Par contre il n'y a pas de différence significative entre les souches environnementales et les isolats cliniques du contexte mucoviscidose.

Tableau 11 : t_c calculé pour le test de Student sur l'évaluation de la production de sidérophores par le rapport CAS ($t_c > 1,662$: significatif à 10%, $t_c > 1,987$: significatif à 5%)

		isolats cliniques			souches environnementales
		mucoviscidose	hors mucoviscidose	total	
isolats cliniques	mucoviscidose	-	-2,03644	-	-0,50473
	hors mucoviscidose	2,03644	-	-	-2,55632
	total	-	-	-	-1,85656
souches environnementales		0,50473	2,55632	1,85656	-

III.2. Optimisation des conditions de production des sidérophores par *S. apiospermum*

Les cultures ont été effectuées à trois pH différents : 4, 7 et 8, et des mesures d'activités spécifiques des sidérophores ont été effectuées à 2, 3, 5, 6 et 10 jours. Les courbes obtenues

(Figure 30) reflètent la sécrétion de sidérophores par *S. apiospermum* en fonction du temps. Celle-ci débute après 2 jours d'incubation à 37°C, pour atteindre son maximum entre 3 et 5 jours suivant le pH du milieu de culture. A pH=4 et à pH=7, les maximums sont atteints respectivement à 5 et 3 jours pour des activités spécifiques relativement basses entre 0,5 et 1 $\mu\text{mol/mg}$. Par contre, l'activité est beaucoup plus élevée à pH=8 avec un maximum de 3,2 $\mu\text{mol/mg}$ atteint à 3 jours d'incubation à 37°C.

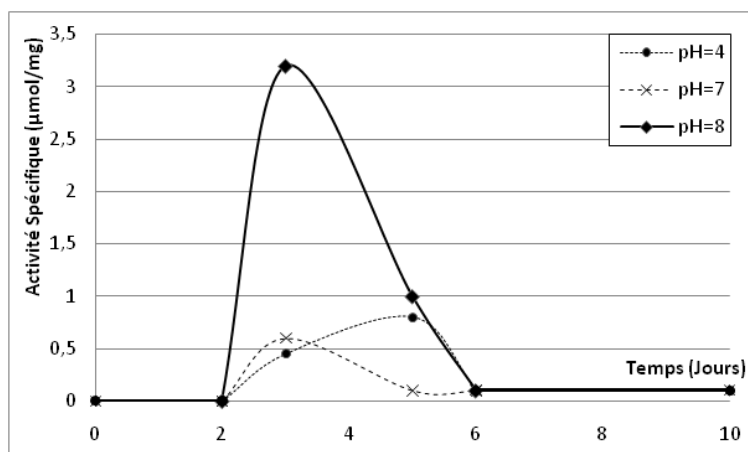


Figure 30 : Etude de la cinétique de production de sidérophores par *S. apiospermum* IHEM 15155 en fonction du pH

Une détermination d'activité spécifique a été réalisée à pH 8 avec ou sans agitation pendant 3 jours d'incubation à 37°C. Les résultats ont montré une différence significative entre les activités spécifiques obtenues avec agitation (0,133 $\mu\text{mol/mg}$), ou sans agitation (2,7 $\mu\text{mol/mg}$).

Ainsi, pour la suite des expériences, aucune agitation des milieux de culture n'a été effectuée.

III.3. Identification des sidérophores de *S. apiospermum*

III.3.1. Etude des types de sidérophores produits par *S. apiospermum*

Afin de déterminer les types de sidérophores produits par *S. apiospermum*, les filtrats de culture concentrés ont été soumis à différents tests spécifiques. Les témoins utilisés ont permis de s'assurer de la spécificité des réactions de caractérisation. Les absorbances obtenues pour *S. apiospermum* IHEM 15155 par le test d'Atkin [163] et l'oxydation périodique [160] ont permis de calculer les activités spécifiques en hydroxamates qui sont

respectivement de $0,43 \pm 0,18 \mu\text{mol/mg}$ et de $0,40 \pm 0,26 \mu\text{mol/mg}$. D'autre part, les tests d'Arnow [205] et de mesure à 318 nm [161] ont été négatifs, indiquant l'absence de sidérophores de type phénol/catéchol.

III.3.2. Identification des hydroxamates produits par *S. apiospermum*

Après une extraction liquide/liquide de type alcool benzylique/diéthyléther/eau (I.3.1, Figure 26-B), 0,14 g d'extract a été obtenu à partir de 1 L de milieu de culture. L'extract a été alors analysé par CLHP-UV-Visible-ESI-MS sur une colonne en phase inverse. Grâce à l'ajout de fer avant extraction, les complexes ferri-sidérophores de coloration rouge-orangé sont facilement repérables dans le visible à 435 nm. Le chromatogramme obtenu montre deux pics à des temps de rétention de 3,2 et 6 min (Figure 31-A). Les spectres de masse ont révélé deux masses $m/z = 537,9$ pour le pic I à $t_r = 3,2$ min (Figure 32-A) et $m/z = 793,9$ pour le pic II à $t_r = 6$ min (Figure 32-B). Les chromatogrammes obtenus par extraction de ces deux masses (Figure 31-B/C) corrélient avec le chromatogramme obtenu par une détection à 435 nm pour l'extract brut (Figure 31-A).

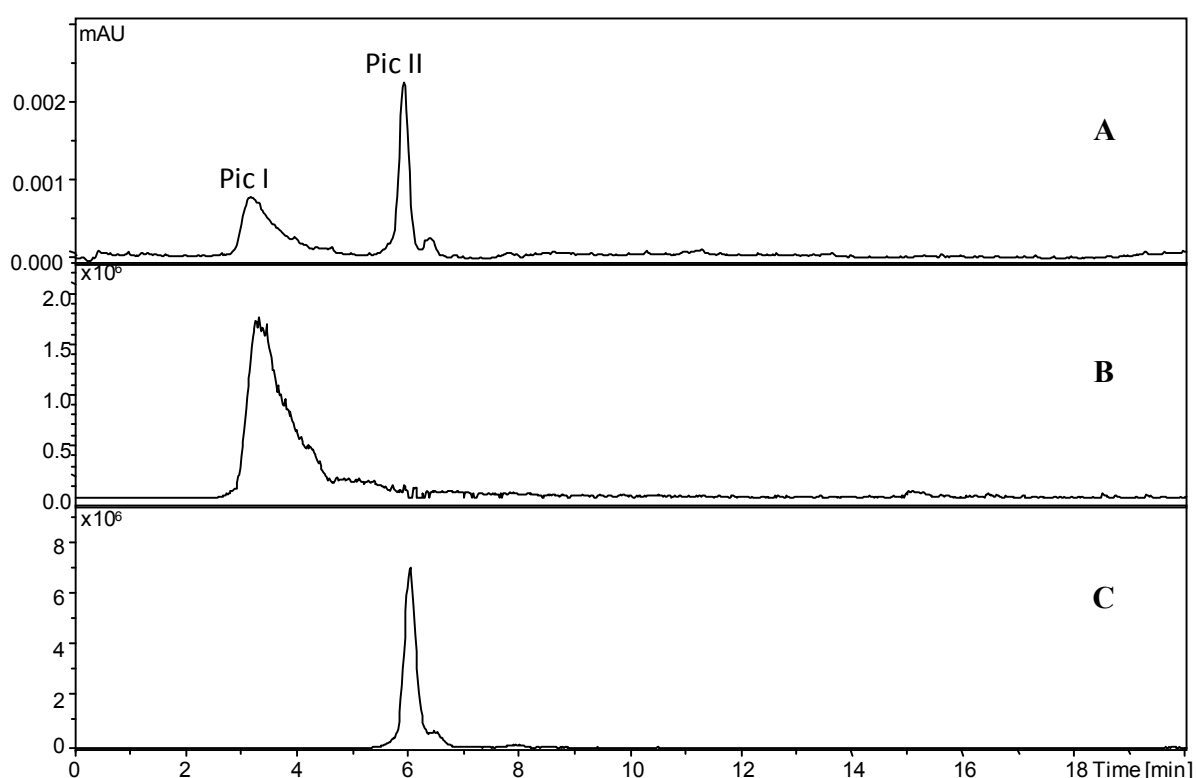


Figure 31 : Chromatogramme de l'extract brut à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic I (B, masse $m/z = 537,9$, à $t_r = 3,2$ min) et du pic II (C, masse $m/z = 793,9$, à $t_r = 6$ min)

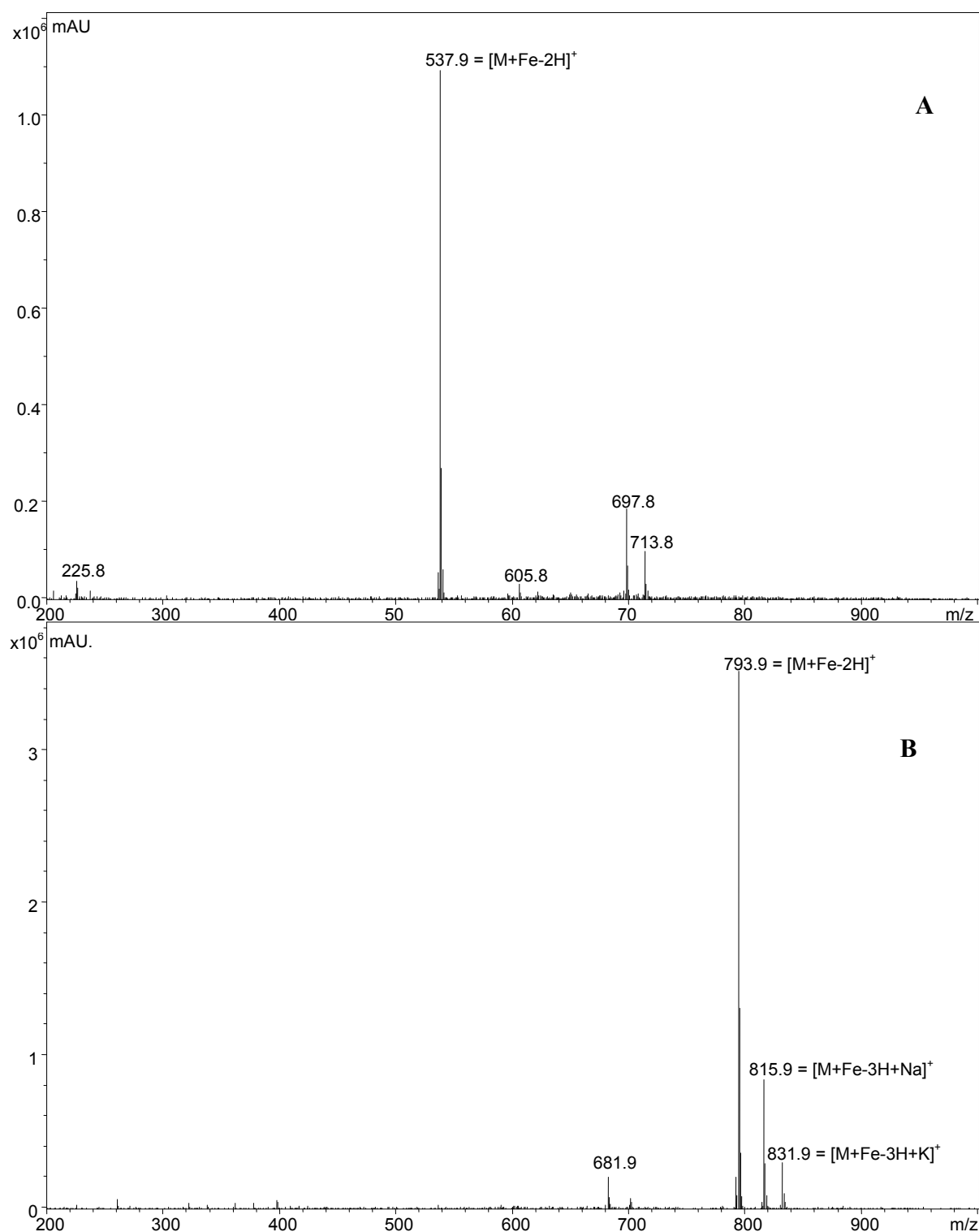


Figure 32 : Spectres de masse du pic I ($t_r = 3,1-4,2$ min) et du pic II ($t_r = 5,7-6,2$ min) obtenus par LC-ESI+MS

Une analyse de la fragmentation des produits correspondant aux deux masses a ensuite été effectuée (Figure 33). Ainsi l'ion moléculaire $m/z = 537,9$ du pic I se fragmente en trois ions moléculaires principaux $m/z = 519,9$, $507,8$ et $425,8$. Le pic II se fragmente en trois ions

moléculaires principaux $m/z = 776,0$, $648,9$ et $537,9$. La fragmentation supplémentaire de l'ion moléculaire $m/z = 648,9$ provoque la formation de deux fragments $m/z = 537,9$ et $519,9$.

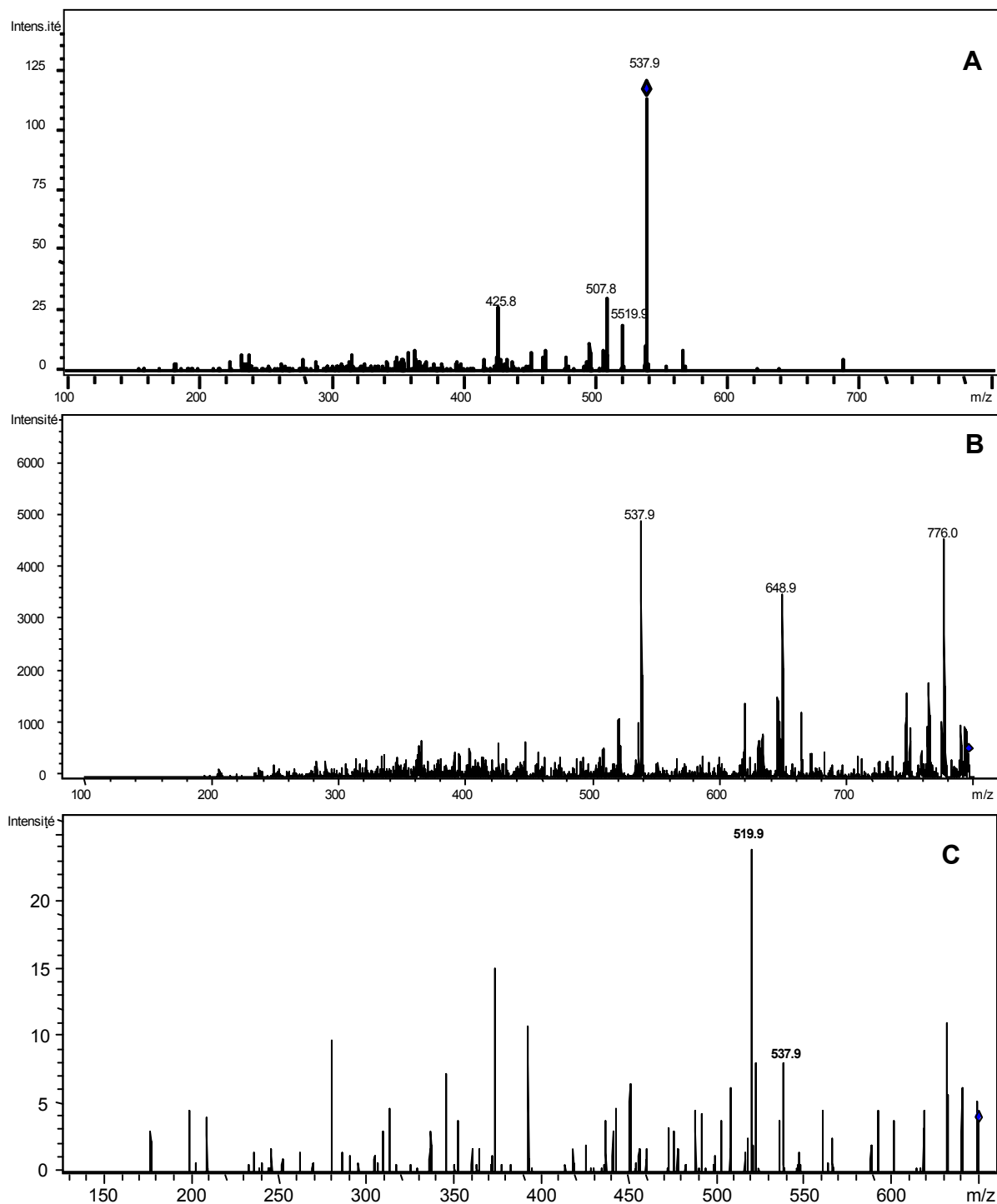


Figure 33 : Spectres de masse après fragmentation MSⁿ des produits de masse correspondant au pic I (A, MS² $m/z = 537,9$) et au pic II, (B, MS² $m/z = 793,9$; C, MS³ $m/z = 793,9$ suivi de $m/z = 648,9$)

III.4. Influence du fer dans le milieu sur la production de sidérophores

Afin de voir l'influence de la concentration en fer dans le milieu de culture sur la production de sidérophores par *S. apiospermum*, une étude comparative a été menée. Après 4 jours d'incubation à 37°C, les sidérophores ont été extraits du milieu de culture selon la méthode alcool benzylique/diéthyle éther/eau puis analysés par CLHP couplée à un détecteur UV-visible.

Les résultats montrent que tout apport de fer dans le milieu de culture à une concentration supérieure ou égale à 0,1 $\mu\text{mol/L}$ entraîne une absence de sécrétion de sidérophores.

III.5. Interaction des sidérophores avec les protéines d'hôte

Afin de mesurer la capacité de *S. apiospermum* à récupérer le fer contenu dans certaines protéines d'hôte telles que la ferritine, l'holo-transferrine ou la lactoferrine, le champignon a été incubé en MLB en présence d'un boudin de dialyse contenant la protéine comme unique source de fer pour le champignon [65, 82]. Des aliquotes du contenu du boudin de dialyse ont été prélevées à J0, J7 et J14 d'incubation afin de réaliser le dosage du fer ainsi qu'une analyse électrophorétique urée-PAGE.

III.5.1. Dosage du fer

Les concentrations en fer ont été mesurées par la méthode à la ferrozine [210, 211]. La Figure 34 montre une diminution du fer au cours du temps pour l'holo-transferrine tandis que dans le boudin de dialyse contenant la lactoferrine, le fer augmente jusqu'à 14 jours. Pour la ferritine, la concentration diminue pendant les 7 premiers jours pour augmenter ensuite jusqu'à 14 jours.

III.5.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée

Des résultats ont été obtenus avec les analyses électrophorétiques des contenus des boudins de dialyses.

Lorsque *S. apiospermum* est incubé en présence d'holo-transferrine (transferrine mono- et bi-ferrique), celle-ci perd du fer pour donner exclusivement de la transferrine mono-ferrique comme indiqué dans la piste 3 de la Figure 35.

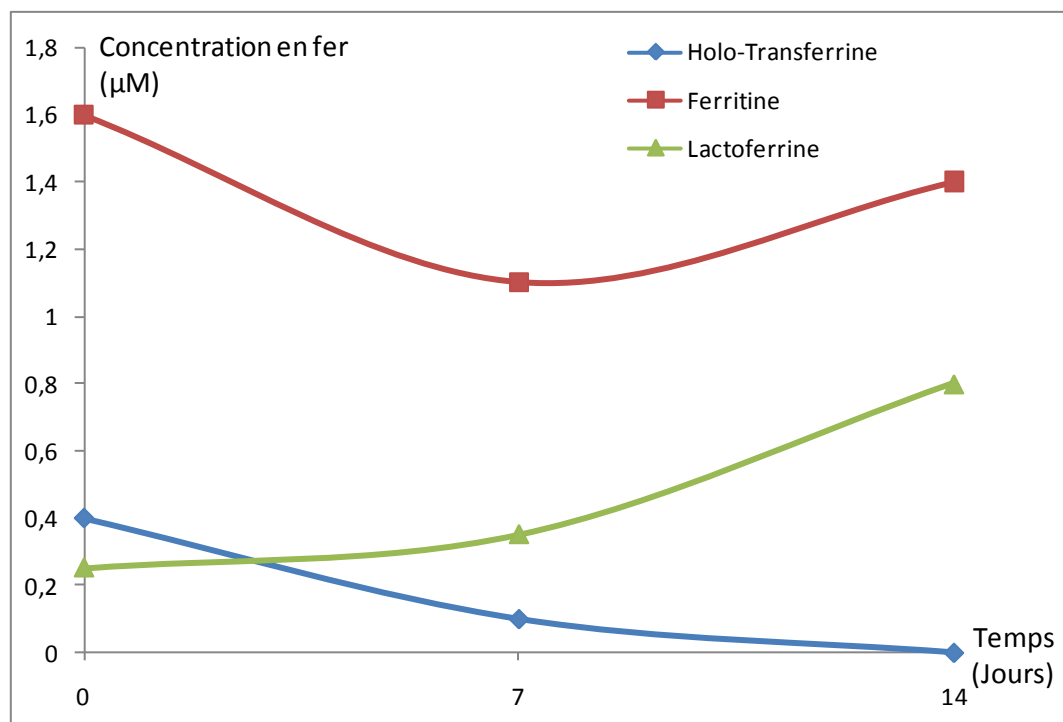


Figure 34 : Concentration en fer dans le boudin de dialyse contenant une protéine d'hôte en présence de *S. apiospermum* IHEM 15155

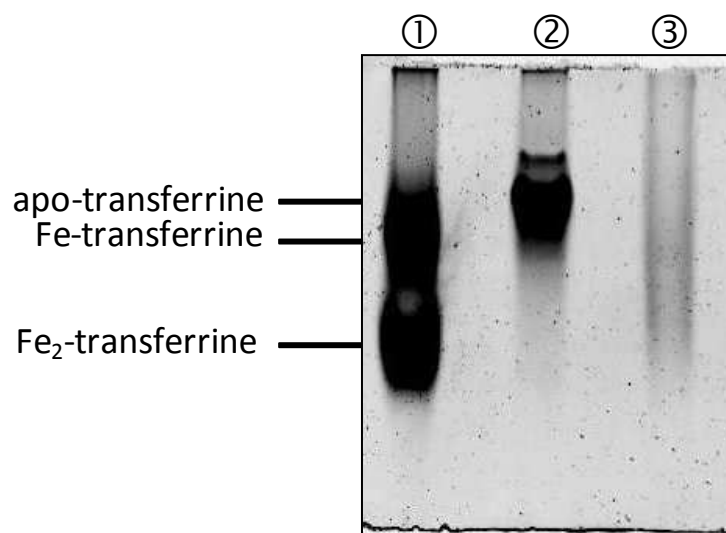


Figure 35 : Electrophorèse urée-PAGE après 7 jours d'incubation de *S. apiospermum* en présence d'holo-transferrine. Témoins holo-transferrine mono- et bi-ferrique (piste 1), apo-transferrine (piste 2) et dialysat (piste 3)

De même avec la ferritine, après 7 jours d'incubation en présence de *S. apiospermum*, celle-ci subit une perte en atomes de fer attestée par un déplacement vers le haut du gel urée-PAGE par comparaison avec la ferritine témoin (Figure 36).

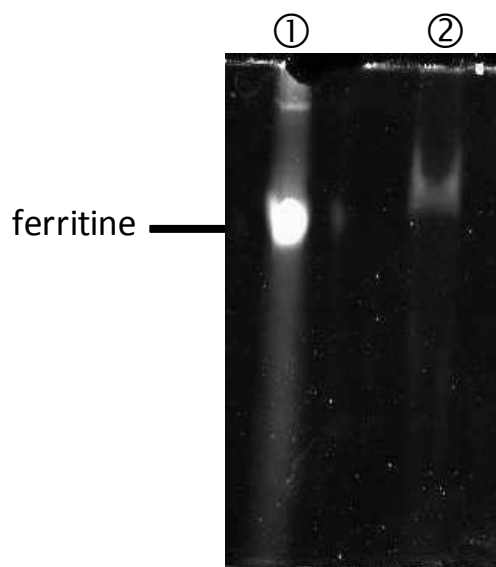


Figure 36 : Electrophorèse urée-PAGE après 7 jours d'incubation de *S. apiospermum* en présence de ferritine. Témoins ferritine (piste 1) et dialysat (piste 2)

III.6. Profil de sécrétion des sidérophores

La caractérisation des sidérophores de *S. apiospermum* a été étendue à diverses souches fongiques. Le choix s'est porté sur 7 isolats cliniques dont 4 provenant de patients atteints de mucoviscidose et 3 de souches environnementales, soit un total de 10 souches.

Après extraction liquide/liquide (alcool benzylique/diéthyle éther/eau) à partir des filtrats de culture de chaque souche, obtenus à pH 7 (proche de celui des expectorations pulmonaires [213]), les sidérophores ont été analysés par CLHP couplé à un détecteur UV-visible. Les chromatogrammes obtenus pour ces dix souches (Figure 37) ont montré que le sidérophore de $m/z = 794$ est présent chez toutes les souches. Par contre celui de $m/z = 538$ n'est retrouvé que chez 2 souches, clinique IHEM 14263 et environnementale IHEM 20812.

La production en sidérophores des différentes souches, proportionnelle à $\frac{m_{\text{sidérophore}}}{k_{\text{sidérophore}}}$, est indiquée dans le Tableau 12. Seules les deux souches (IHEM 14263 et 20818) produisent le sidérophore $m/z = 538$. L'ensemble des isolats cliniques possèdent une production de celui ayant un temps de rétention $t_r = 6,0 \text{ min}$ ($\frac{m_{\text{sidérophore}}}{k_{\text{sidérophore}}}$) supérieure à 4800 mAU.min, à l'exception de celle d'un isolat d'infection cutanée localisée. Au contraire, la production du

sidérophore de $m/z = 794$ pour l'ensemble des souches d'origine environnementale est inférieure aux précédentes ($\frac{m_{\text{sidérophore}}}{k_{\text{sidérophore}}} < 3600 \text{ mAU.min}$).

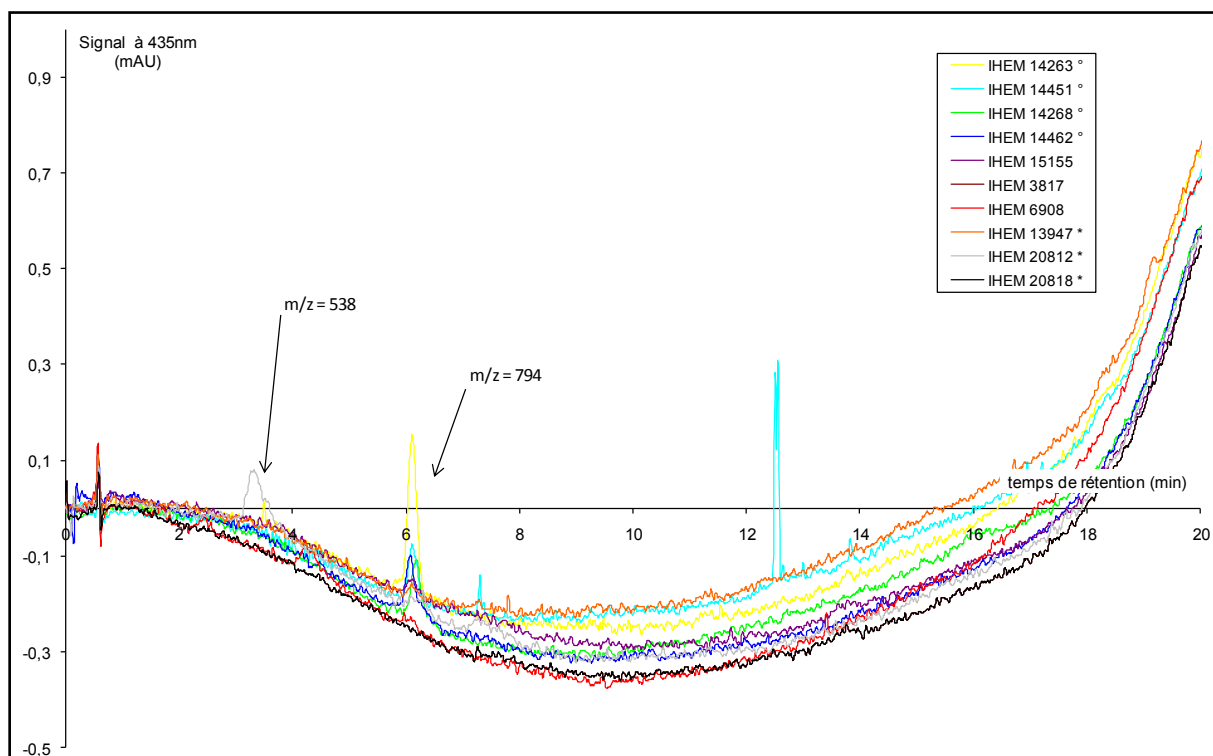


Figure 37 : Chromatogrammes des extraits de filtrats de culture de 10 souches de *S. apiospermum*, ° isolats cliniques (mucoviscidose), * souches d'origine environnementale

Tableau 12 : Production de sidérophores chez divers souches de *S. apiospermum*

<i>S. apiospermum</i> IHEM	Origine	Production en sidérophore $\frac{m_{\text{sidérophore}}}{k_{\text{sidérophore}}} \text{ (mAU.min)}$	
		$m/z = 538$	$m/z = 794$
14263	crachat mucoviscidose	5472	25170
14268	crachat mucoviscidose	ND	19374
14451	crachat mucoviscidose	ND	7861
14462	crachat mucoviscidose	ND	6410
3817	liquide céphalo-rachidien	ND	5235
15155	broncho-aspiration	ND	4848
20818	terre de plante en pot chez un patient atteint de mucoviscidose	15767	3599
13947	plumes d'étourneau	ND	2059
20812	terre de plante en pot chez un patient atteint de mucoviscidose	ND	1971
6908	lésions cutanées	ND	ND

III.7. Optimisation de l'extraction des sidérophores sur résine Amberlite XAD-4

Pour accéder à l'étude des sidérophores produits par un nombre très important de souches fongiques, la mise au point d'un protocole d'extraction plus rapide et plus pratique s'est avérée nécessaire.

III.7.1. Comparaison de la méthode d'extraction liquide/liquide par rapport à celle sur Amberlite XAD-4

La méthode d'extraction sur Amberlite XAD-4 a été comparée à celle utilisée précédemment. Seule l'étape d'extraction liquide/liquide a été remplacée par une extraction sur Amberlite XAD-4 [182, 197, 198]. Les extraits ont ensuite été analysés par CLHP (Figure 38).

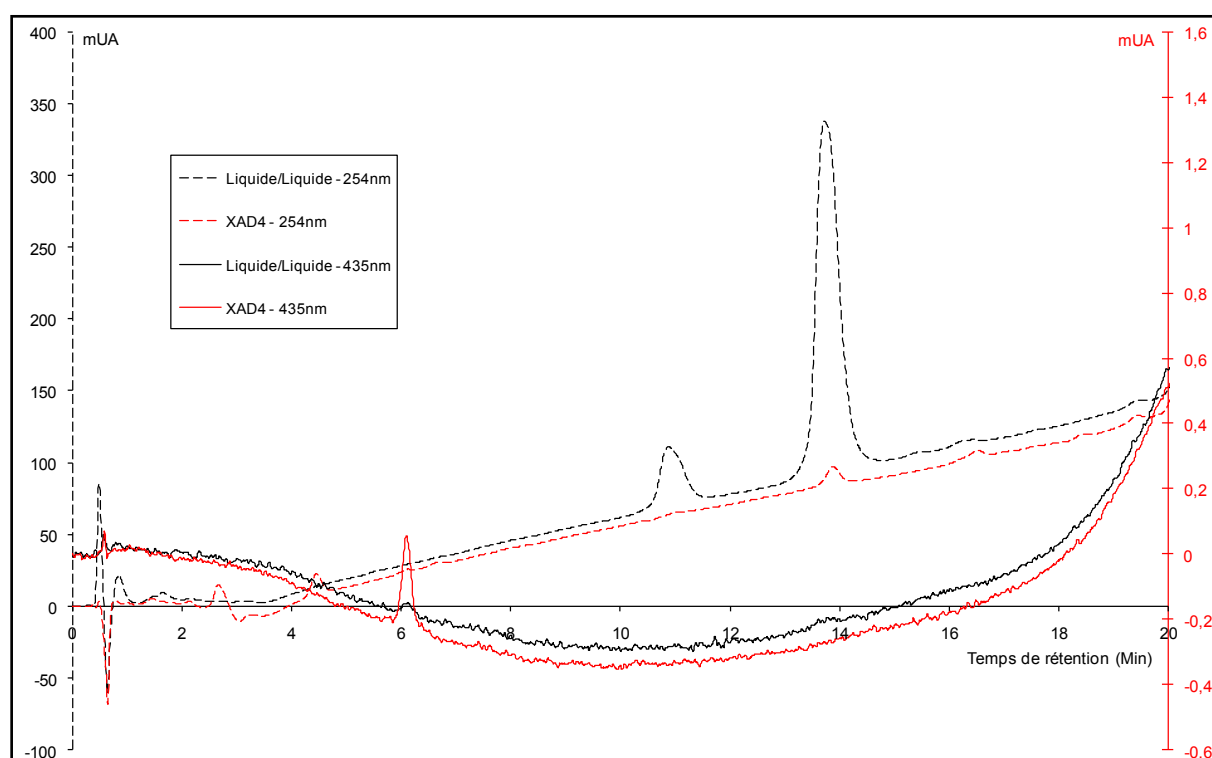


Figure 38 : Chromatogrammes des filtrats de culture de *S. apiospermum* obtenus par deux méthodes d'extraction : liquide/liquide et XAD4

Les chromatogrammes obtenus montrent que moins d'impuretés sont présentes dans l'extrait obtenu après extraction par la résine Amberlite XAD-4 comparé à celui obtenu après l'extraction liquide/liquide, ceci est attesté par la disparition du pic à $t_r = 11$ min et la

diminution de l'intensité du pic à $t_r = 14$ min (Figure 38). D'après la Figure 39, les résultats montrent que :

- Le rendement d'extraction par la résine Amberlite XAD-4 est 2,3 fois plus important pour le sidérophore $m/z = 794$ que lors de l'extraction liquide/liquide (Figure 39-A),
- le produit final est 7,5 fois plus riche en sidérophore $m/z = 794$ que lors de l'extraction liquide/liquide, démontrant un meilleur facteur de purification (Figure 39-B).

En outre, l'évaporation de l'extrait méthanolique obtenu après passage sur Amberlite XAD-4 est beaucoup plus facile et rapide que celle effectuée sur l'extrait aqueux obtenu par double extraction liquide/liquide.

Pour ces raisons, l'extraction par la résine Amberlite XAD-4 a été choisie pour la suite de l'étude.

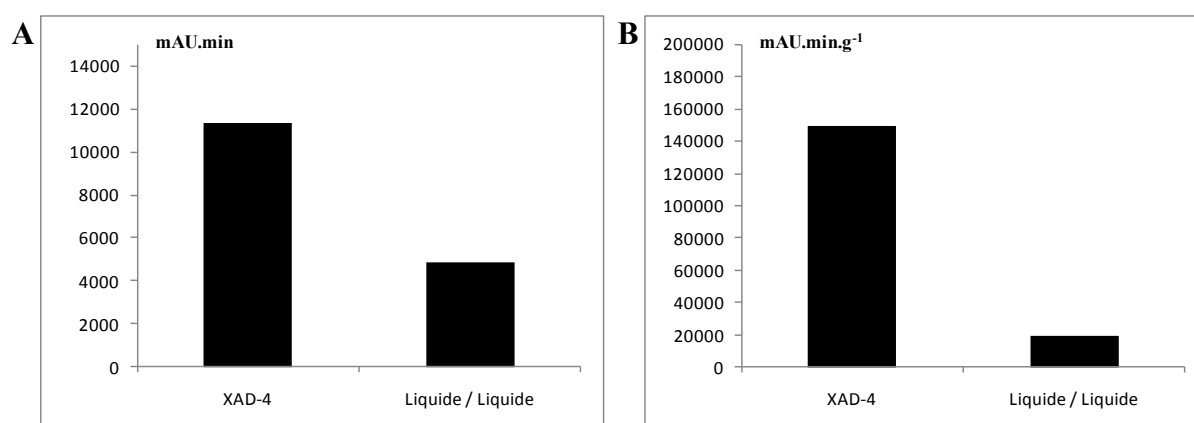


Figure 39 : Comparaison des méthodes d'extraction par Amberlite XAD-4 et liquide/liquide, des sidérophores produits par *S. apiospermum* ; rendement d'extraction (A) et pureté de l'extrait (B) en sidérophore $m/z = 794$

III.7.2. Influence des paramètres sur la méthode d'extraction par Amberlite XAD-4 : plan d'expérience

Afin d'améliorer l'extraction des sidérophores par la résine Amberlite XAD-4, l'influence de différents paramètres a été étudiée selon un plan d'expérience. Les résultats obtenus pour l'ensemble des expériences sont indiqués dans le

Tableau 13.

Tableau 13 : Efficacité et spécificité en pourcentage de l'extraction par Amberlite XAD-4 des sidérophores pour l'ensemble des expériences du plan

N° Exp. NemrodW	efficacité de l'extraction (% sidérophore extrait)	spécificité de l'extraction (% masse sidérophore / masse de l'extrait)
7	102,2 ± 7,4	5,72 ± 0,55
12	0,12 ± 0,01	0,011 ± 0,001
21	7,4 ± 0,9	0,70 ± 0,11
27	0,6 ± 0,8	0,06 ± 0,08
41	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
54	13,6 ± 0,3	0,84 ± 0,03
72	36,9 ± 2,0	2,37 ± 0,16
90	1,6 ± 0,6	0,09 ± 0,04
90	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
113	5,4 ± 1,1	0,73 ± 0,17
113	6,6 ± 0,7	0,79 ± 0,10
128	12,1 ± 0,7	0,76 ± 0,06
128	14,2 ± 0,8	0,95 ± 0,07
132	6,8 ± 0,2	0,74 ± 0,04
173	0,8 ± 1,6	0,08 ± 0,17
194	2,0 ± 0,1	0,15 ± 0,01
206	0,4 ± 0,2	0,03 ± 0,02
255	101,1 ± 2,6	4,66 ± 0,22
275	9,4 ± 0,4	1,07 ± 0,07

D'après la Figure 40, la plupart des expériences aboutissent à des pourcentages d'extraction des sidérophores compris entre 0,8% et 13,8%, dont la valeur moyenne est centrée sur 6,6% de sidérophores extrait. Une expérience montre un pourcentage intermédiaire de 37% (expérience 72) et seules deux expériences ont un pourcentage de 100% (expériences 7 et 255).

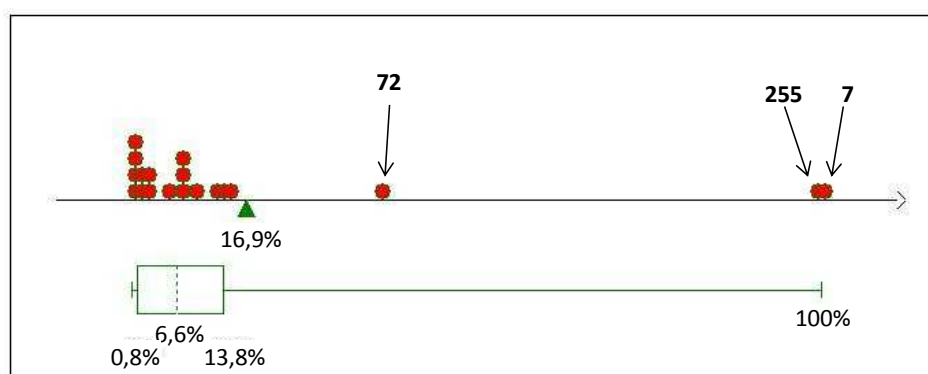


Figure 40 : Répartition des pourcentages d'extraction des sidérophores en fonction des expériences (●) ; en dessous, boîte à moustaches représentant la répartition des données

L'utilisation du logiciel NemrodW permet ensuite de déterminer l'impact des différents paramètres étudiés sur l'extraction (Figure 41). L'ensemble des paramètres choisis influence l'extraction et ils le font de la même façon pour l'efficacité et la spécificité de l'extraction. L'analyse des résultats permet de ressortir les éléments suivants :

- la résine Amberlite XAD-4 est capable d'extraire des sidérophores de type hydroxamate et les phénol/catéchol, bien qu'elle semble moins efficace pour ces derniers,
- l'ajout de fer dans le milieu avant l'extraction diminue le rendement de l'extraction, ainsi que la pureté de l'extrait,
- l'ajout de sulfate d'ammonium (à 80% de saturation) dans le filtrat de culture a un impact différent selon le temps de précipitation des protéines ; la meilleure extraction des sidérophores est obtenue lorsque les protéines sont précipitées pendant 1 h,
- le pH du milieu de culture a un impact fort sur l'extraction des sidérophores, le pH favorable étant de 8,
- le paramètre qui influence le moins l'efficacité de l'extraction est la composition du milieu de culture.

Concernant l'effet de l'agitation et du temps de contact du filtrat de culture avec la résine Amberlite XAD-4, ces paramètres ont le plus d'effet sur l'extraction des sidérophores. En outre, il existe bien une interaction entre ces deux paramètres (Figure 41). Par exemple, l'agitation n'a pas d'effet sur l'extraction si le temps de contact est d'une heure, alors que celle-ci a un effet significatif lorsque ce temps est de 17 heures.

Ce plan d'expérience montre que la pureté de l'extrait est corrélée avec une bonne efficacité de l'extraction.

L'extraction par la résine Amberlite XAD-4 reste très dépendante de la structure de la molécule extraite (structure du ligand et état de complexation). Etant donné que les résultats ont été obtenus à partir de sidérophores témoins, les résultats de ce plan ont été vérifiés sur les sidérophores produits par *S. apiospermum*. De plus, l'influence du fer dans le milieu de culture sur l'extraction a également été vérifiée. A l'inverse des résultats obtenus lors du plan d'expérience, la présence de fer a permis d'augmenter l'efficacité de l'extraction des sidérophores de *S. apiospermum* par la résine XAD-4 (Figure 42). Cette efficacité est multipliée par 1,7 pour le sidérophore de $m/z = 538$ et par 2,4 pour celui de $m/z = 794$.

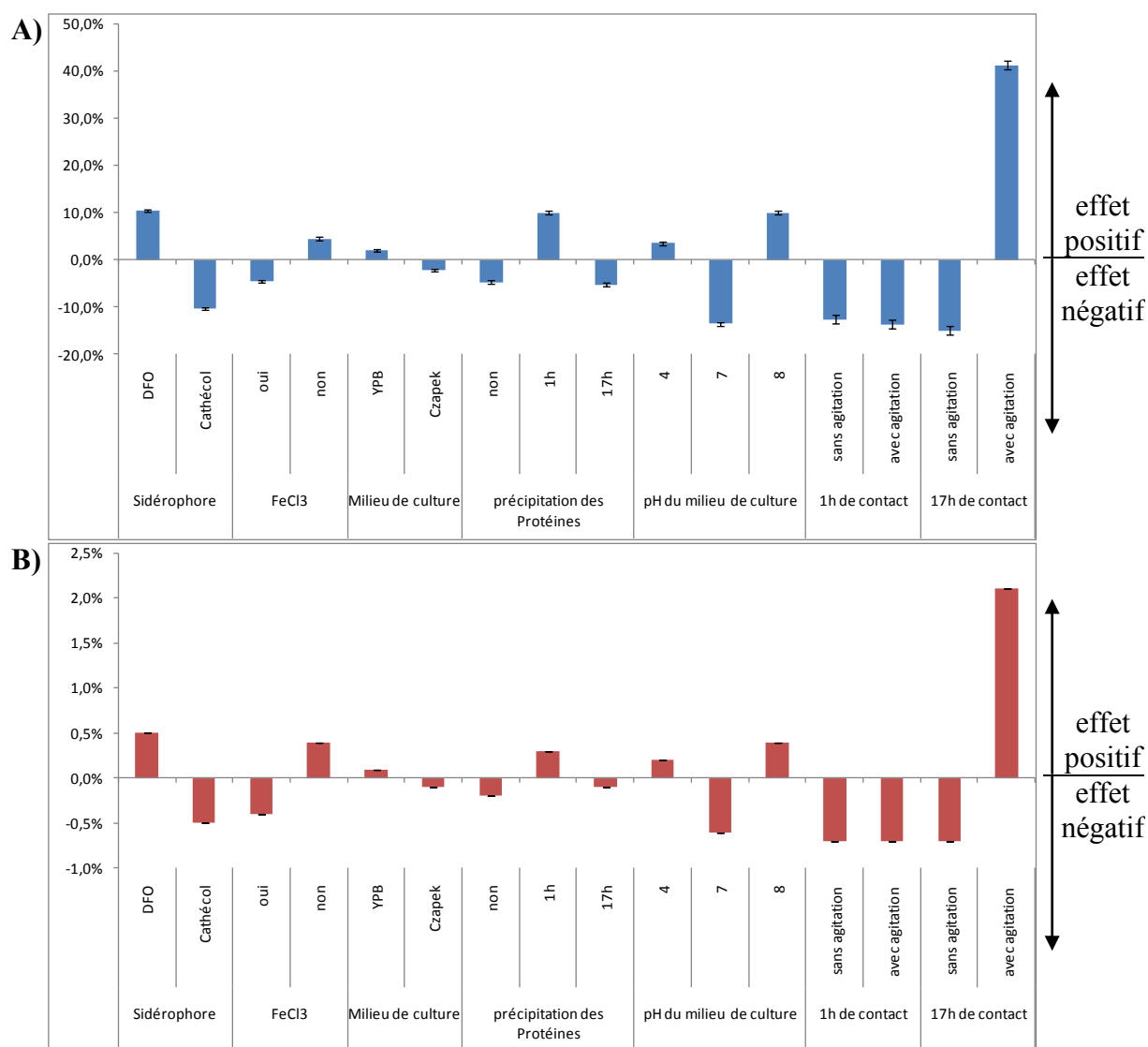


Figure 41 : Quantification des effets des différents paramètres sur le rendement d'extraction en % (A) et la pureté du produit (B)

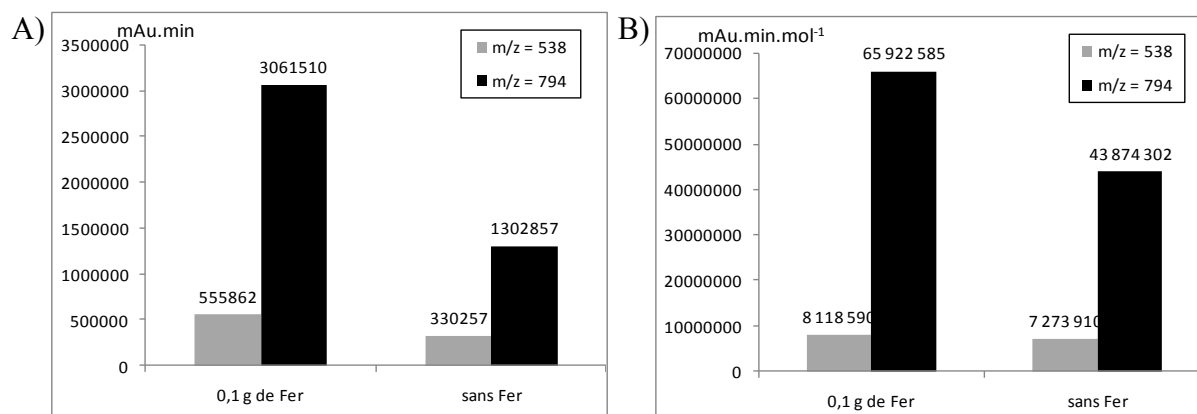


Figure 42 : Rendement de l'extraction pour les sidérophores de *S. apiospermum* extraits (A) et pureté de l'extrait (B) obtenu avec ou sans ajout de fer sur résine Amberlite XAD-4 analysé par CLHP

III.8. Applications du protocole d'extraction sur résine Amberlite XAD-4

III.8.1. A l'étude des sidérophores produits par d'autres champignons impliqués dans la mucoviscidose

III.8.1.1. Détection sur milieu gélosé CAS

Afin de s'assurer que l'ensemble des champignons sélectionnés soient bien producteurs de sidérophores, une détection préliminaire sur milieu gélosé CAS a été effectuée (Figure 43). Tous les champignons sélectionnés ont sécrété des sidérophores dans des proportions variables (Tableau 14). *Scedosporium aurantiacum* a présenté le plus fort rapport CAS (5,5), suivi d'*E. dermatitidis* (4,5), tandis que les autres espèces ont des rapports variant de 1,3 à 1,9.

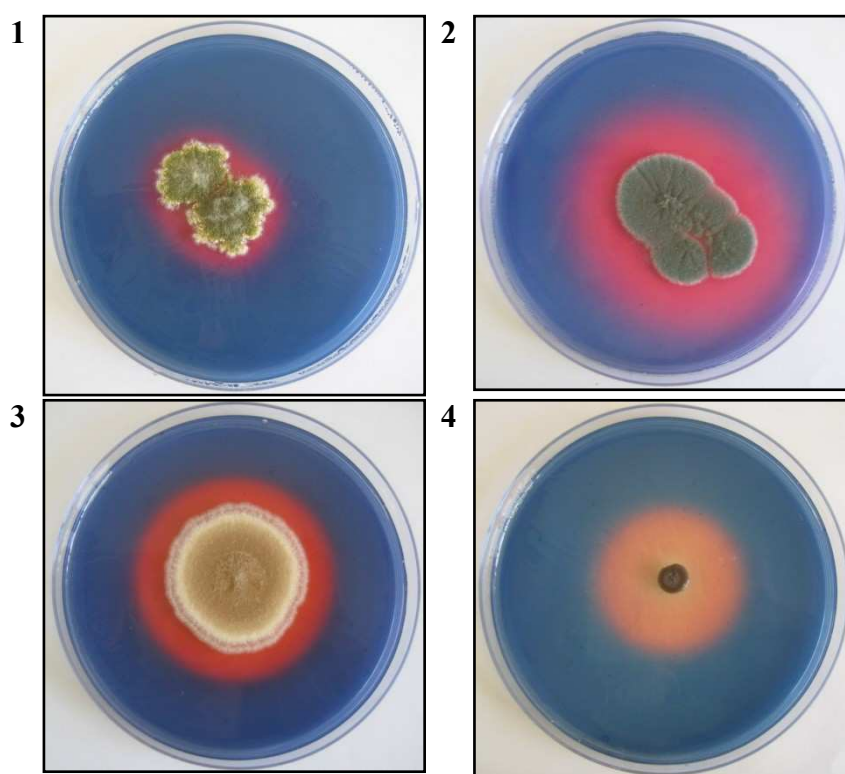


Figure 43 : Détection sur milieu gélosé CAS pour quatre espèces de champignons :
A. flavus (1), *A. fumigatus* (2), *A. terreus* (3) et *E. dermatitidis* (4)

Tableau 14 : Production de sidérophores sur milieu gélosé CAS par des espèces fongiques impliquées dans la mucoviscidose

espèce	référence	rapport CAS*
<i>A. flavus</i>	LMA 4.06.07735 col.1	1,3 ± 0,1
<i>A. fumigatus</i>	IHEM 22075	1,9 ± 0,2
<i>A. terreus</i>	LMA 4.02.06202 col.1	1,4 ± 0,1
<i>E. dermatitidis</i>	LMA 4.04.09550 col.1	4,5 ± 1,0
<i>S. aurantiacum</i>	IHEM 15458	5,5 ± 0,5

* : le rapport CAS correspond au rapport des diamètres du halo sidérophore et de la colonie fongique

III.8.1.2. Identification des sidérophores par RP-CLHP-Visible-MS

Ces champignons ont été cultivés pendant 4 jours à 37°C dans du milieu YNB déplété en fer. Les sidérophores des filtrats de culture ont été extraits par la résine Amberlite XAD-4, et analysés par CLHP.

Dans le cas d'*E. dermatitidis*, l'analyse CLHP de l'extrait obtenu par XAD-4 n'a montré aucun pic à 435 nm. Quant à l'analyse de l'isolat clinique de *S. aurantiacum* IHEM 15458, celle-ci a montré un pic ($t_r = 6,0$ min, $m/z = 794$) déjà détecté pour *S. apiospermum*.

L'analyse de l'extrait d'*A. flavus* par CLHP a montré un pic à 435 nm dont le temps de rétention est de 7,9 min (Figure 44-A). Le spectre de masse de ce pic a fourni $m/z = 801,1$ (Figure 45). Le chromatogramme obtenu par extraction de cette masse corrèle avec le chromatogramme obtenu par une détection à 435 nm (Figure 44).

L'analyse de l'extrait d'*A. terreus* par CLHP montre trois pics absorbants à 435 nm correspondant à trois temps de rétention de 3,9 min, de 7,9 min et de 8,5 min (Figure 46-A). Les spectres de masse du pic I, II, III montrent des masses respectives de $m/z = 538,0$ (Figure 47-A), celui $m/z = 801,1$ (Figure 47-B) et $m/z = 822,2$ (Figure 47-C). Le chromatogramme obtenu par extraction de cette masse corrèle avec le chromatogramme obtenu par une détection à 435 nm (Figure 46). Il est intéressant de noter que le pic II correspond au pic trouvé pour *A. flavus*.

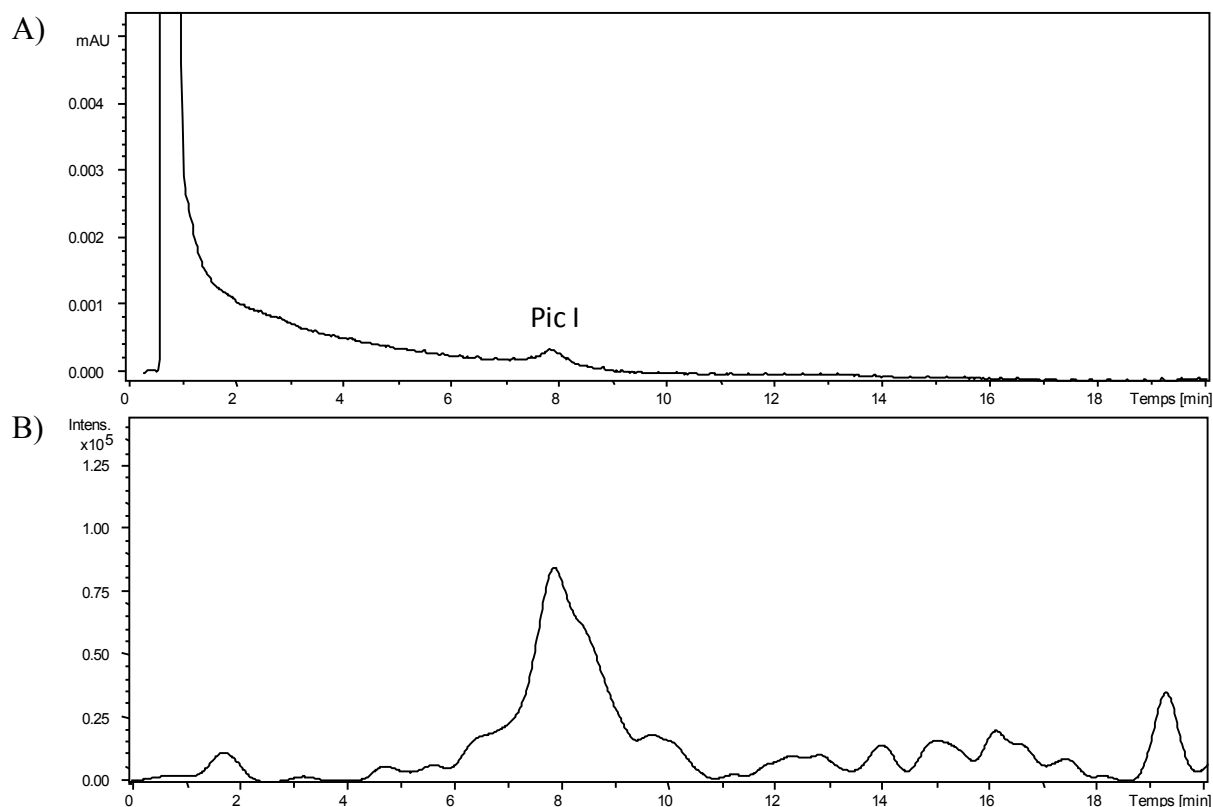


Figure 44 : Chromatogrammes de l'extract brut d'*A. flavus* à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic I (B, masse $m/z = 801,1$)

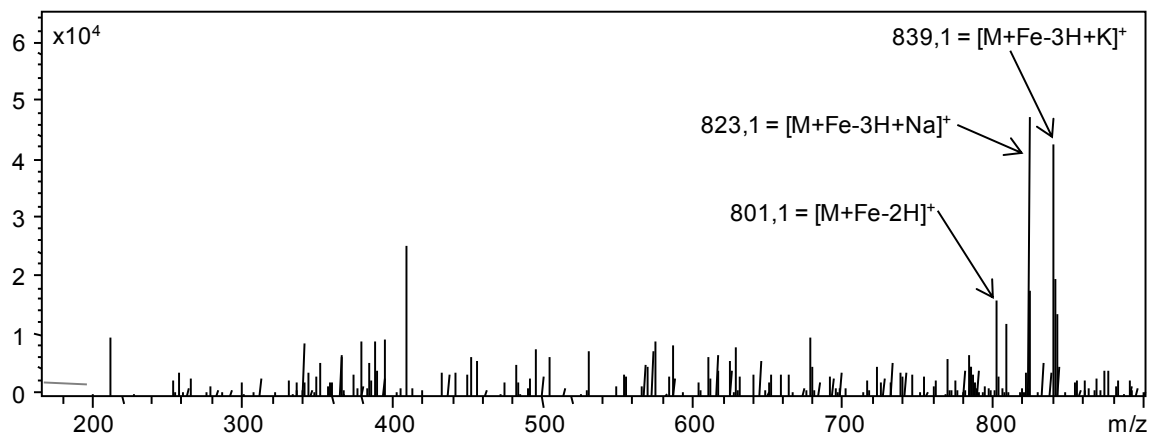


Figure 45 : Spectres de masse du pic I de l'extract d'*A. flavus* (A, $t_r = 7,4-8,8$ min) obtenus par LC-ESI+-MS

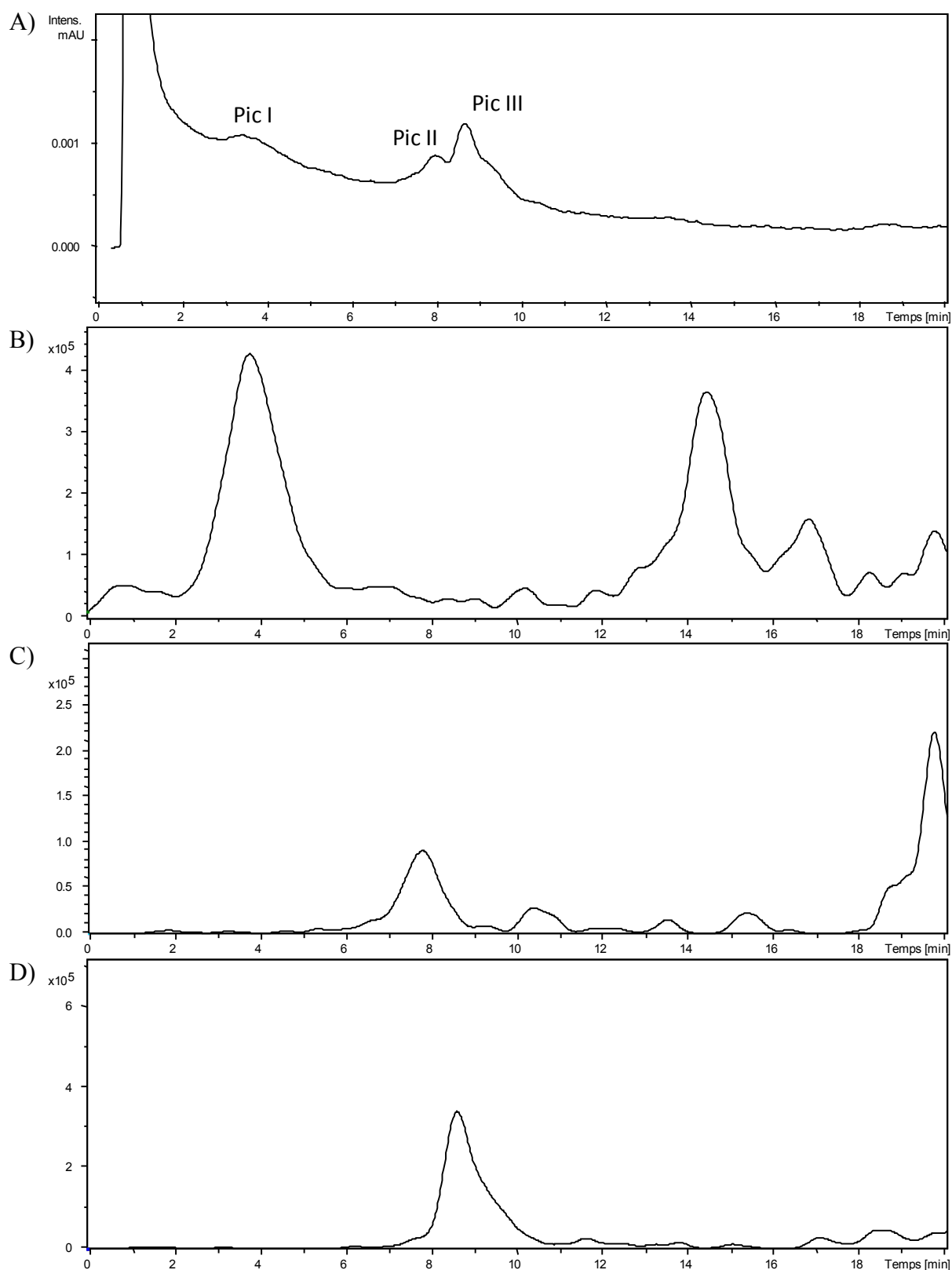


Figure 46 : Chromatogrammes de l'extract brut d'*A. terreus* à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic I (B, masse $m/z = 538,0$), du pic II (C, masse $m/z = 801,1$) et du pic III (D, masse $m/z = 822,2$)

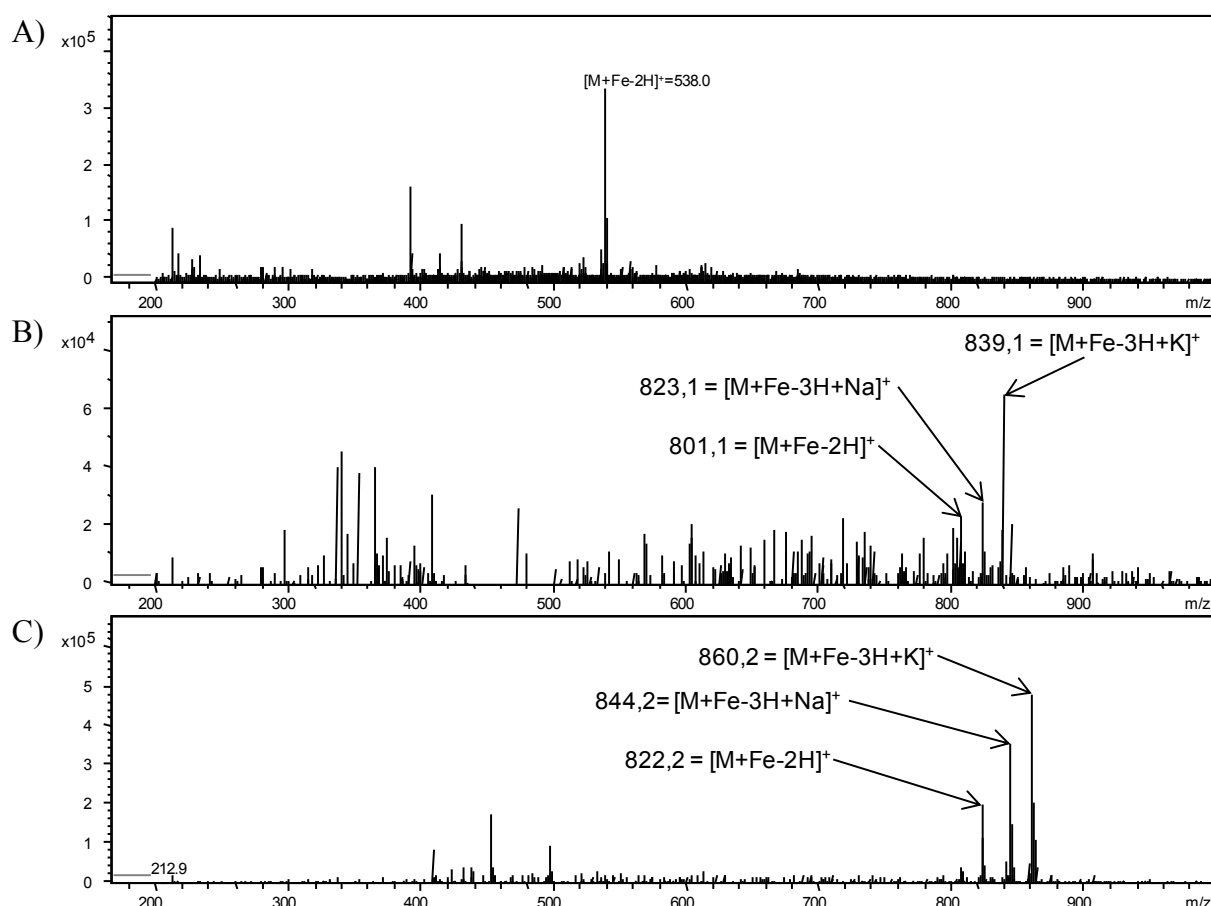


Figure 47 : Spectres de masse des pics de l'extrait d'*A. terreus* obtenus par LC-ESI+-MS ; A) pic I ($t_r = 3,0-4,6$ min), B) pic II ($t_r = 7,5-8,2$ min), C) pic III ($t_r = 8,3-8,9$ min)

L'analyse de l'extrait d'*A. fumigatus* par CLHP montre quatre pics absorbant à 435 nm dont les temps de rétention de 7,5, 8,9, 11,7 et 13,0 min (Figure 48-A). Les spectres de masse des pics III, IV montrent des masses respectivement de $m/z = 907,2$ (Figure 49-A) et de $m/z = 906,2$ (Figure 49-B). Le chromatogramme obtenu par extraction de cette masse corrèle avec le chromatogramme obtenu par une détection à 435 nm (Figure 48).

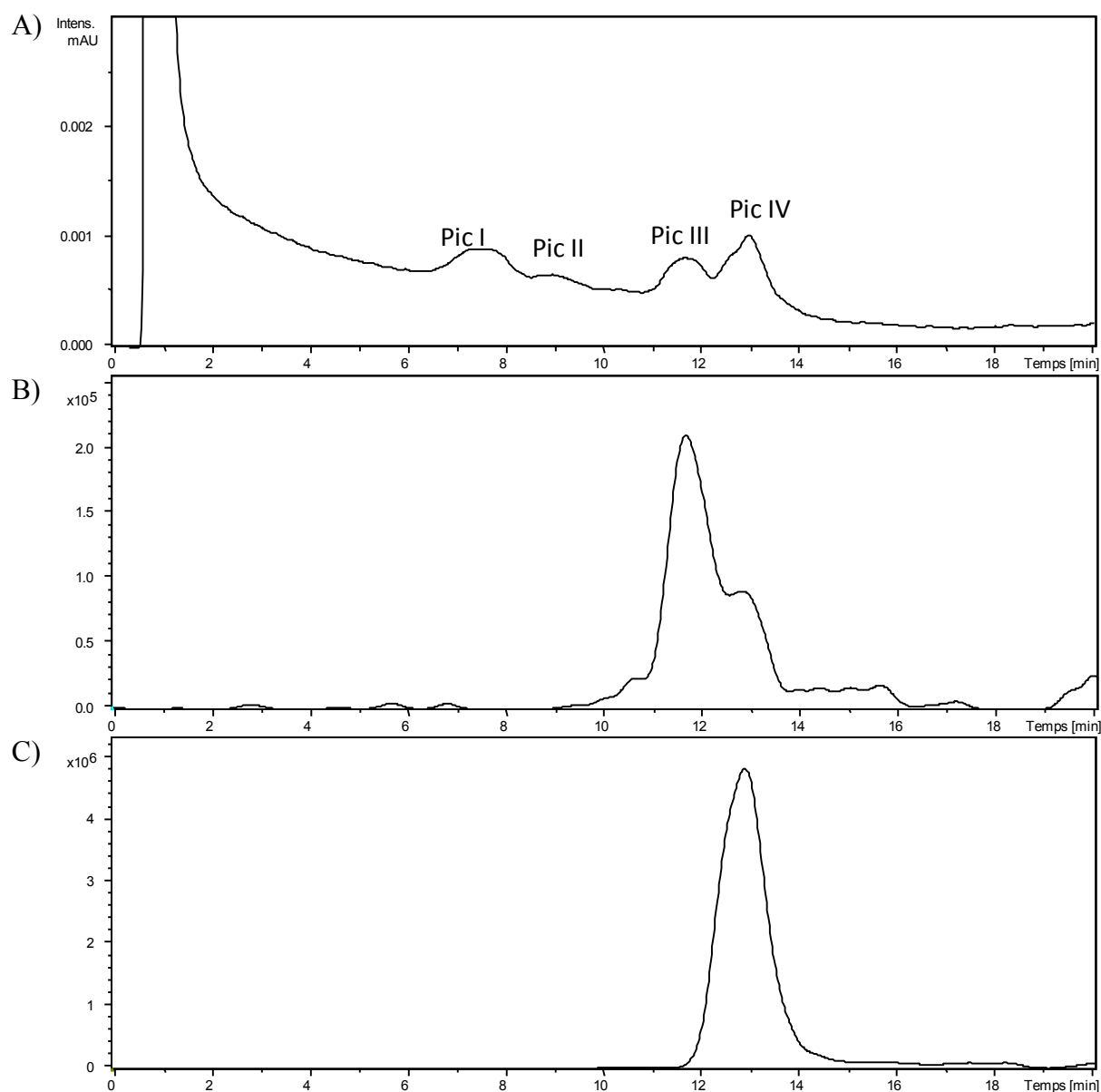


Figure 48 : Chromatogrammes de l'extract brut d'*A. fumigatus* à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic III (B, masse $m/z = 907,2$), du pic IV (C, masse $m/z = 906,2$)

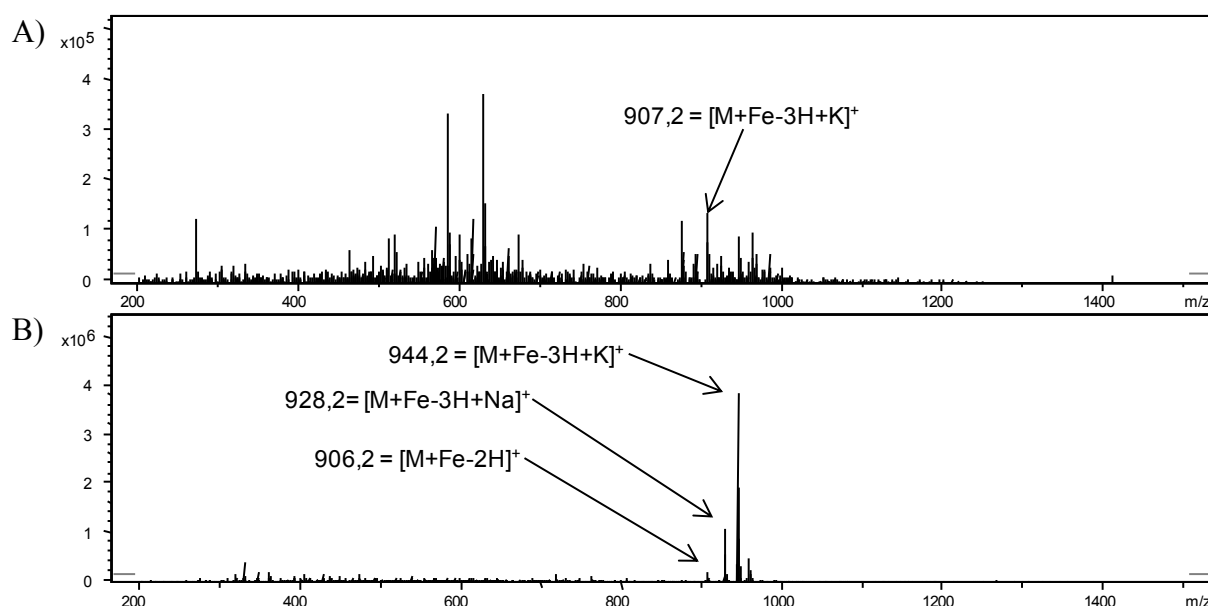


Figure 49 : Spectres de masse des pics de l'extrait d'*A. fumigatus* obtenus par LC-ESI+-MS ; A) pic III ($t_r = 10,9-11,8$ min), B) pic IV ($t_r = 12,4-13,6$ min)

L'ensemble des pics détectés pour chacune des souches fongiques étudiées est résumé dans le Tableau 15. Plusieurs sidérophores différents ont été détectés pour les différentes espèces fongiques. Il est à noter que *A. terreus* et *S. aurantiacum* produisent des sidérophores similaires à *S. apiospermum*.

Tableau 15 : Caractéristiques chromatographiques des pics détectés dans les filtrats de culture de champignons filamenteux isolés de patients atteints de mucoviscidose

Pathogène	Temps de rétention (min)	Masse associée $[M+Fe-2H]^+$ m/z
<i>A. flavus</i>	7,9	801,1
<i>A. terreus</i>	3,9	538,0
	7,9	801,1
	8,5	822,2
<i>A. fumigatus</i>	7,5	NC
	8,9	NC
	11,7	907,2
	13,0	906,2
<i>E. dermatitidis</i>	ND	
<i>S. aurantiacum</i>	6,0	793,9

NC : non caractérisé ; ND : non détecté

III.8.2. A la détection des sidérophores dans les crachats de malades atteints de mucoviscidose et présentant une colonisation fongique

La recherche des sidérophores dans les crachats des patients infectés et atteints de mucoviscidose a été effectuée. L'extraction de ces sidérophores a été réalisée sur la résine Amberlite XAD-4, et l'analyse a été effectuée par RP-LC-UV-Visible-ESI+-MS. Certains des chromatogrammes obtenus à 435 nm permettent de rechercher la présence de pics ayant les mêmes temps de rétention que ceux de certains sidérophores (Figure 50) préalablement détectés $t_r = 3,6$ min et $t_r = 6,2$ min. les spectres de masses montrent qu'ils correspondent aux sidérophores de *S. apiospermum*. D'autres pics dont les composés sont apparus à $t_r = 8,1$ min, 10,4 min et 11,6 min.

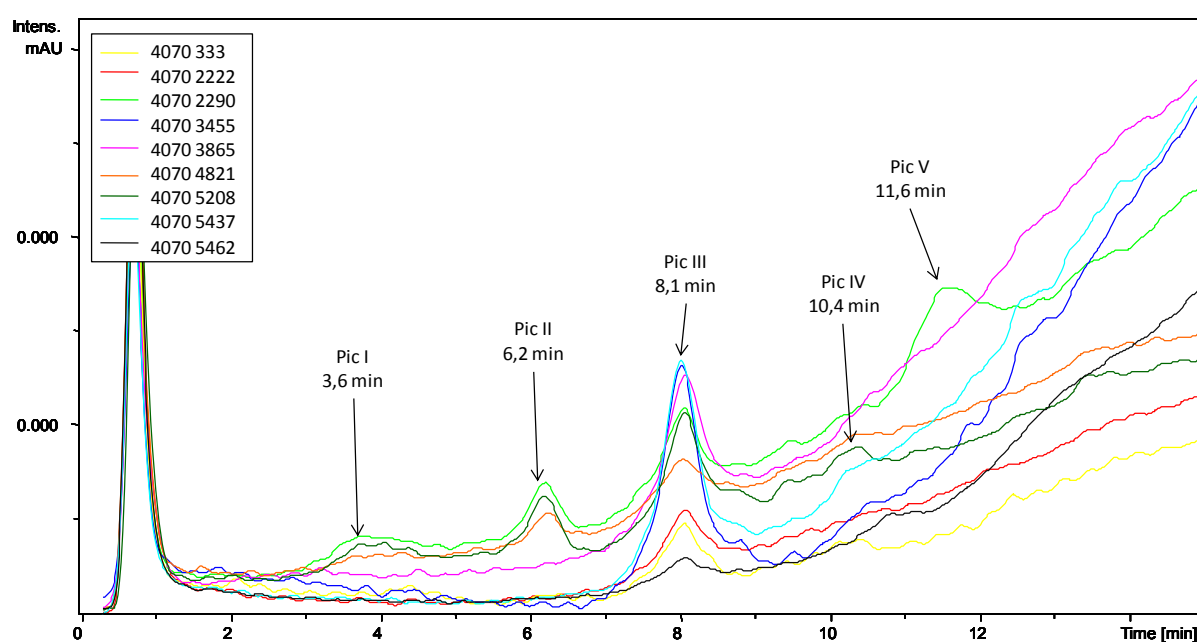


Figure 50 : Chromatogrammes obtenus à 435 nm pour l'analyse des différents crachats

IV. Discussion :

Afin de mieux appréhender les interactions entre l'hôte (l'homme) et le pathogène *S. apiospermum*, une étude de ses mécanismes d'acquisition du fer a été entreprise. Celle-ci s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés par le Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène sur les facteurs de virulence fongiques [77, 78]. Parmi les facteurs de virulence

étudiés, *S. apiospermum* est capable de synthétiser diverses protéases du type sérine [77] ou métallo [76], mais également une Cu,Zn- superoxyde dismutase qui joue un rôle contre le stress oxydatif exercé par l'hôte [78]. Compte tenu du rôle des sidérophores dans l'interaction hôte-pathogène [9, 65], ceux-ci peuvent être considérés comme des facteurs de virulence qui contribuent à l'installation du champignon chez son hôte humain. Concernant le métabolisme du fer, *S. apiospermum* étant un pathogène émergent, peu d'informations sont connues. C'est pourquoi nous avons entrepris cette étude en nous intéressant plus particulièrement aux sidérophores sécrétés par *S. apiospermum*.

Tout d'abord des sidérophores ont été mis en évidence en cultivant *S. apiospermum* sur milieu gélosé CAS. Le milieu initialement bleu a viré au rouge-orangé révélant la sécrétion de sidérophores diffusant autour de la colonie fongique (Figure 29). Une étude sur une trentaine de souches de *S. apiospermum* a démontré que la sécrétion de sidérophores est une constante au sein de l'espèce *S. apiospermum*. Forts de ces résultats, nous avons entrepris de purifier et d'identifier ces sidérophores.

Au préalable, une étude des paramètres influençant les conditions de biosynthèse de ces molécules en milieu liquide a été réalisée dans le but d'optimiser leur production. Un milieu de culture commercial déplété en fer et cuivre a été utilisé afin de stimuler la sécrétion des sidérophores par le champignon. En effet, les microorganismes ont recours à cette stratégie de captation du fer lorsqu'ils sont soumis à un stress en fer. Puis d'autres paramètres de culture ont été étudiés tels que le pH (4, 7, 8), la durée d'incubation et l'agitation du milieu de culture. Certains se sont révélés interdépendants. La durée d'incubation pour atteindre l'optimum de production varie en fonction du pH du milieu de culture (Figure 30). La production de sidérophores est retardée lorsque le milieu est à pH = 4. En effet, l'acidification du milieu rend le fer III plus soluble dans l'eau et donc plus facilement assimilable par le champignon qu'en milieu basique [214]. Ainsi, en milieu acide le stress ferrique auquel est soumis *S. apiospermum* est diminué, ce qui a eu pour effet de retarder le pic de production en sidérophores à 5 jours. Ceci constitue l'un des moyens d'acquisition du fer par les microorganismes qui secrètent de petits acides organiques afin d'acidifier leur milieu de culture [63] et faciliter l'assimilation du fer. Par contre, en milieu basique (pH = 8) où le fer ferrique est moins soluble [5], *S. apiospermum* subit donc un stress ferrique plus important. Nous avons alors observé une production de sidérophores plus précoce avec un maximum à 3 jours. Outre la précocité, la production s'est révélée 4 à 5 fois plus élevée qu'en milieu

acide. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus pour la plupart des microorganismes où le maximum de production en sidérophores est atteint entre 2 et 7 jours [68].

La phase de latence des deux premiers jours, où la production de sidérophores n'est pas détectable chez *S. apiospermum*, suggère un processus complexe dont la mise en place exige du temps. Après 4 jours, la concentration en sidérophores dans le milieu n'évolue plus alors que la croissance fongique n'est pas au maximum. Ce phénomène a été observé chez les bactéries du genre *Frankia*, où la production de sidérophores est suivie d'une forte production de protéines [215].

Concernant l'agitation, ce paramètre influence défavorablement la production de sidérophores. Ainsi l'absence d'agitation se révèle indispensable pour obtenir une bonne production de sidérophores par le champignon. Le même phénomène avait été observé pour la synthèse d'une sérine-protéase par *S. apiospermum* [77]. L'hypothèse serait que l'agitation tendrait à maintenir le champignon en anaérobiose où le métabolisme au ralenti serait moins exigeant en fer qu'en aérobiose [68]. En effet, l'aérobiose conditionne le fonctionnement de la chaîne respiratoire au niveau mitochondriale qui fait appel à de nombreuses enzymes dépendantes du fer.

Cette étude des conditions de production des sidérophores par *S. apiospermum* peut être rapprochée des conditions de croissance de ce champignon dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. En effet, les paramètres de culture utilisés s'avèrent proches des conditions pulmonaires, en particulier la faible biodisponibilité en fer [8], la relative neutralité du pH [213], l'aérobiose et l'absence d'agitation. Il a été montré que ces conditions étaient favorables à la production de sidérophores par certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* pathogène fréquent des voies respiratoires des malades atteints de mucoviscidose [216]. En outre, la colonisation se ferait préférentiellement dans la partie aérobie des poumons plutôt que dans les voies respiratoires proprement dites. Mais le contexte de la mucoviscidose est différent, en particulier les sécrétions respiratoires sont plus épaisses et plus riches en chlorure de sodium [1]. Sans qu'il y ait eu d'études approfondies de l'impact de ces conditions sur la sécrétion de sidérophores, il a été observé chez *Bacillus subtilis* qu'une concentration élevée en NaCl étaient tout à fait favorable à une production de sidérophores [217]. Ce stress salin aurait vraisemblablement un effet sur la cellule bactérienne plutôt que sur la solubilité du fer qui à priori n'est pas influencée par le chlorure de sodium [218]. L'ensemble de ces résultats montre que *S. apiospermum* est capable de

produire des sidérophores dans les conditions physiologiques des voies respiratoires mais également dans un contexte de mucoviscidose.

En conclusion, notre étude a permis d'optimiser les conditions de production des sidérophores par *S. apiospermum* qui sont : milieu liquide déplété en fer, pH de 8, incubation à 37°C pendant 3 jours et sans agitation. Ces conditions se rapprochent des conditions physiologiques pulmonaires, voire dans un contexte de mucoviscidose.

Une première caractérisation des sidérophores produits par *S. apiospermum*, a été menée sur les filtrats de culture grâce à des réactions de coloration spécifique des classes de sidérophores. Ces réactions ont permis de ranger les sidérophores produits par *S. apiospermum* dans la classe des hydroxamates. Ce résultat est cohérent avec les observations déjà effectuées pour d'autres champignons filamenteux pathogènes de l'homme, à savoir la sécrétion quasi exclusive de sidérophores de type hydroxamate [5].

Ensuite, un isolement des sidérophores a été entrepris suivi de leur identification. La séparation a débuté par une extraction liquide/liquide suivie d'une analyse par CLHP-UV-Vis-ESI+-MS. Celle-ci a indiqué que deux ligands formant un complexe rouge-orangé (absorbant à 435 nm) avec le fer III sont produits par *S. apiospermum*. Par spectrométrie de masse, ces deux complexes présentent deux masses respectives de $m/z = 793,9$ et de $m/z = 537,9$. ces masses répertoriées dans la bibliographie pour des sidérophores produits par d'autres champignons tels que : *Histoplasma capsulatum*, *Verticillium*, *Gliocladium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Stemphyllium*, *Monascus anka* [5, 129, 172], correspondent à deux sidérophores de la famille des coprogènes [5, 172] : l'acide dimérumique ($m/z = 537,9$) et le méthyl coprogène B ($m/z = 793,9$). Ces deux sidérophores de nature peptidique appartiennent à la classe des hydroxamates (Figure 51), ce qui confirme les résultats précédents obtenus avec les réactions de caractérisation.

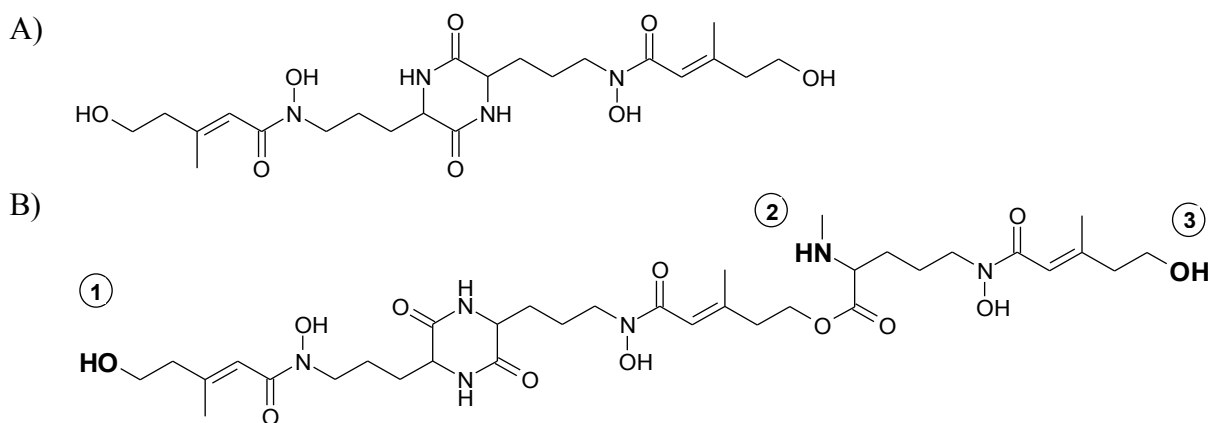


Figure 51 : Structure de l'acide dimérique (A) et du N^α-méthyl coprogène B (B)

L'étude de la fragmentation par ESI+-MS-MS des deux pics obtenus par CLHP est venue confirmer l'identification de ces sidérophores (Figure 52). L'étude MSⁿ du méthyl coprogène B permet de localiser la position du méthyle parmi les trois possibilités (Figure 51-B). La présence du fragment $m/z = 538$ de l'ion moléculaire $m/z = 794$ permet d'écarter un méthyle en position ①. Il est intéressant de noter que la fragmentation du méthyl coprogène B conduit à former l'acide dimérique. De plus, la fragmentation de l'ion moléculaire $m/z = 794$ forme un produit $m/z = 649$ qui se fragmente ensuite en deux fragments caractéristiques $m/z = 538$ et 520 . La façon la plus plausible d'expliquer ces fragments passe par la présence en position ②. Ainsi le second sidérophore produit par *S. apiospermum* sera nommé N^α-méthyl coprogène B.

Grâce à ce protocole d'identification une étude de la sécrétion de ces sidérophores par *S. apiospermum* en fonction de diverses concentrations en fer apportées dans son milieu de culture, a été réalisée. Cette expérience est venue confirmer qu'un stress ferrique est nécessaire pour déclencher la synthèse de sidérophores par *S. apiospermum*. En effet, aucune sécrétion de N^α-méthyl coprogène B n'a pu être détectée au dessus d'une concentration de 0,1 μM en fer dans le milieu de culture. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus chez la plupart des microorganismes [68].

En résumé, *Scedosporium apiospermum* produit deux sidérophores : l'acide dimérique et le N^α-méthyl coprogène B. Pour obtenir une production significative de ces sidérophores, la concentration en fer du milieu de culture ne doit pas dépasser 0,1 μM .

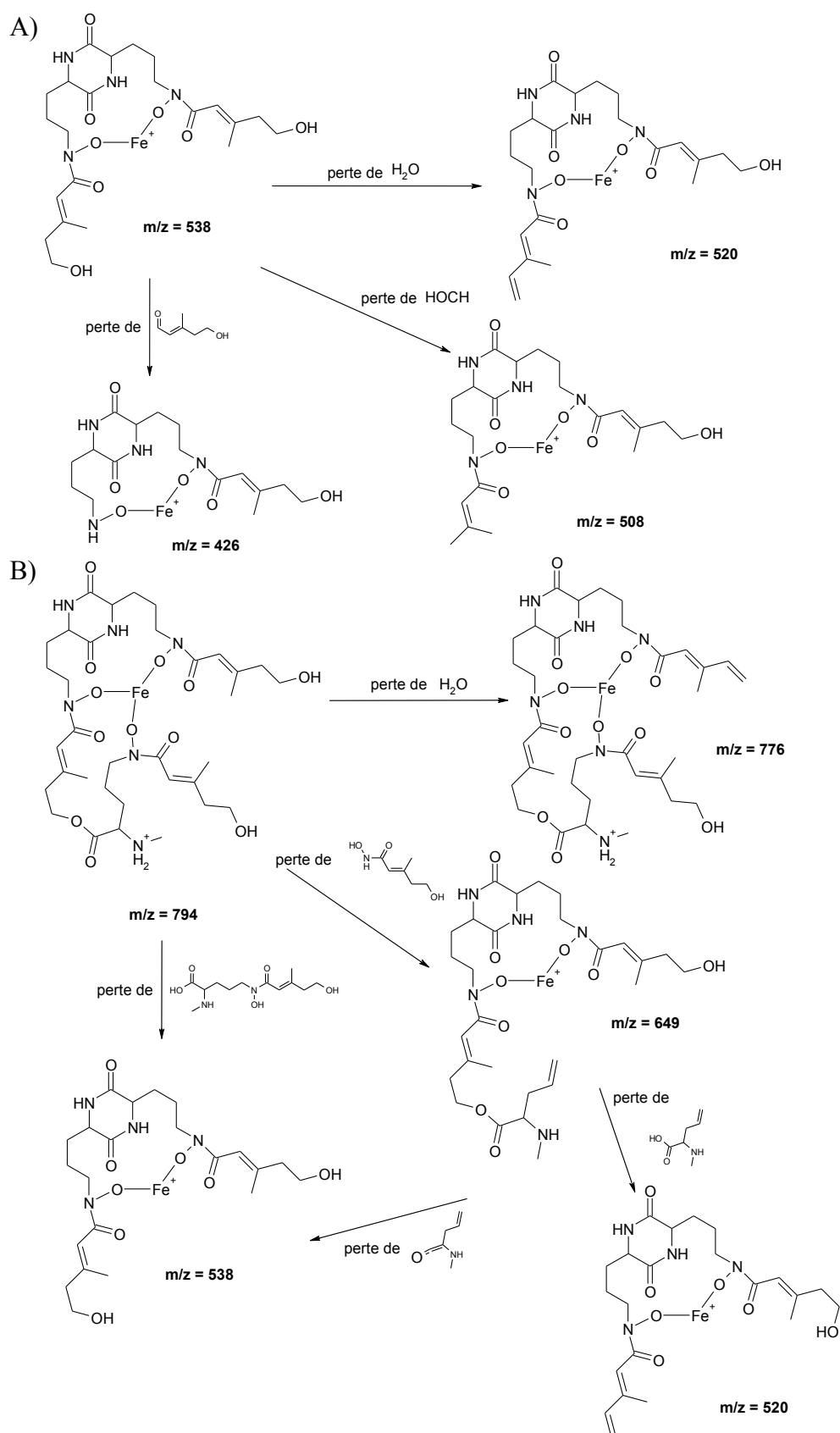


Figure 52 : Fragmentation des complexes fer(III) de l'acide dimérique (A) et du N^α -méthyl coprogène B (B) par ESI+-MS

Dans le cadre de la mucoviscidose, *S. apiospermum* fait partie des trois champignons les plus souvent retrouvés dans les poumons des patients [16, 17]. Il faut savoir que chez l'hôte humain, le fer est transporté par la transferrine, stocké par la ferritine et séquestré par la lactoferrine [8, 219-221]. Dans le cas d'infections pulmonaires, des travaux ont montré que la concentration en lactoferrine augmente dans les poumons [219]. Cette augmentation serait en fait un mécanisme naturel de défense de l'hôte contre les microorganismes car en séquestrant le fer, la lactoferrine exerce un effet antimicrobien [222]. Les patients atteints de mucoviscidose ont dans leurs sécrétions broncho-pulmonaires de la transferrine, de la lactoferrine [221] et de la ferritine [220]. Pour l'agent pathogène, ces protéines peuvent constituer des sources de fer, moyennant la capacité de leur soustraire ce fer par l'intermédiaire de molécules à forte affinité pour le fer telles que les sidérophores. Nous avons montré par des expériences de dialyse que les sidérophores de *S. apiospermum* pouvaient interagir avec ces protéines.

Pour l'holo-transferrine, il a été montré que le fer contenu dans la protéine pouvait être soustrait par les sidérophores de *S. apiospermum*. Ces sidérophores se sont avérés capables de traverser la membrane de dialyse, de soustraire le fer à l'holo-transferrine contenu dans le boudin de dialyse et de le ramener au champignon (Figure 53). Ce même phénomène a été observé chez d'autres champignons tels qu'*A. fumigatus* [65] ou chez certaines bactéries comme *S. aureus* et *S. epidermidis* [66]. Chez *A. fumigatus*, la mise en contact de sidérophores avec la transferrine a bien entraîné une perte en fer au niveau de la protéine [65]. Ce phénomène suggère que la transferrine présente dans les sécrétions broncho-pulmonaires pourrait constituer une source de fer pour *S. apiospermum* et renforce l'idée que ces sidérophores peuvent être considérés comme des facteurs de virulence.

Curieusement pour la lactoferrine, nous avons constaté que la concentration en fer dans le boudin de dialyse augmentait dans le temps. Ceci implique une entrée de fer dans le boudin de dialyse qui pourrait s'expliquer par des processus de dégradation cellulaire du champignon libérant du fer qui, diffusant à travers la membrane de dialyse, serait capté par la lactoferrine. En outre, l'affinité de la lactoferrine pour le fer étant très élevée, la soustraction du fer par les sidérophores serait plus difficilement réalisable. Cette hypothèse est en accord avec les propriétés antifongiques et antibactériennes reconnues pour la lactoferrine [222]. Des données thermodynamiques confirment que la lactoferrine a une plus grande affinité pour le fer que la transferrine. Cette différence d'affinité est encore accentuée par une différence de stabilité cinétique entre ces deux protéines en faveur de la lactoferrine [79].

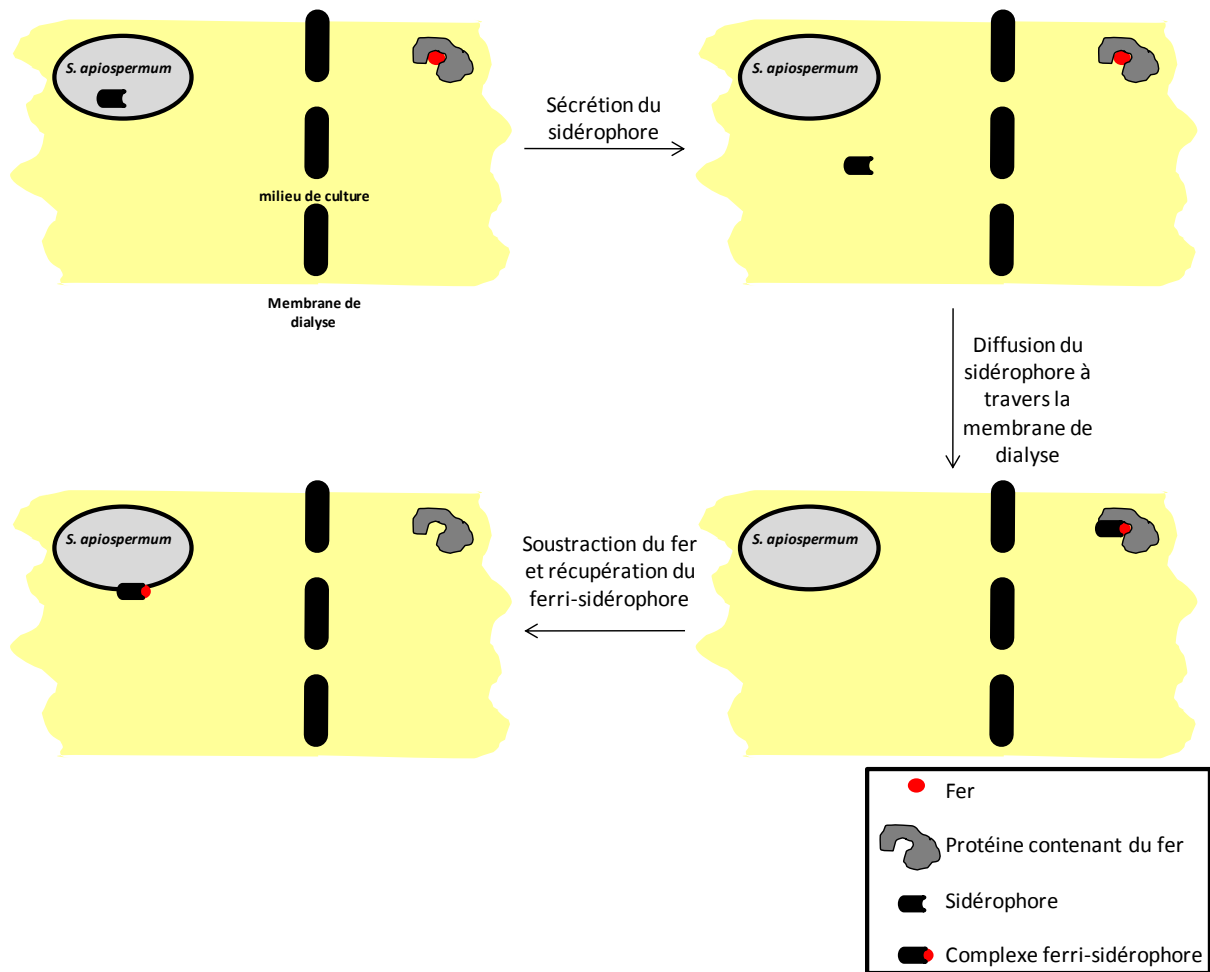


Figure 53 : Mécanisme de soustraction du fer à une protéine d'hôte par *S. apiospermum* à travers la membrane de dialyse.

Dans le cas de la ferritine, une diminution du fer contenu dans le boudin de dialyse après 7 jours d'incubation a été observée, démontrant que le fer contenu dans la ferritine peut être détourné par les sidérophores. Le phénomène est connu pour des sidérophores bactériens tels que les desferriferrichromes, et l'entérobactine [80]. Curieusement, une augmentation en fer est constatée à 14 jours d'incubation, vraisemblablement due à des phénomènes de lyse des cellules fongiques déjà mentionnés.

Scedosporium apiospermum semble donc capable de détourner le fer à partir de protéines d'hôte liées au métabolisme du fer. Ce n'est pas le cas pour tous les microorganismes, même pathogènes, produisant des sidérophores. Par exemple, *P. aeruginosa* doit au préalable dégrader la transferrine à l'aide d'une protéase pour ensuite récupérer le fer [82]. D'autres microorganismes se voient incapables de soustraire le fer de la ferritine avec leurs sidérophores [223].

Dans le cadre de la mucoviscidose, la présence de protéines riches en fer dans les sécrétions broncho-pulmonaires rend d'autant favorable l'implantation de pathogènes sécrétant des sidérophores capables de récupérer le fer de l'hôte [8, 220, 224]. Cette capacité pourrait expliquer que *S. apiospermum* fasse partie des pathogènes fongiques les plus fréquemment rencontrés chez les patients atteints de mucoviscidose.

En conclusion, nous avons montré la capacité de *S. apiospermum* à soustraire le fer de protéines d'hôte telles que transferrine ou ferritine. Cette observation renforce l'idée que les sidérophores peuvent être considérés comme des facteurs de virulence contribuant à la colonisation et à l'invasion pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose par ce champignon.

Étant donné que les sidérophores peuvent être considérés comme des facteurs de virulence, il s'est avéré intéressant de connaître leur sécrétion chez diverses souches de *S. apiospermum*. L'étude a été étendue à une trentaine de souches de *Pseudallescheria/Scedosporium* qui comprenait 20 isolats cliniques dont 9 issus d'un contexte de mucoviscidose et 10 souches d'origine environnementale. Un contrôle de la production sur milieu gélosé CAS a montré une grande variabilité dans la production de sidérophores chez les souches (Figure 54).

L'analyse statistique des résultats a montré que les isolats cliniques issus de patients mucoviscidosiques produisaient moins de sidérophores que les autres isolats cliniques ; les isolats de ces malades étant moins producteurs que les autres. De même, il semblerait que la production de sidérophores soit plus importante chez les isolats cliniques comparée à celle des souches environnementales, et cela en particulier pour les isolats provenant d'autres pathologies que la mucoviscidose.

Une quantification de ces molécules a été entreprise en milieu liquide sur 10 souches de *S. apiospermum* à un pH de 7 [213]. Après analyse par RP-CLHP-Visible, l'acide dimérique n'a été retrouvé que chez deux souches (un isolat clinique dans un contexte de mucoviscidose et une souche environnementale) tandis que le N^α-méthyl coprogène B a été détecté chez toutes les souches (Figure 55). En comparant la production de ce sidérophore avec l'origine des souches, il ressort que les isolats cliniques à tropisme respiratoire (IHEM 14263, 14451, 14268, 14462 et 15155) produisent davantage que les souches environnementales

(IHEM 13947, 20812 et 20828) et que parmi les isolats cliniques, ceux issus d'un contexte de mucoviscidose (IHEM 14263, 14451, 14268 et 14462) semblent les plus forts producteurs de N^α-méthyl coprogène B.

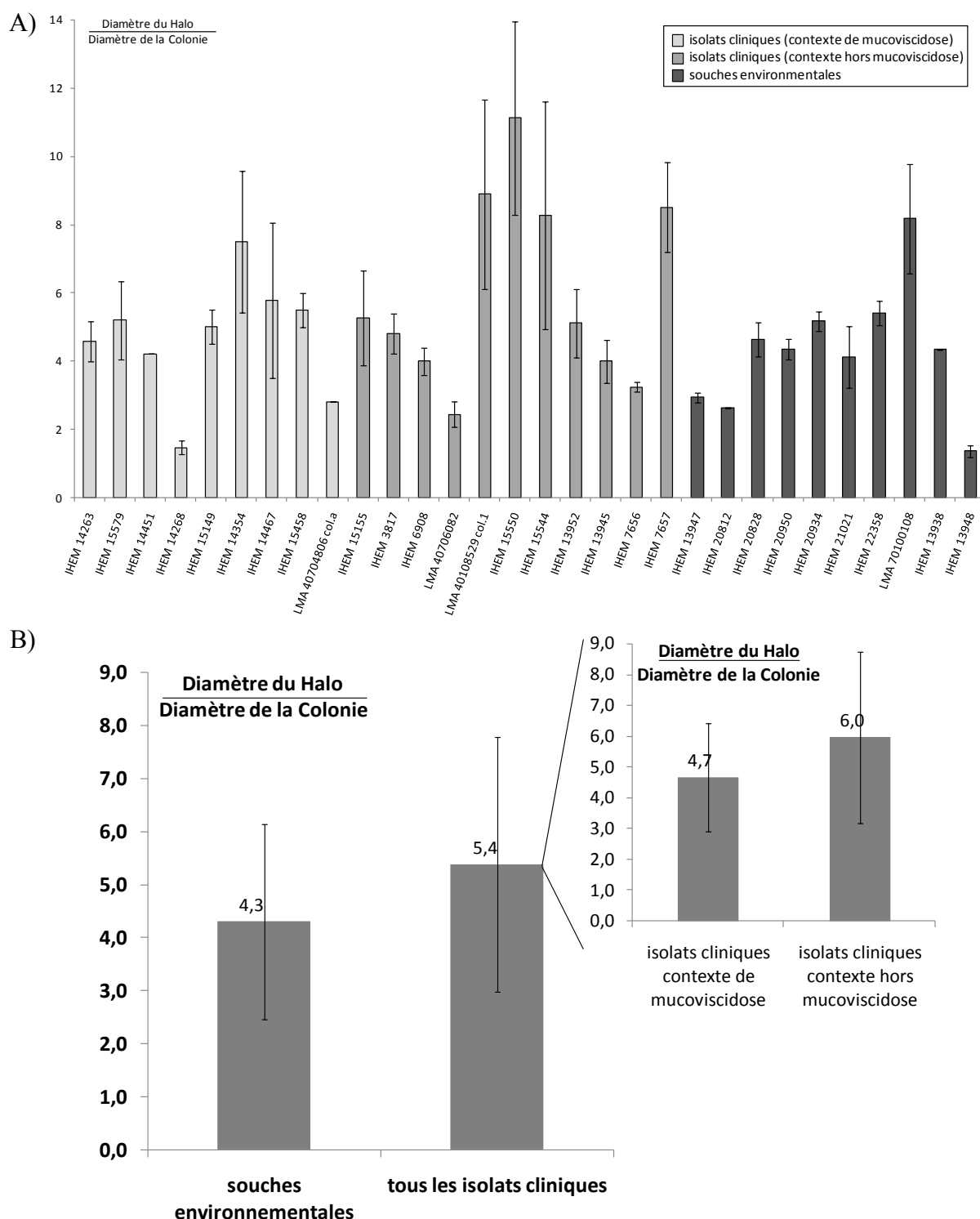


Figure 54 : Production de sidérophores par *S. apiospermum* sur milieu gélosé CAS :
A) par isolat clinique ou souche, B) par regroupement des souches en fonction de leur
origine

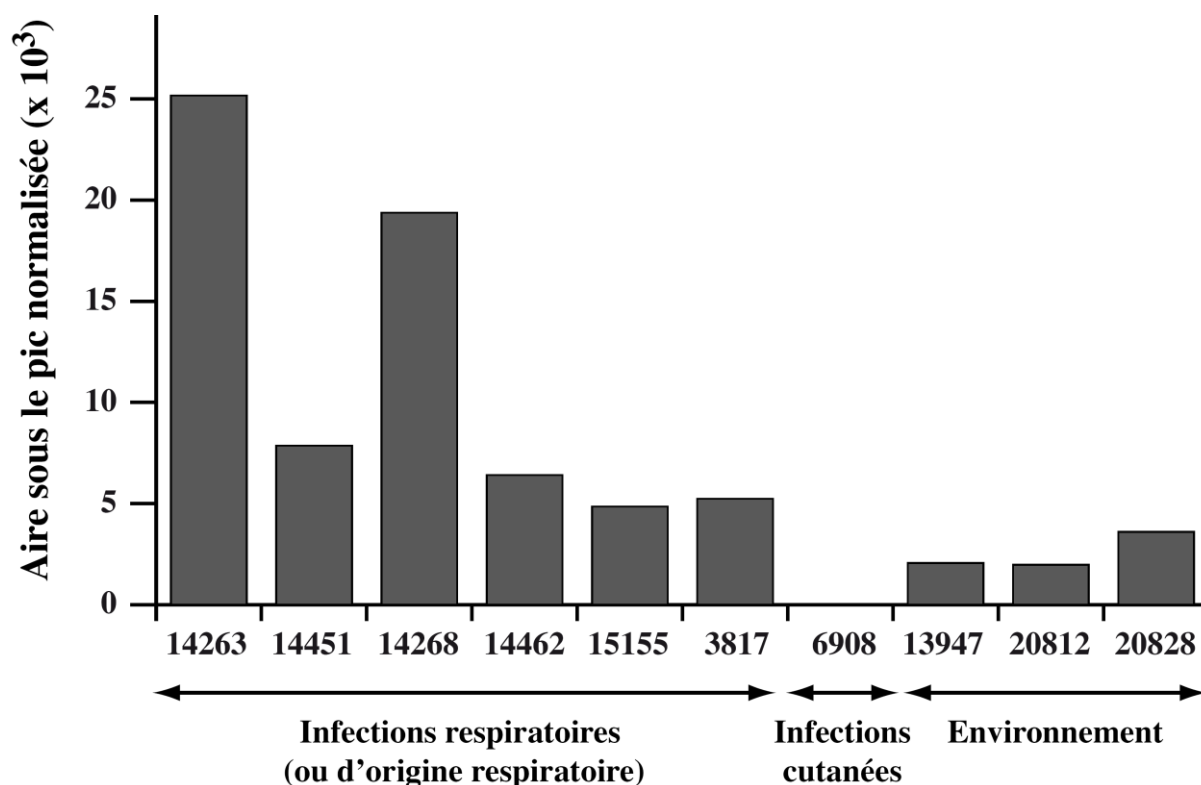


Figure 55 : Quantification de la production en N^α-méthyl coprogène B de 10 souches de *S. apiospermum*

Concernant l'isolat IHEM 3817, celui-ci a été identifié à partir d'un liquide céphalo-rachidien. Ce dernier isolat provient vraisemblablement d'une colonisation pulmonaire et peut donc être intégré dans les isolats à infections respiratoires. En effet diverses publications [40, 41] ont rapporté des cas de scédosporioses cérébrales résultant d'une extension de l'infection à partir d'un foyer pulmonaire. En particulier, un cas clinique de scédosporiose disséminée est apparu suite à une transplantation pulmonaire chez une femme atteinte de mucoviscidose et colonisée par *S. apiospermum* de façon chronique [40]. Quant à l'isolat IHEM 6908 d'origine cutanée, celui-ci résulte d'une inoculation traumatique au niveau cutané d'une souche environnementale et peut donc raisonnablement être rapproché de ce groupe.

Il est intéressant de noter que lors d'une étude sur l'écologie et la physiologie des champignons appartenant au genre *Scedosporium*, les auteurs ont opéré des regroupements similaires entre souches environnementales et isolats d'origine pulmonaire à partir d'autres critères que ceux utilisés dans notre étude [225].

Notre étude conforte l'idée que les sidérophores constituent des facteurs de virulence nécessaires à l'installation des agents pathogènes chez l'hôte comme cela a été rapporté chez d'autres champignons filamenteux tels qu'*A. fumigatus* [9, 65, 85].

Dans le cadre de la mucoviscidose, des études récentes ont montré que la présence de fer dans les poumons rendait le patient plus sensible aux infections [8, 224], et en que ce fer contribuerait à la résistance de certains pathogènes vis-à-vis des traitements anti-infectieux [220].

En conclusion, une production plus importante en sidérophores par les isolats cliniques de *S. apiospermum* par rapport aux souches environnementales suggère que ces molécules constituent des facteurs de virulence participant à la colonisation des voies respiratoires, en particulier chez des patients atteints de mucoviscidose.

Dans le but de simplifier le protocole d'isolement et d'identification des sidérophores de *S. apiospermum* à partir du milieu de culture, la méthode d'extraction liquide/liquide a été remplacée par une méthode d'extraction sur la résine Amberlite XAD-4. Ainsi, la quantité d'acide diméthumique extrait a été multipliée par 2 avec un facteur d'enrichissement multiplié par 7. Préalablement à l'extraction par cette méthode, une étude des paramètres a été réalisée selon un plan d'expérience intégrant 7 paramètres. Ces paramètres peuvent être classés en trois catégories :

- *influence des conditions de culture* : pH et composition du milieu de culture,
- *influence de la structure du sidérophore extrait* : sidérophore de type phénol/catéchol ou hydroxamate, libre ou complexé avec le fer,
- *influence des conditions d'extraction* : précipitation des protéines et temps d'incubation, agitation et temps d'incubation de l'extraction.

Les résultats du plan d'expérience ont démontré que la composition du milieu de culture ne modifiait pas l'extraction des sidérophores par la résine Amberlite XAD-4. Au contraire, le pH du milieu de culture semble avoir une grande importance sur le rendement de l'extraction. Pour les sidérophores étudiés (DFB et 2,3DHB) plusieurs degrés de protonation peuvent exister (Figure 56). Certaines molécules, suivant leur degré de protonation, n'ont pas la même affinité pour la résine. Le changement de pH du milieu avant extraction peut permettre d'augmenter son rendement en modifiant l'ionisation des molécules en un état qui serait le plus favorable pour leur extraction. L'ajout de fer ferrique influence défavorablement l'extraction. Le fer va former des complexes avec les sidérophores et provoquer des changements structuraux et de polarité. De même, la structure de la molécule influence

beaucoup son extraction par la résine : le 2,3DHB semble avoir été moins bien fixé sur la résine Amberlite XAD-4 que la DFB.

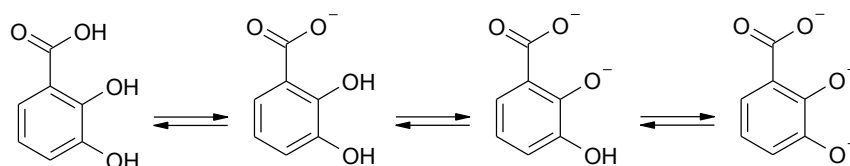


Figure 56 : Degrés de protonation de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque

D'après la bibliographie, la résine Amberlite XAD-4 est efficace pour l'extraction d'un certain nombre de sidérophores tels que pétrobactine, bacillibactine [182] et chrysobactine [198] (Figure 57). Afin de valider les résultats du plan d'expérience, une étude de l'influence du fer sur l'extraction non pas des sidérophores témoins mais des sidérophores produits par *S. apiospermum* a été menée. Les résultats ont été différents de ceux obtenus avec les sidérophores témoins. La présence de fer a amélioré l'extraction. Ainsi, les complexes ferri-sidérophores du N^α-méthyl coprogène B et de l'acide dimérumique ont été deux à trois fois plus extraits qu'à l'état non complexé.

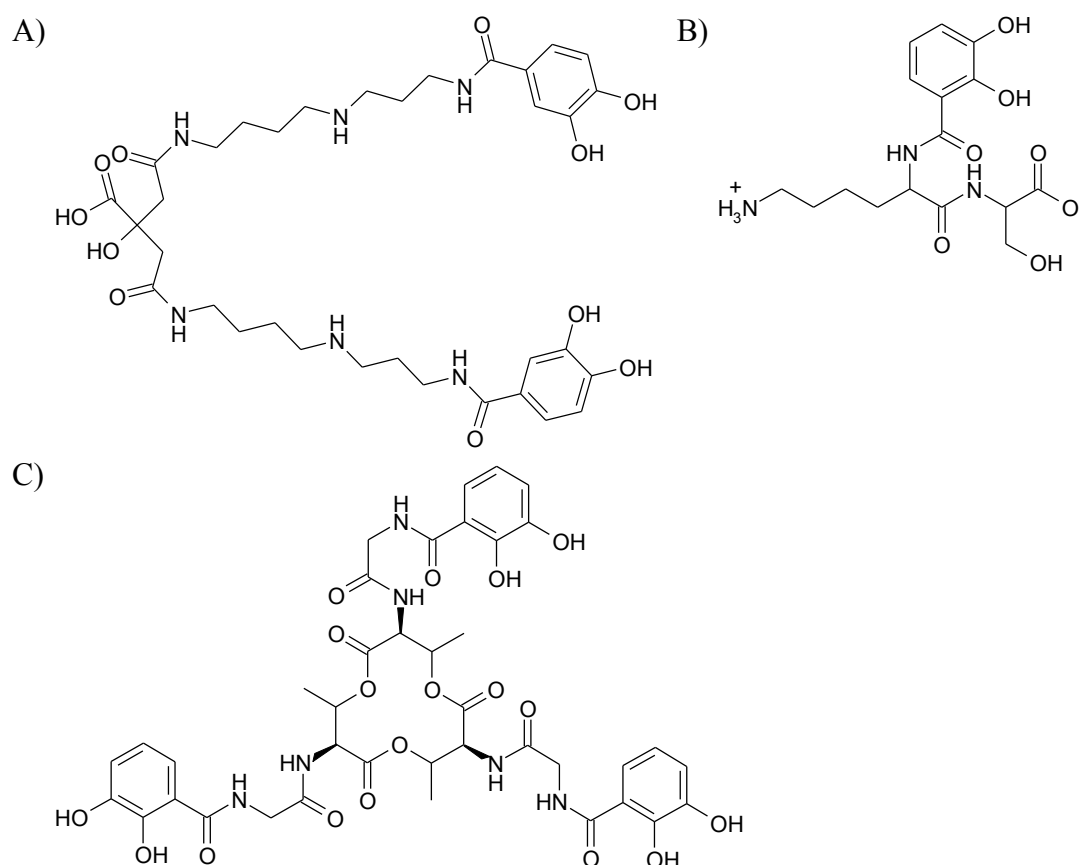


Figure 57 : Structures des sidérophores extraits par la résine Amberlite XAD-4 ;

A) pétrobactine, B) chrysobactine, C) bacillibactine [69, 182]

Concernant les conditions d'extraction, la précipitation par le sulfate d'ammonium des protéines du milieu de culture du champignon semble être un élément favorable, à condition que la durée de précipitation soit limitée. En effet, la présence de ce sel permet d'augmenter la force ionique du milieu, ce qui va aider les sidérophores à être adsorbés sur la résine. La présence de sel va entraîner une précipitation des protéines. Le temps de précipitation ne doit pas être trop long, au risque d'entraîner les sidérophores avec les protéines qui seront éliminées par filtration. Un temps d'incubation d'une heure sera préféré à celui de 17 heures.

Le temps de contact avec la résine et l'agitation sont des paramètres interdépendants. Dans notre cas, l'agitation et le temps de contact de 17 h du milieu de culture avec la résine auront un effet positif sur l'extraction.

En résumé, d'après le plan d'expérience réalisé pour améliorer l'extraction des sidérophores par la résine Amberlite XAD-4, il s'avère que la composition du milieu de culture n'a que peu d'influence sur le rendement de l'extraction, et qu'un pH de 8, ainsi que l'absence de fer dans le milieu soient favorables à un bon rendement d'extraction générale des sidérophores. En outre, cette extraction doit s'effectuer après ajout dans le filtrat de culture de sulfate d'ammonium à 80% de saturation suivi d'une incubation sous agitation pendant une heure. Par contre, l'efficacité de l'extraction est très dépendante de la structure du sidérophore et ces résultats sont limités au modèle utilisé, ici représenté par la DFB et le 2,3DHB. Dans le cas du N^α-méthyl coprogène B et de l'acide dimérumique produit par *S. apiospermum*, l'ajout de fer avant extraction a permis une meilleure extraction par la résine Amberlite XAD-4 des ferri-sidérophores.

Dans le cadre de la mucoviscidose, le diagnostic d'une infection à *S. apiospermum* n'est pas toujours aisé. Actuellement, le nombre de méthodes de diagnostic est limité et celles-ci exigent beaucoup de temps pour aboutir au résultat [3]. Elles consistent en :

- un examen mycologique des expectorations, après ensemencement sur des milieux gélosés semi-sélectifs et l'attente des résultats peut aller jusqu'à 3 semaines en fonction de la croissance des champignons,
- une analyse sérologique après une prise de sang chez le patient qui pourra attester des infections avérées et non des colonisations.

Une méthode plus précoce de détection permettrait la mise en place rapide d'un traitement. Ainsi, la détection des sidérophores sécrétés dans les débuts de la colonisation de l'hôte par *S. apiospermum* pourrait constituer une méthode de diagnostic précoce. Une analyse sérologique effectuée plus tardivement, viendra confirmer le diagnostic.

Le problème qui se pose est de disposer de marqueurs biologiques qui soient spécifiques de l'espèce fongique à diagnostiquer. Or, bon nombre de pathogènes bactériens ou fongiques peuvent être responsables d'infections respiratoires, pour lesquels bon nombre de sidérophores ont été identifiés. D'après la bibliographie, divers sidérophores ont été répertoriés chez les microorganismes pathogènes des voies respiratoires (Tableau 16). Certains sidérophores semblent spécifiques de ces microorganismes (Figure 58).

Tableau 16 : Microorganismes responsables d'infections respiratoires dans la mucoviscidose et leurs sidérophores

	Microorganismes	Sidérophores associés
Bactéries	<i>S. aureus</i> [87, 111, 226-228]	staphyloferrine A
		staphyloferrine B
		auréochéline
	<i>H. influenzae</i> [223]	hydroxamate
	<i>S. pneumoniae</i>	ND
Champignons	<i>P. aeruginosa</i> [82, 86, 202, 229, 230]	pyochéline
		les pyoverdines
	<i>C. albicans</i> [231]	aucun sidérophore
	<i>A. fumigatus</i> [65, 69, 168, 232, 233]	<i>N,N',N''</i> -triacétylfusarinine C
		ferricrocine
	<i>A. terreus</i> [69, 232]	ferrichrysine
	<i>C. parapsilosis</i>	hydroxamate
	<i>C. glabrata</i>	hydroxamate
	<i>A. flavus</i> [158]	hydroxamate
	<i>A. nidulans</i> [69, 234]	ferrichrome
		ferricrocine
		coprogène
		<i>N,N',N''</i> -triacétylfusarinine C
	<i>E. dermatitidis</i>	ND

ND : non déterminé

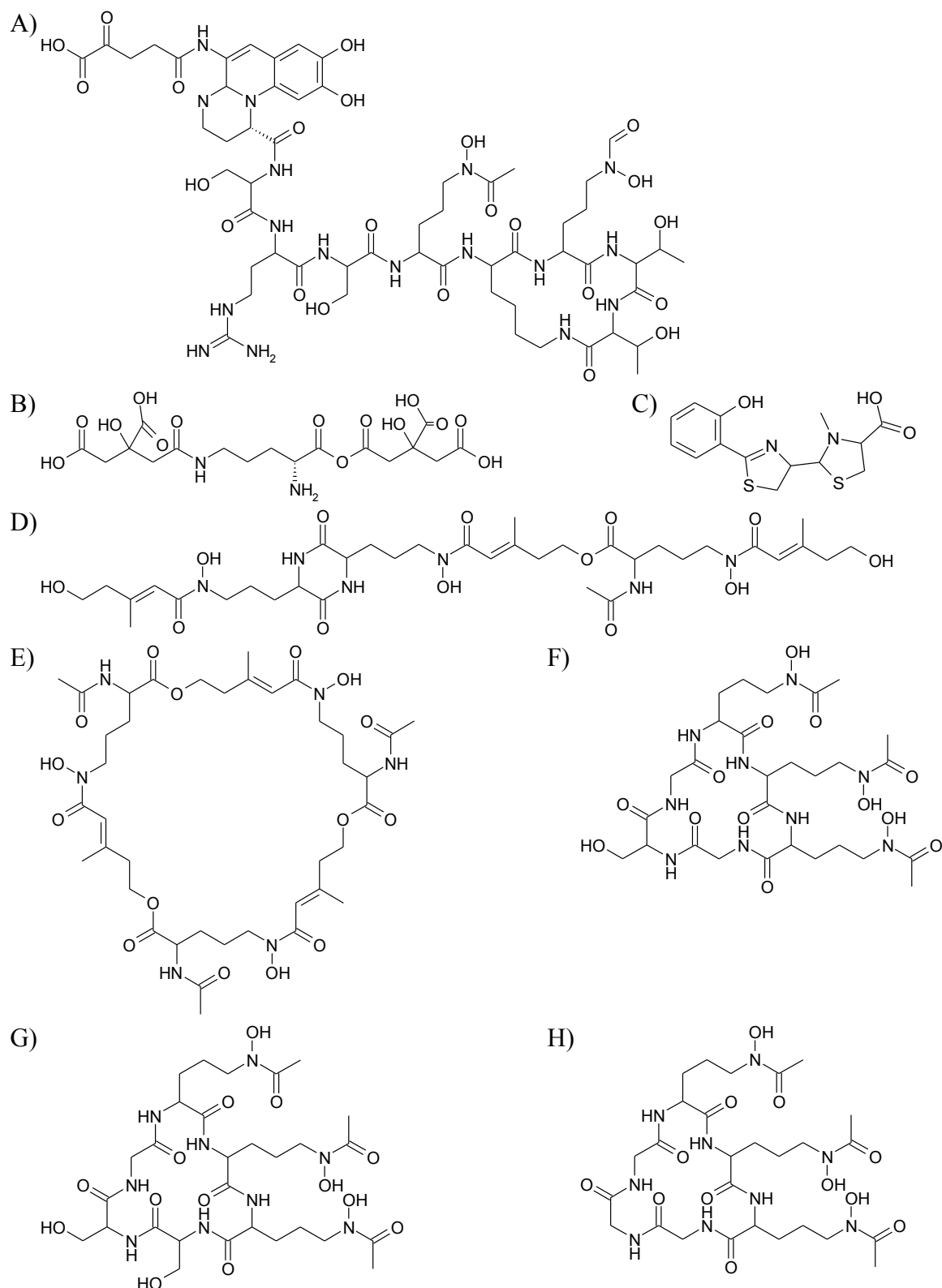


Figure 58 : Structure des sidérophores sécrétés par les microorganismes responsables d'infections respiratoires dans la mucoviscidose ; A) les pyoverdines, B) staphyloferrine A, C) pyochéline, D) coprogène, E) *N,N',N''*-triacétylfusarinine C, F) ferricrocine, G) ferrichrysine, H) ferrichrome

Le protocole d'étude des sidérophores par utilisation de la résine Amberlite XAD-4 a été appliqué à divers champignons responsables d'infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. Au préalable, la production de sidérophores a été contrôlée sur milieu gélosé CAS. Les résultats ont montré qu'*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *E. dermatitidis* et *S. aurantiacum* sont capables de produire des sidérophores. Après culture en milieu liquide, les sidérophores de ces champignons ont été extraits par la résine Amberlite XAD-4, puis analysés par CLHP. Les résultats obtenus ont montré que, pour l'ensemble des espèces fongiques étudiées, des pics correspondant à des sidérophores ont été détectés, à l'exception d'*E. dermatitidis*. Chaque espèce fongique s'est révélée présenter des pics différents.

Cependant, il faut noter que les résultats obtenus pour *A. flavus* suggèrent un sidérophore de même masse molaire ($t_r = 7,9$ min, $m/z = 801$) que celle de la ferrichrysine détecté chez *A. terreus* [232]. De la même façon, l'analyse des chromatogrammes pour *A. terreus* montrent trois pics correspondant à des sidérophores de masses connues qui sont l'acide dimérumique ($t_r = 3,9$ min, $m/z = 538$), la ferrichrysine ($t_r = 7,9$ min, $m/z = 801,1$) et le coprogène ($t_r = 8,5$ min, $m/z = 822,2$). Pour *A. fumigatus* un sidérophore a été identifié : la *N,N,N'*-triacétylfusarinine C ($t_r = 11,7$ min, $m/z = 907,2$). Dans le cas de *S. aurantiacum*, le N^α -méthyl coprogène B a été détecté dans le milieu de culture ($t_r = 6$ min, $m/z = 793,9$).

Ainsi une différenciation des espèces fongiques pourrait s'effectuer sur la base d'une identification des sidérophores qui constitueraient ainsi de bons marqueurs d'espèces. Dans le cas des microorganismes capable de coloniser les voies respiratoires de patients atteints de la mucoviscidose, la production du N^α -méthyl coprogène B est spécifiques du complexe d'espèce *S. apiospermum* et non de l'espèce *S. apiospermum sensus stricto*. L'acide dimérumique lui n'est pas spécifique de l'espèce fongique étudié. Ce sidérophore étant présent dans la structure de beaucoup des sidérophores de type coprogène [5, 69], il se retrouve produit par un grand nombre d'espèces fongiques [5, 129, 172].

L'utilisation du protocole optimisé d'extraction des sidérophores sur résine Amberlite XAD-4 a permis d'identifier les sidérophores produits par des champignons appartenant au genre *Aspergillus* dont les isolats cliniques sont issus de patients atteints de mucoviscidose. Ainsi la ferrichrysine a été détectée chez *A. flavus*, l'acide dimérumique, la ferrichrysine et le coprogène chez *A. terreus*, la

N,N',N''*-triacétylfusarinine C chez *A. fumigatus* et le N^α -méthyl coprogène B chez *S. aurantiacum*. Ainsi le N^α -méthyl coprogène B est un marqueur spécifiques du complexe d'espèce *S. apiospermum

Notre étude a montré que les sidérophores détectés chez plusieurs champignons filamenteux responsables d'infections respiratoires chez des patients atteints de mucoviscidose étaient différents et pourraient constituer des marqueurs spécifiques d'espèces pouvant servir au diagnostic. l'analyse du milieu complexe que constitue une expectoration est source de bon nombre de composés. Des analyses ont déjà été faites et diverses substances ont été détectées (Figure 59) telles que les *N*-acylhomosérine lactones [235], les leucotriènes [236], les pyoverdines [216] et les mycoliates de 6,7-diméthoxycoumarine [237].

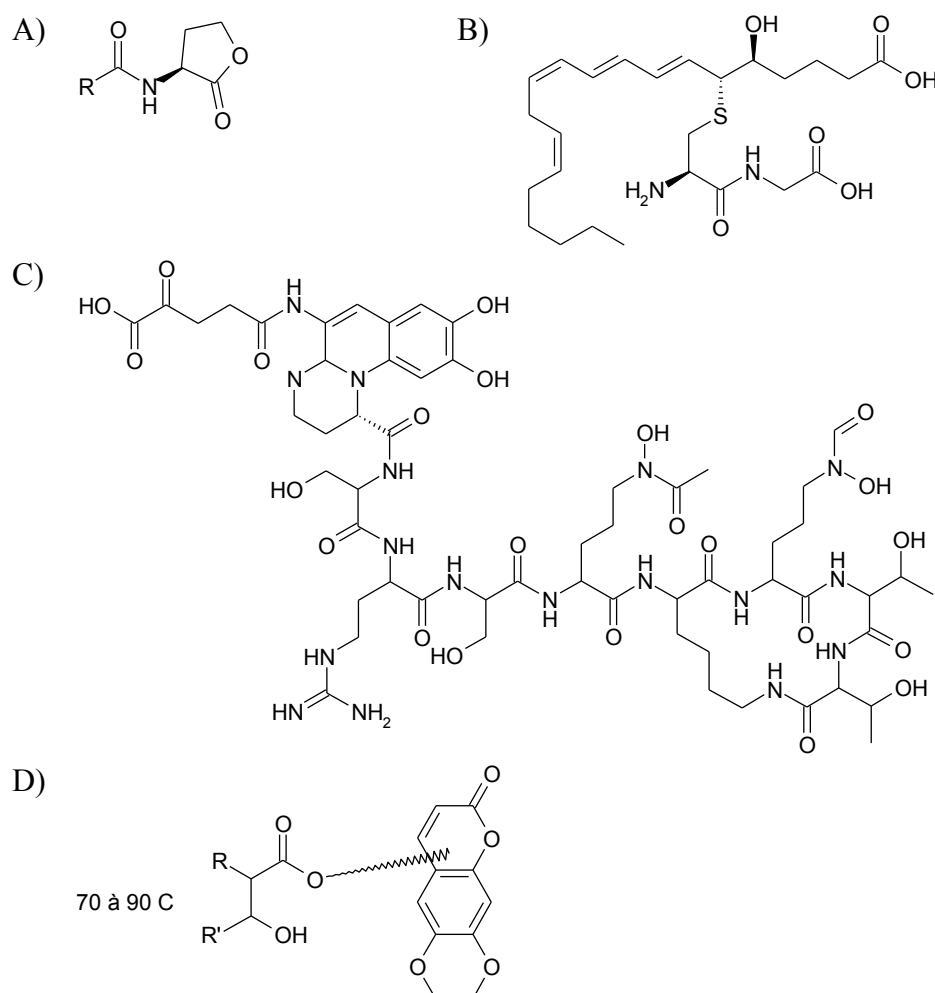


Figure 59 : Structures chimiques de molécules détectées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose ; A) *N*-acylhomosérine lactones [235], B) leucotriène D4 [238], C) pyoverdine [229], D) mycoliate de 6,7-diméthoxycoumarine [237]

Parmi ces molécules détectées dans des expectorations de personnes ayant la mucoviscidose, des sidérophores du type pyoverdine, sécrétés par *P. aeruginosa*, ont été détectés [216]. Les leucotriènes ont été isolés selon une méthode proche de celle employée, sur résine Amberlite XAD-8 [236].

Notre méthode d'extraction a été également appliquée aux expectorations de patients atteints de mucoviscidose et présentant une infection respiratoire à *S. apiospermum*. Une analyse mycologique de ces expectorations a permis de confirmer la présence de *S. apiospermum*, pour trois d'entre elles deux autres espèces étaient aussi présentes : *A. fumigatus* et *C. albicans*. Parmi les 5 expectorations analysées, 3 ont montré la présence des sidérophores caractéristiques de *S. apiospermum* après analyse RP-CLHP. La présence de plusieurs espèces fongiques dans certaines expectorations n'a pas interféré dans la détection des sidérophores de *S. apiospermum*. De plus, aucun autre agent pathogène retrouvé dans le contexte de la mucoviscidose, ne présente les mêmes sidérophores. La détection des masses de ces sidérophores par ESI-+MS (Tableau 17) pourrait être utile dans la recherche de *S. apiospermum* dans des expectorations. Ceci pourrait constituer une nouvelle méthode de diagnostic plus précoce et plus rapide car le temps d'analyse se réduit à une journée au lieu de 5.

Tableau 17 : Masses molaires de différents sidérophores produits par des microorganismes responsables d'infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose

Sidérophores	M (g/mol)	m/z des complexes avec le fer
acide dimérumique	484	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=538$
auréochéline [226]		$m/z=577$
coprogène [230]	768	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=822$
ferrichrome [230]	687	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=741$
ferrichrysine	747	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=801^*$
ferricrocine	718	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=799^*$
N^α-méthyl coprogène B	740	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=794$
N,N',N''-triacétylfusarinine C	853	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=907$
pyochéline [230]	324	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=378$
pyoverdines [69, 202]	989 à 1552	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=1043 \text{ à } 1606^*$
staphyloferrin A	480	$[M-3H+Fe(III)+H]^+ : m/z=534^*$
staphyloferrin B [239]	448	$[M + H]^+ : m/z=449$

* masses calculées

Cette méthode de diagnostic pourrait être étendue à la recherche de sidérophores spécifiques d'un agent pathogène impliqué dans une infection respiratoire, bien au-delà du

contexte de la mucoviscidose. Dans cette optique, des améliorations doivent être apportées, comme par exemple, l'utilisation de résines d'extraction type SPE, de résines C₁₈ [202] ou XAD qui permettraient de réduire le temps d'analyse. Ceci a été réalisé pour la détection de sidérophores directement dans l'eau de mer [201].

La détection des sidérophores de *S. apiospermum* directement dans les expectorations de malades colonisés au niveau respiratoire et atteints par la mucoviscidose présente un intérêt de diagnostic précoce. En outre, l'analyse s'avère spécifique car les sidérophores de *S. apiospermum* ont bien été identifiés dans des expectorations présentant un ou plusieurs pathogènes fongiques. Ces résultats permettent d'envisager une nouvelle méthode de diagnostic rapide des microorganismes pathogènes de la sphère respiratoire *via* la détection de leurs sidérophores spécifiques.

V. Conclusion :

Dans cette étude des mécanismes d'acquisition du fer chez *S. apiospermum*, nous avons montré la capacité de ce champignon filamenteux à capter le fer présent dans les poumons à partir des protéines d'hôte telles que ferritine et transferrine. Pour ce faire, *S. apiospermum* produit des sidérophores capables de chélater le fer dans son environnement, favorisant ainsi son implantation dans les poumons du malade.

L'identification de ces sidérophores a été effectuée, après avoir incubé *S. apiospermum* dans des conditions optimales de production qui sont : 3 jours d'incubation sans agitation à 37°C, milieu de culture déplété en fer à pH 8, concentration en fer est inférieure à 0,1 µM. Par HPLC-UV/MSⁿ, deux sidérophores ont été identifiés l'acide dimérumique et le N^α-méthyl coprogène B. De plus, la production du N^α-méthyl coprogène B est plus importante pour les souches d'origine pulmonaire comparée aux souches d'origine environnementale.

L'utilisation d'un protocole optimisé d'extraction des sidérophores sur résine Amberlite XAD-4 a permis d'étendre l'étude à d'autres champignons impliqués dans la mucoviscidose. Chez les champignons appartenant au genre *Aspergillus*, d'autres sidérophores ont été identifiés : la ferrichrysine pour *A. flavus*, l'acide dimérumique, la ferrichrysine et le coprogène pour *A. terreus* et la N,N',N''-triacylfusarinine C chez *A. fumigatus*. La détection des sidérophores spécifiques du complexe d'espèces *S. apiospermum* directement dans les

crachats de patients permet d'envisager une méthode de diagnostic précoce de la présence de ce pathogène dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose.

Chapitre 3 :

La synthèse de sidérophores

I. Généralités sur la synthèse de sidérophores de type hydroxamate

S. apiospermum a montré la production de deux sidérophores de type hydroxamate que sont l'acide dimérumique et le N^α-méthyl coprogène B. Dans le but de mieux comprendre les propriétés physico-chimiques de ces ligands spécifiques du fer III [240], d'envisager l'étude de l'impact de ces molécules sur l'hôte, et d'utiliser ces molécules comme vecteur d'antifongiques [92], leur synthèse a été entreprise.

Une étude bibliographique sur la biosynthèse et la synthèse des sidérophores de type coprogène permet de mieux cerner la problématique d'obtention de ces molécules. D'autres synthèses de sidérophores de type hydroxamate ont été décrites dans la littérature [241-244].

I.1. Biosynthèse des sidérophores de type coprogène

Les coprogènes sont constitués de différents agencements de la structure de base *N*-acyl-*N*-hydroxyornithine, pouvant former plusieurs types de structures linéaires ou cycliques [5, 69].

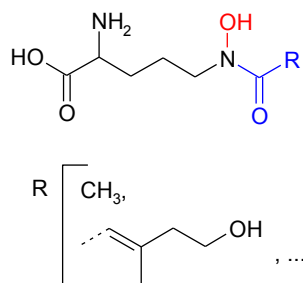


Figure 60 : Structure des *N*-acyl-*N*-hydroxyornithine

La biosynthèse de la partie *N*-acyl-*N*-hydroxyornithine débute par l'oxydation de l'ornithine *via* une hydroxylase formant la *N*-hydroxyornithine (Figure 60). Une *N*-acylation enzymatique permet d'obtenir ensuite la *N*-acyl-*N*-hydroxyornithine correspondante [245]. Une fois cette structure de base achevée, des enzymes se chargeront de la formation du sidérophore.

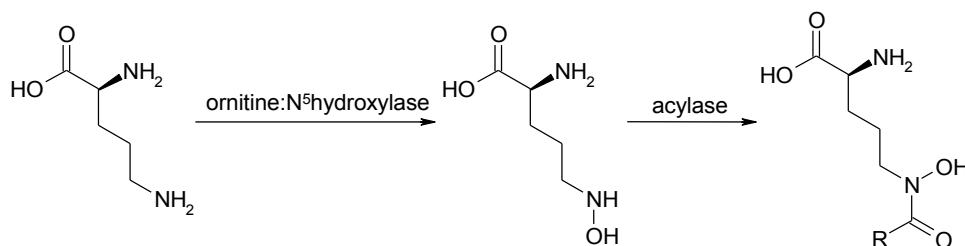


Figure 61 : Biosynthèse des *N*-acyl-*N*-hydroxyornithine [245]

Dans le cas de l'acide dimérumique et du méthyl coprogène B, l'acylation est réalisée sur le stéréoisomère E de l'acide 5-hydroxy-3-méthylpent-2-énoïque. Anke et Diekmann ont montré que, chez un champignon phytopathogène *Fusarium cubense*, l'acide est obtenu par déshydratation de l'acide mévalonique (Figure 62) et non par la réduction de l'acide β -méthylglutaconique [246]. L'acide mévalonique peut être obtenu à partir de la L-leucine. Le stéréoisomère Z de l'acide 5-hydroxy-3-méthylpent-2-énoïque est obtenu par la même voie, mais la deshydratase mise en jeu lors de la dernière étape est différente.

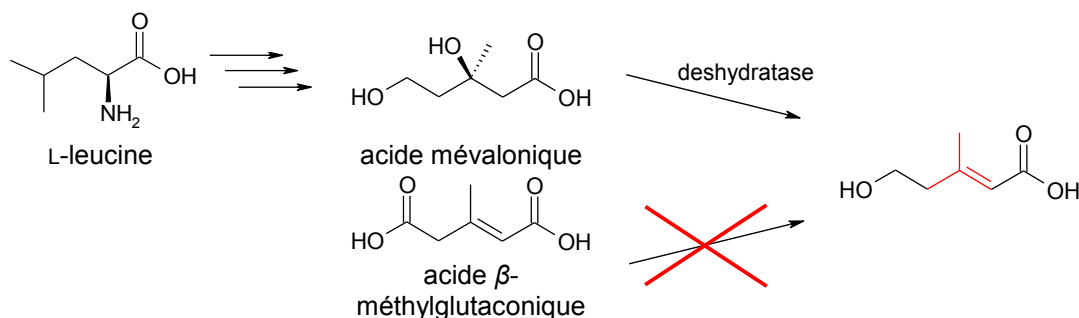


Figure 62 : Biosynthèse de l'acide (2E) 5-hydroxy-3-méthylpent-2-énoïque [246]

I.2. Exemple de synthèse de sidérophores de type coprogène

Dans notre travail, l'acide dimérumique ainsi que le méthyl coprogène B, deux sidérophores de la famille des coprogènes ont été isolés chez *S. apiospermum*. La synthèse de l'acide dimérumique a déjà été publiée [247], de même que d'autres synthèses de sidérophores de type hydroxamate.

I.2.1. Synthèse de l'acide dimérumique

En 1974, les travaux de Widmer et coll. [247, 248] ont permis de réaliser la synthèse de l'acide dimérumique. Ils consistent en deux grandes étapes : la formation de l'acide deshydroxymevalonique (Figure 63) et du cycle dioxopiperazinique (Figure 65). A notre connaissance, il s'agit de la seule synthèse publiée de ce sidérophore.

Les fonctions hydroxylamines terminales sont obtenues par réduction directe des groupements nitro de **7** en présence de palladium. Le rendement global obtenu est faible à cause de l'étape limitante de la réaction de déshydratation de l'ester **1** qui abouti à la formation de plusieurs alcènes (Figure 64).

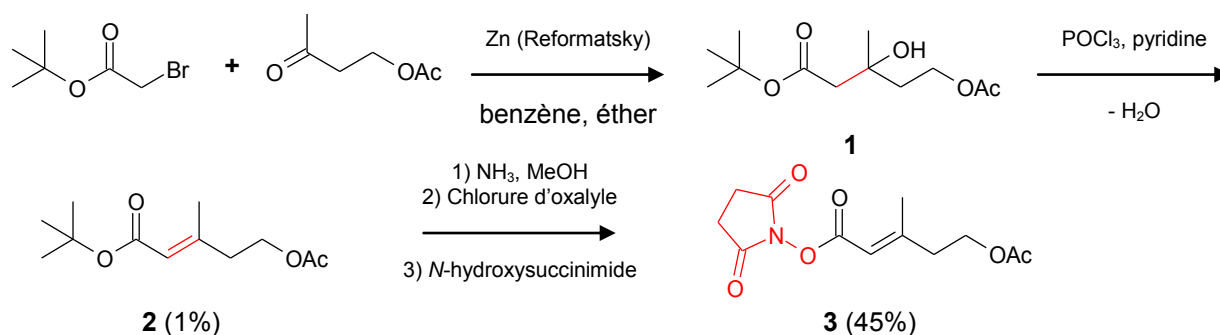


Figure 63 : Synthèse de l'acétate de (3E)-5-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-3-méthyl-5-oxopent-3-en-1-yl (3**) par Widmer et coll. [247]**

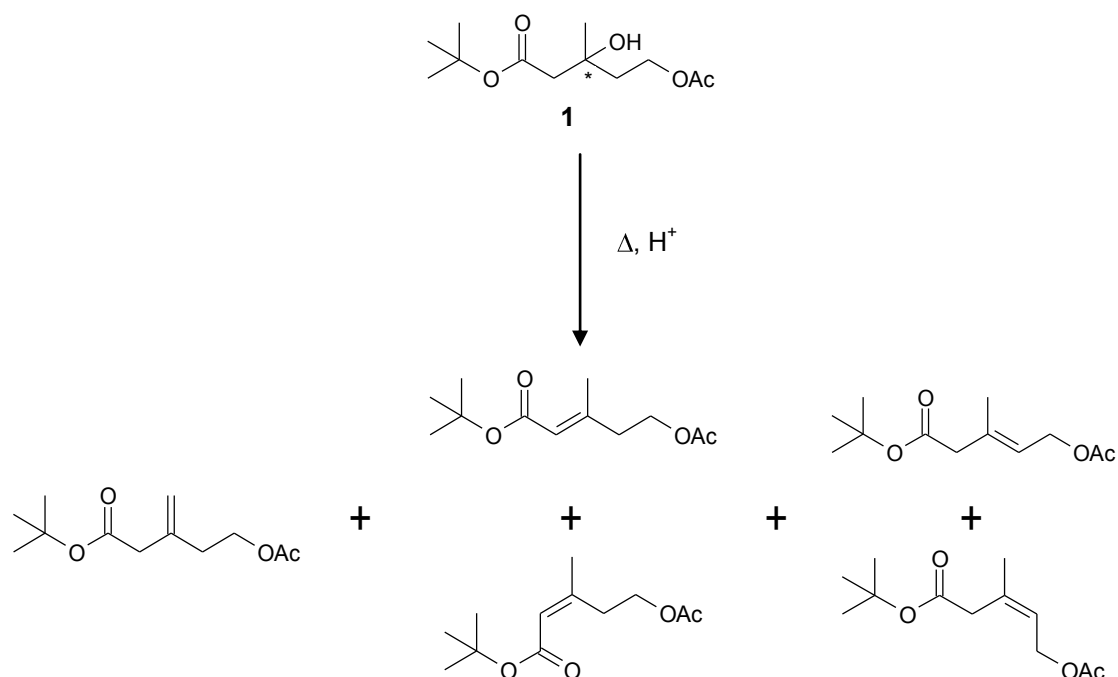


Figure 64 : Réaction de déshydratation du 5-acétoxy-3-hydroxy-3-méthylpentanoate de *t*-butyle

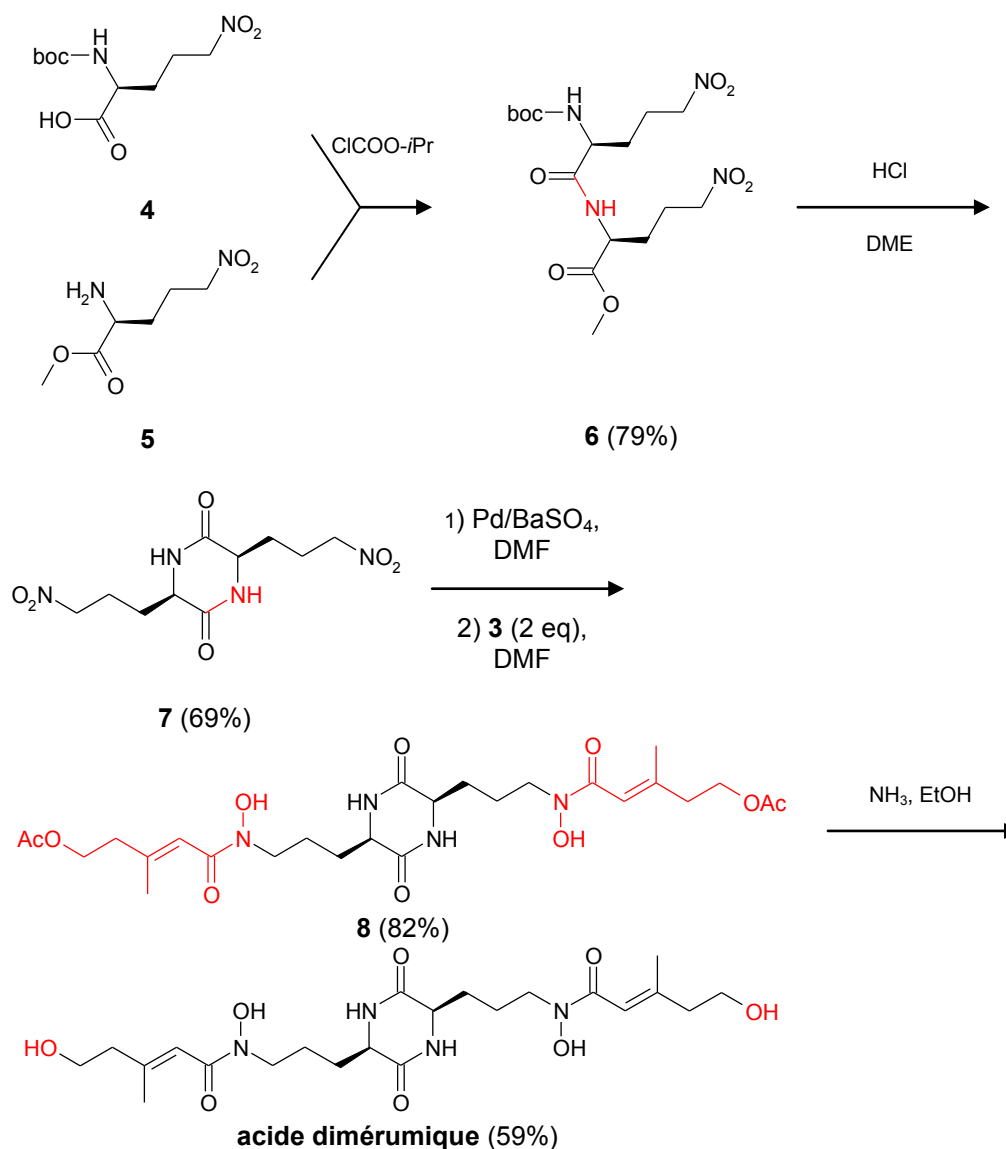


Figure 65 : Synthèse de l'acide dimérique par Widmer et coll. [247, 248]

I.2.2. Synthèse de l'acide rhodotorulique

L'acide rhodotorulique (Figure 66) est sécrété par des levures, et en particulier *Rhodotorula pilimanae* [249]. Il est constitué d'un cycle 2,5-dioxopipérazinique qui possède deux carbones asymétriques en position 3 et 6.

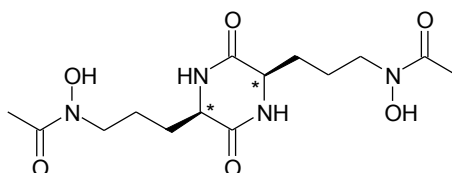


Figure 66 : Structure de l'acide rhodotorulique

La première synthèse de l'acide rhodotorulique, publiée en 1972 [250-252] (Figure 68), avait l'inconvénient d'aboutir à la formation de quatre diastéréoisomères, car la configuration des deux carbones asymétriques de la molécule n'était pas définie. La fonction principale hydroxamate est obtenue par substitution nucléophile d'un atome de brome du 1,3-dibromopropane par l'hydroxylamine **10** conduisant à la molécule **13**, suivie par une acétylation permettant d'obtenir l'hydroxamate **19**. Dans cette stratégie, le cycle dioxopipérazinique est obtenu en fin de synthèse contrairement à la méthode employée par Widmer et coll.. Le rendement global de la synthèse de l'acide rhodotorulique est alors de 2% en onze étapes et le produit final obtenu est un mélange de stéréoisomères.

La seconde stratégie mise en œuvre par Fujii et coll. en 1973 [253] (Figure 69) permet l'obtention spécifique d'un seul énantiomère. La réaction enzymatique de désacétylation de l'amine de l'acide aminé **20** permet d'obtenir uniquement le stéréoisomère S de la molécule **21**. Ainsi, il est facile de séparer les deux énantiomères obtenus. La réaction d'acétylation de l'hydroxylamine, en début de synthèse, pour former l'hydroxamate **20**, permet d'économiser un grand nombre d'étapes et ainsi d'obtenir un rendement de 14% en 8 étapes.

La stratégie de synthèse de l'acide dimérumique développée par Widmer et coll. a aussi permis la synthèse de l'acide rhodotorulique avec un rendement global de 30%, par acétylation de la molécule **9**, obtenue par réduction de la molécule **7** par du palladium (Figure 65, Figure 67) [247, 248].

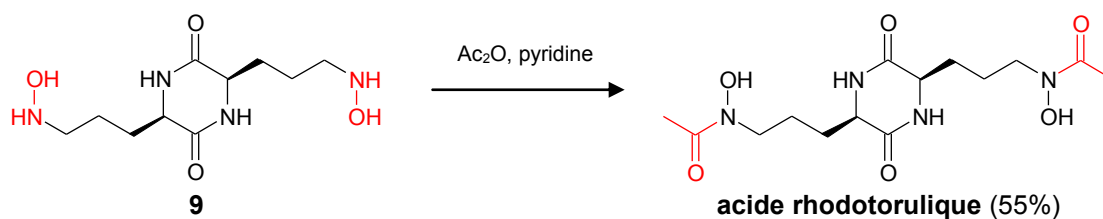


Figure 67 : Synthèse de l'acide rhodotorulique par Widmer et coll. [247]

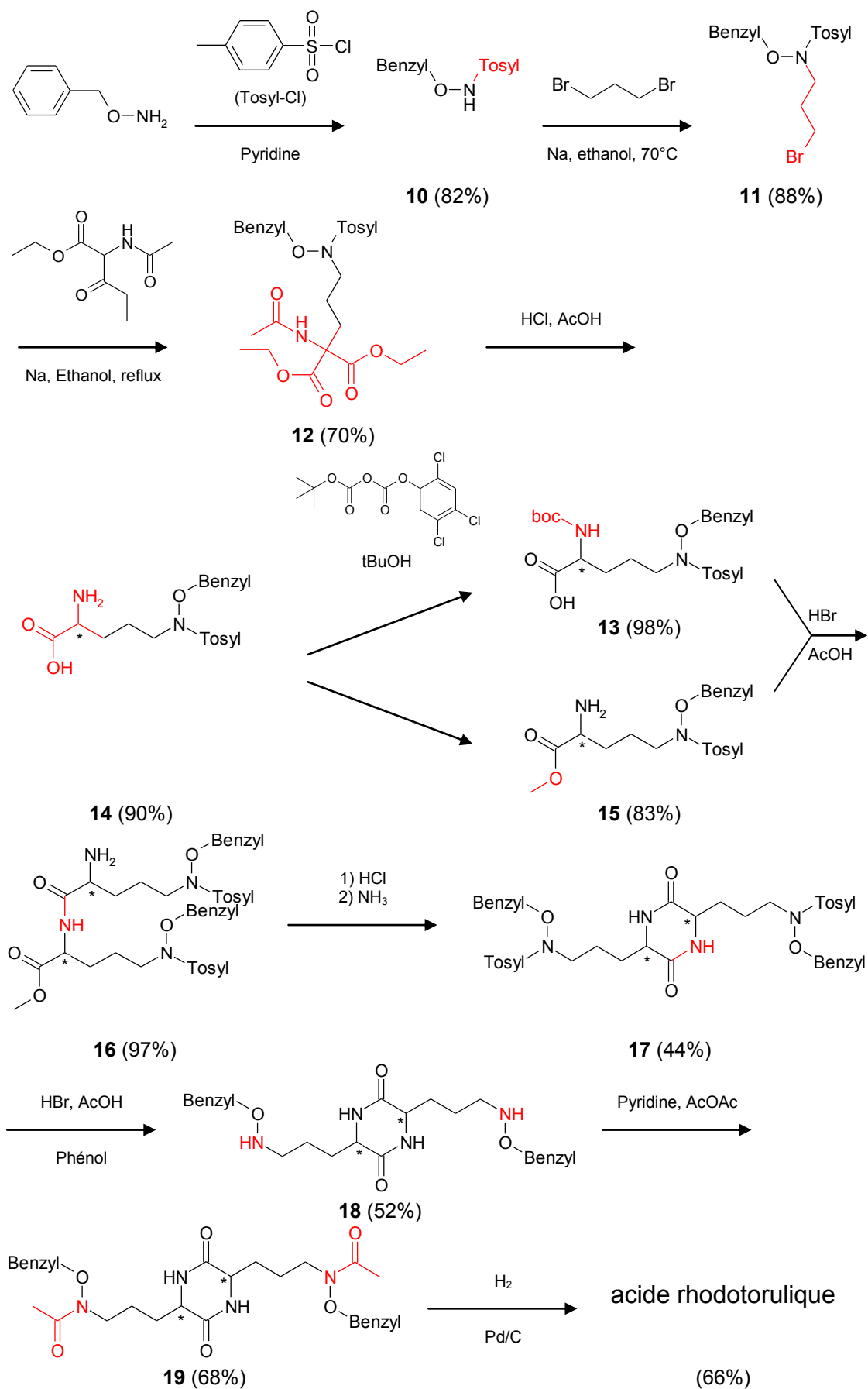


Figure 68 : Synthèse de l'acide rhodotorulique par Isowa et coll. [250-252]

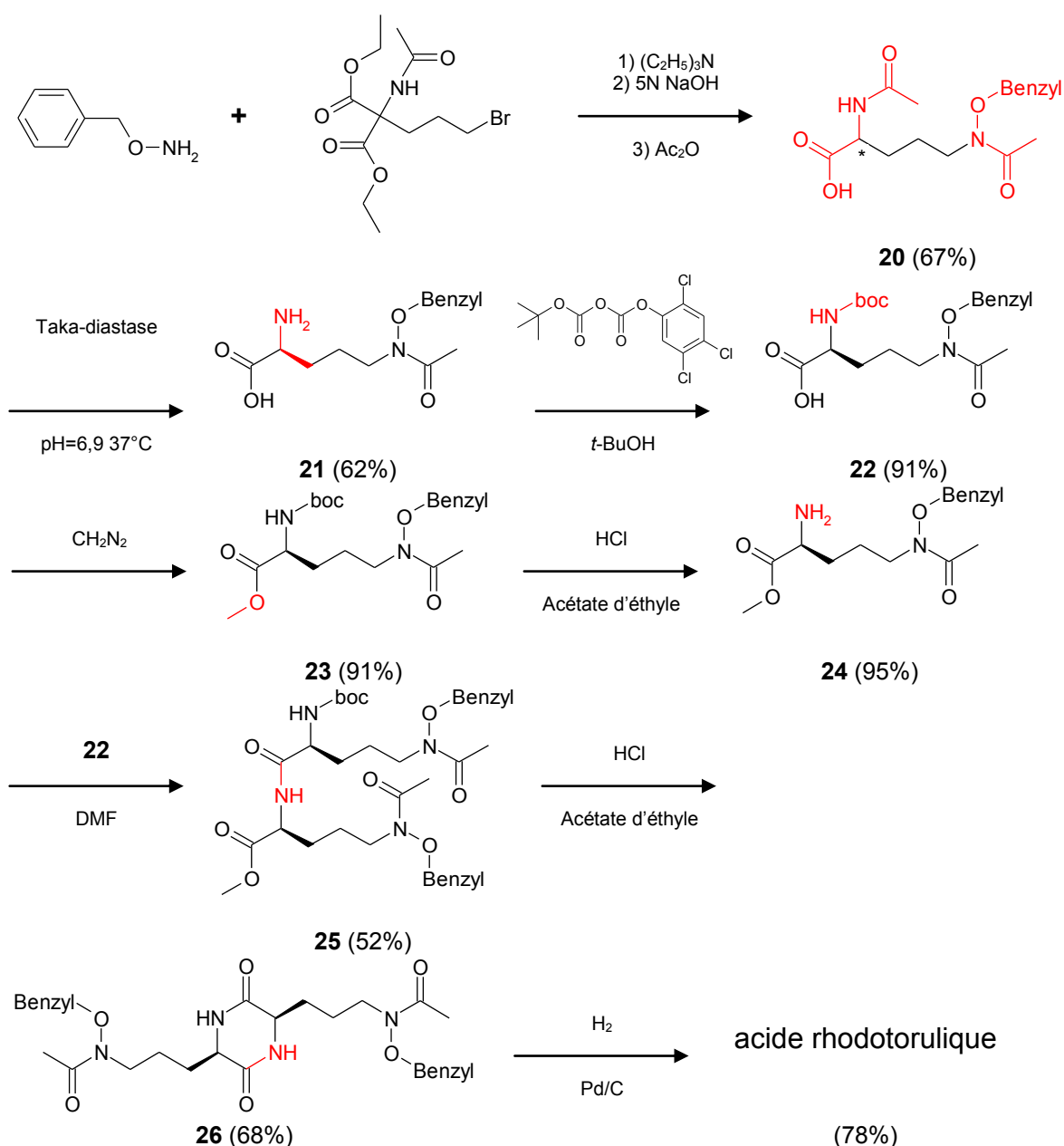


Figure 69 : Synthèse de l'acide rhodotorulique par Fujii et coll. [253]

I.3. Synthèse du synthon N^5 -acyl- N^5 -hydroxyornithine

Dans le but d'obtenir le groupement hydroxamate, plusieurs stratégies ont été publiées permettant ou non d'introduire différents groupements acyle sur l'azote en position 5 de l'ornithine.

Dans l'ensemble des publications, la première étape est commune. Elle correspond à la formation de l'hydroxylamine primaire qui sera alors soumise à une acylation dans des conditions classiques utilisées en synthèse peptidique [71, 254-257] (Figure 70).

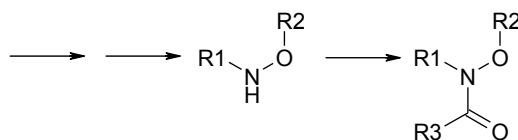


Figure 70 : Stratégie générale de la formation de la fonction hydroxamate

Afin d'obtenir l'hydroxylamine adéquate plusieurs méthodes ont été mises en oeuvre.

I.3.1. Synthèse de l'hydroxylamine par réaction de substitution nucléophile

C'est la méthode de choix utilisée dans un grand nombre de publications. Le nucléophile est une hydroxylamine simple ou déjà substituée. Généralement, l'acide hydroxamique ne peut être *N*-substitué dans de bonnes conditions. Ceci s'explique par une fonction hydroxamate possédant deux sites nucléophiles (O, N), ceux-ci peuvent réagir pour former soit l'hydroxamate **27** souhaité soit deux hydroxymates **28** et **29** (Figure 71). Ces deux hydroxymates peuvent dans certains cas être les produits majoritaires [258]. Lorsque l'hydroxylamine n'est pas *N*-acylé, ces produits secondaires ne sont pas observés ; dans ce cas la *O*-benzylhydroxylamine pourra substituer directement un brome [141, 256, 259-263] ou un iode [264].

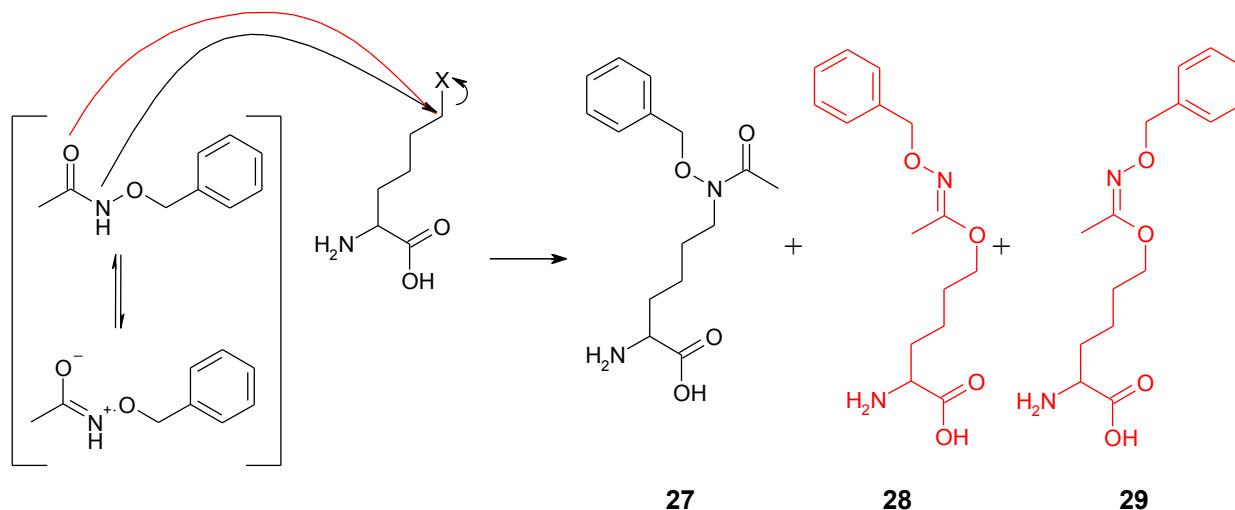


Figure 71 : Substitution nucléophile par un acide hydroxamique [258] ; X= Br, OH (réaction de Mitsunobu)

Lors de la réaction de Mitsunobu [265, 266], cette entité nucléophile réagit alors avec une fonction alcool primaire. La *O*-benzylhydroxylamine doit être au préalable *N*-substituée par une protection de type carbamate [258, 267-269]. Il est aussi possible de favoriser la substitution de la fonction alcool par la *O*-benzylhydroxylamine, en la modifiant en fonction

ester avec du chlorure d'acétyl [270], de l'anhydride trifluoroacétique [263] (ou *in situ* avec de l'acide trifluoroacétique [271]), ou par du chlorure d'acyle de l'acide paratoluènesulfonique [272]. L'ensemble de ces stratégies est résumé dans la Figure 72. Le produit halogéné peut facilement être obtenu à partir de l'alcool correspondant [258, 273-276].

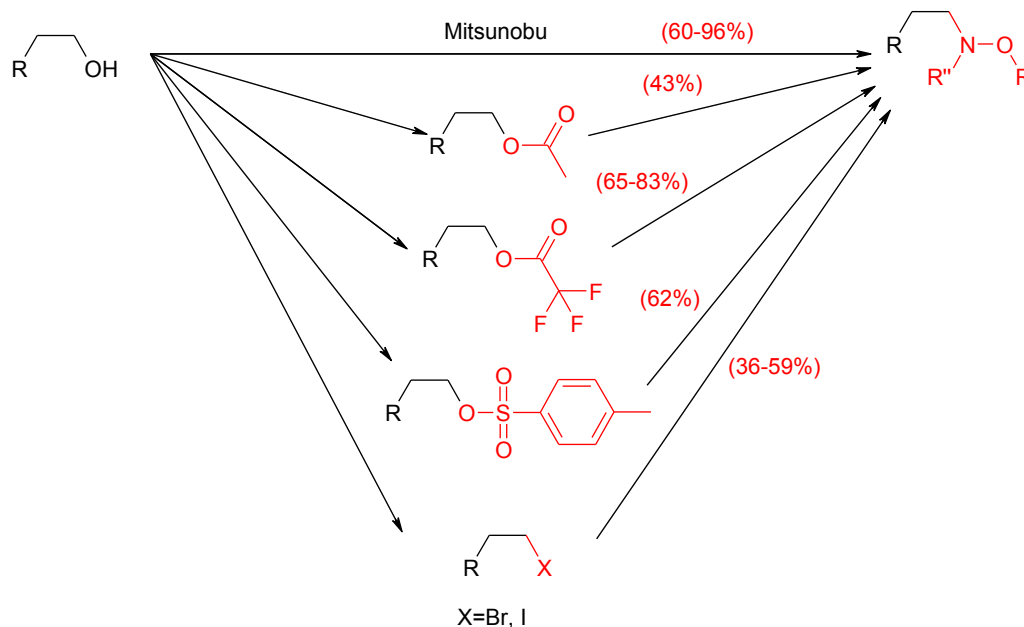


Figure 72 : Différentes stratégies de substitution de l'alcool par l'hydroxylamine

I.3.2. Synthèse de l'hydroxylamine par addition sur une double liaison

Il est possible d'additionner la *O*-benzylhydroxylamine en mettant en jeu une réaction de type Michaël sur une double liaison avec un rendement satisfaisant [262, 277] (Figure 73). Dans ce cas, seule la réaction sur des hydroxylamines primaires est décrite dans la littérature.

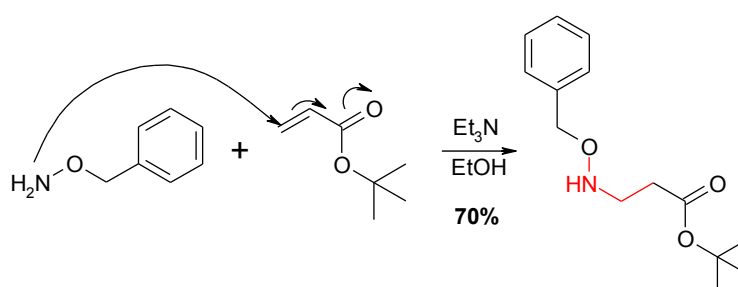


Figure 73 : Formation d'hydroxylamine par addition [1,4] sur une double liaison [262]

I.3.3. Synthèse de l'hydroxylamine par formation d'*N*-hydroxyimine

L'obtention de la fonction hydroxylamine se fait en deux étapes à partir d'une fonction aldéhydique, avec un rendement global moyen de 70% [278-280]. Pour cela l'atome d'azote de l'hydroxylamine réagit avec l'aldéhyde pour former une hydroxyimine, qui est alors réduite en hydroxylamine (Figure 74). Cette réaction est réalisable en une seule étape d'amination réductive [280].

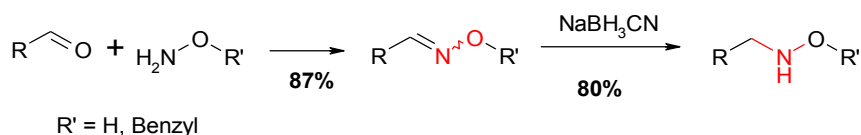


Figure 74 : Préparation d'hydroxylamine *N*-substituée *via* la préparation d'une hydroxyimine [278, 279]

I.3.4. Synthèse de l'hydroxylamine par oxydation de l'amine

La voie de biosynthèse du synthon *N*⁵-acyl-*N*⁵-hydroxyornithine passe par l'oxydation directe de l'amine terminale de l'ornithine. Plusieurs agents oxydants sont utilisés pour permettre l'obtention d'hydroxylamine à partir d'amine : diméthyldioxirane [281], peroxyde de benzoyle [282-285], acide metachloropéroxybenzoïque [286], oxone, tertibutylperoxyde [287] (Figure 76).

La méthode d'oxydation de l'amine la plus intéressante utilise du peroxyde de benzoyle. Ceci permet d'obtenir directement une hydroxylamine benzoylée sur l'oxygène ; l'acylation de l'azote pour former l'hydroxamate est alors facilitée.

I.3.5. Synthèse de l'hydroxylamine par oxydation d'imine

L'obtention de la fonction hydroxylamine est possible en deux étapes par oxydation, par de l'acide monoperphthalique (MMP), de la fonction imine avec un rendement moyen de 35% [288].

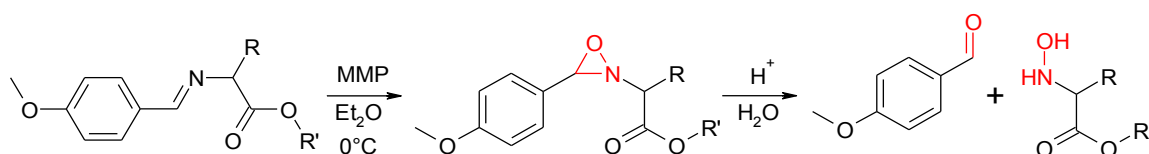


Figure 75 : Formation de l'hydroxylamine par oxydation de la fonction imine [288]

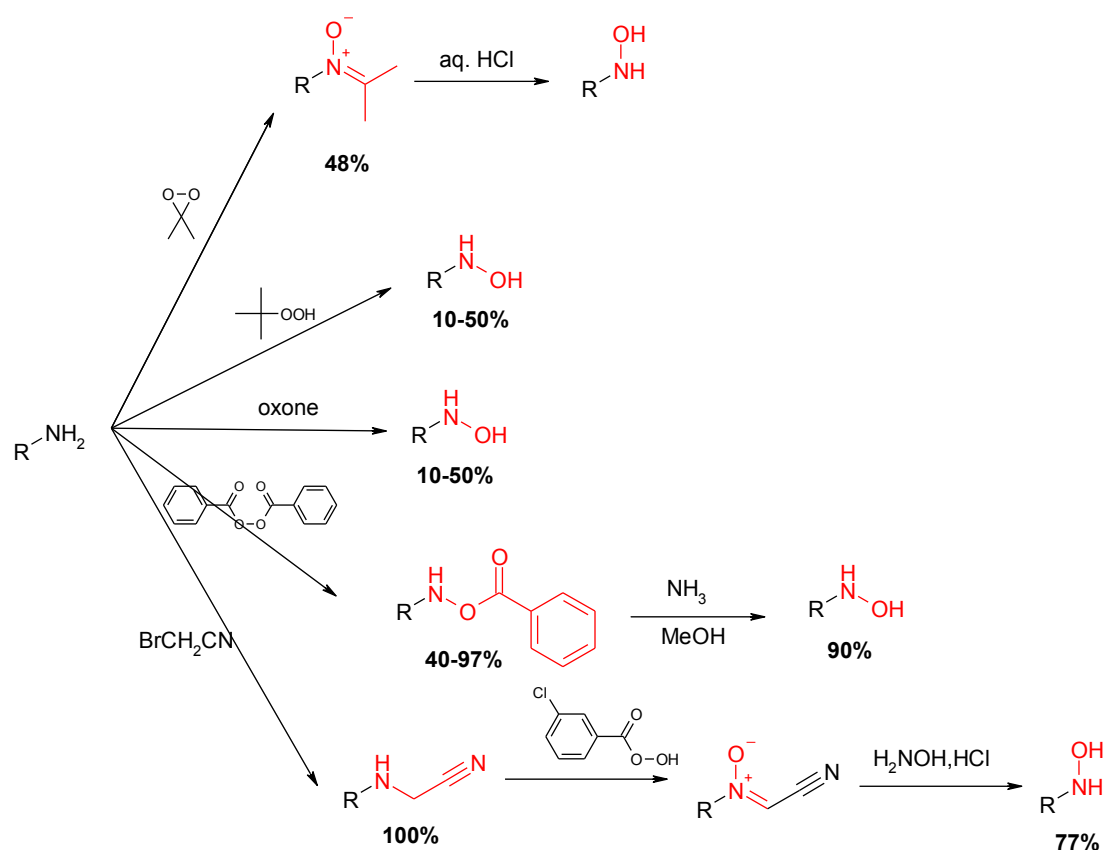


Figure 76 : Formation de l'hydroxylamine oxydation directe d'une amine [281-287]

I.3.6. Synthèse de l'hydroxylamine par réduction de groupement nitro

Comme indiqué dans la synthèse de l'acide dimérumique publiée en 1974 [247], il est possible d'obtenir la fonction hydroxylamine par réduction d'un groupement nitro grâce à un mélange de palladium et de sulfate de baryum (Figure 77).

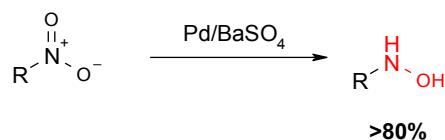


Figure 77 : Formation de l'hydroxylamine réduction du groupement nitro en hydroxylamine [247]

I.3.7. Conclusion :

L'ensemble des réactions répertoriées est résumé dans le Tableau 18. D'après ces données, deux stratégies semblent intéressantes à utiliser pour l'obtention d'hydroxylamines, car elles permettent leur formation avec une protection sur l'oxygène :

- la substitution nucléophile à partir d'un alcool ou d'un halogénure,
- l'oxydation par du peroxyde de benzoyle d'une amine.

Ces deux stratégies seront utilisées pour l'obtention des sidérophores produits par *S. apiospermum*.

Tableau 18 : Résumé des différentes stratégies d'obtention de la fonction hydroxylamine

Fonction Initiale	Réaction	Nombre d'étapes	Rendement	Note
alcool	substitution nucléophile	1-2	43-83	Protection aisée de l'OH
	réaction de Mitsunobu	1	60-96%	Protection aisée de l'OH
halogénure	substitution nucléophile	1	40-66%	Protection aisée de l'OH
double liaison	réaction de type Mickaël	1	70%	Uniquement dans le cas d'esters β -insaturés
amine	oxydation	1-2	10-70%	
	oxydation par du peroxyde de benzoyle	1	40-97%	Protection aisée de l'OH
imine	oxydation	2	35%	
groupement nitro	réduction	1	80%	
aldéhyde/cétone	amination + réduction	1-2	69-82%	

II. Analyse rétrosynthétique des sidérophores de *S. apiospermum*

Plusieurs stratégies sont possibles pour la synthèse de l'acide dimérique et du N ^{α} -méthyl coprogène B. Une étude rétrosynthétique est donc nécessaire.

L'analyse de la structure de ces deux molécules (Figure 78-A,B) permet une première constatation qui servira de base à cette étude : un motif commun « acide aminé acylé » permet de former l'ensemble de ces molécules (Figure 78-C).

Nous nous intéresserons tout d'abord à la synthèse de la fusarinine, qui est la molécule la plus simple. De plus, la fusarinine a été isolée de *H. capsulatum* en tant que sidérophore [172].

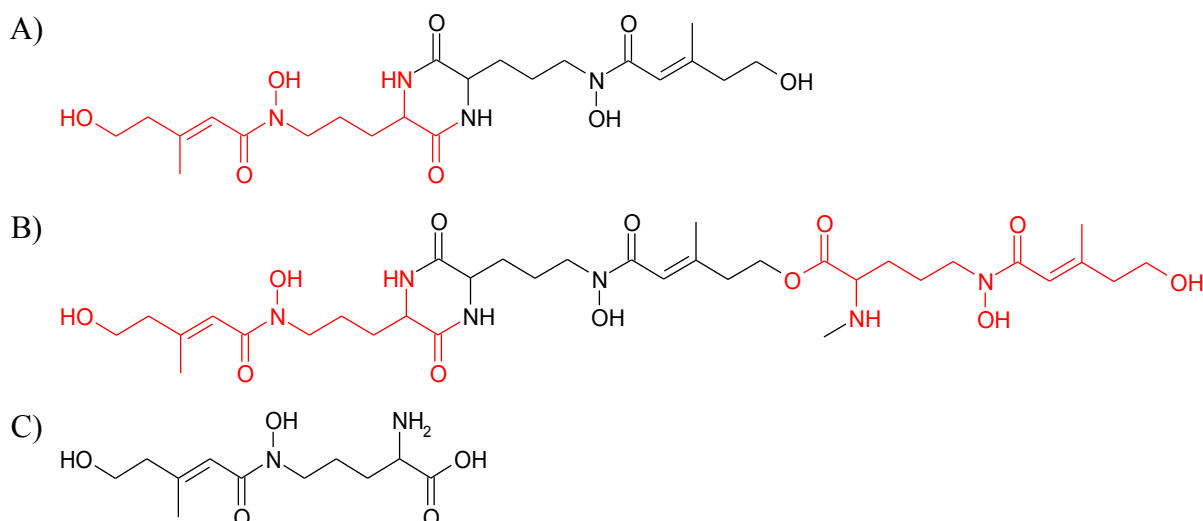


Figure 78 : Comparaison de la structure de trois sidérophores, A) acide diméthylumique, B) N^α-méthyl coprogène B, C) fusarinine

II.1. La fusarinine

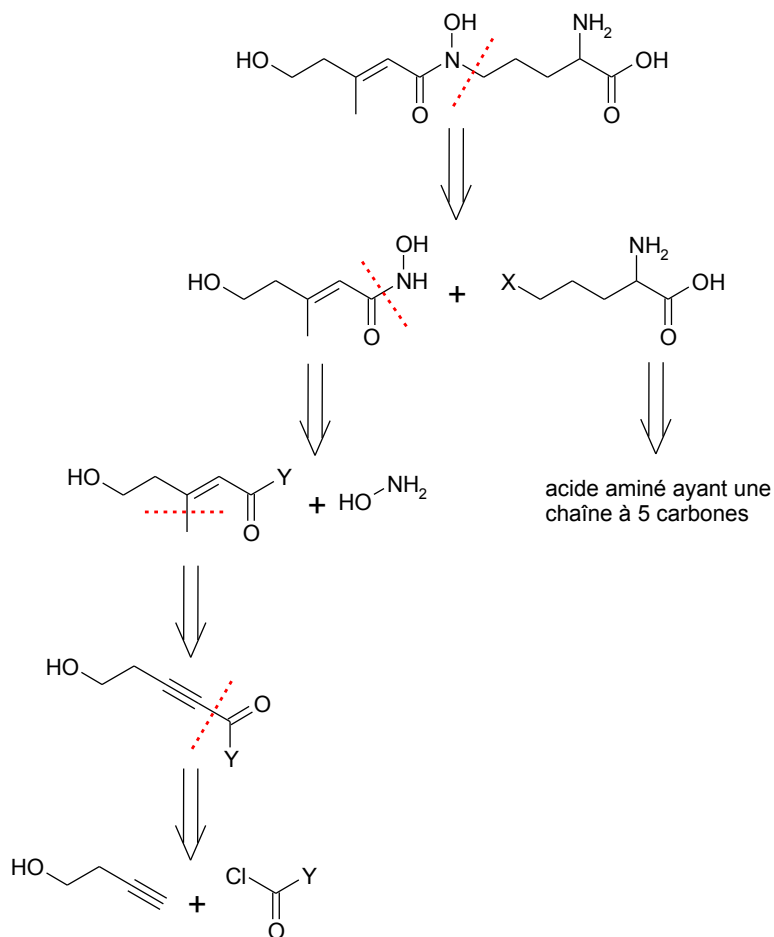
La fusarinine peut être considérée comme un acide alpha-aminé à cinq carbones, N⁵-hydroxylé et N⁵-acylé par l'acide (2Z) 3-deshydroxymévalonique.

L'étude rétrosynthétique (Figure 79) montre deux stratégies de synthèse possibles. La première passe par la formation de la fonction hydroxamate (voie A) puis la N-substitue par une entité acide aminé. La seconde stratégie (voie B) commence par préparer la partie de l'acide alpha-aminé contenant l'hydroxylamine en 5, l'hydroxylamine étant ensuite acylée. La partie acide aminé peut être obtenue par oxydation directe d'une amine (voie B1) ou par substitution par l'hydroxylamine en 5 (voie B2).

La synthèse de la partie (2Z)-3-deshydroxymévalonique peut être effectuée par acylation du 3-butyn-1-ol, suivie d'une addition sur la triple liaison d'un groupement méthyle. Cette stratégie est commune aux deux voies de synthèse envisagées.

La voie de synthèse B permettrait un accès plus facile à un grand nombre d'analogues *via* une acylation en dernière étape par des acides carboxyliques (ou dérivés) commerciaux. C'est le choix qui a été fait.

Voie A :



Voie B :

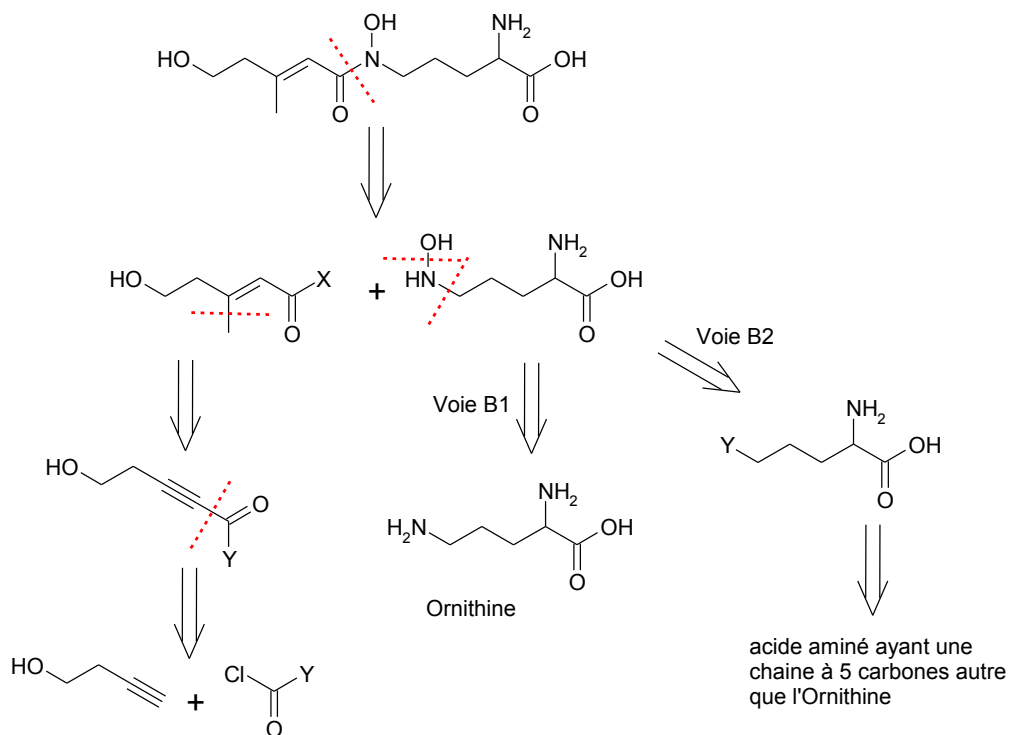


Figure 79 : Etude rétrosynthétique de la fusarinine

II.2. L'acide dimérumique

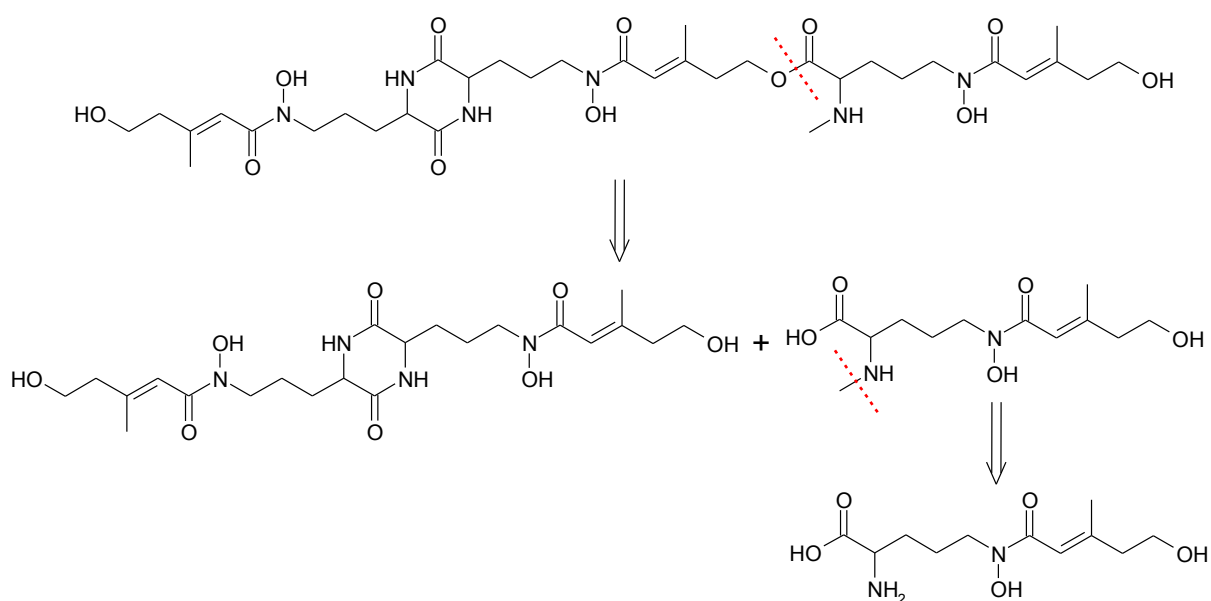
L'acide dimérumique est un dimère de la fusarinine. Deux voies de synthèse sont donc possibles (Figure 81).

La première voie de synthèse (voie C) représente le couplage par des méthodes de synthèses peptidiques de deux molécules de fusarinine, afin de former le noyau 2,4-dioxopiperazinique.

La seconde voie (voie D) forme tout d'abord le noyau 2,4-dioxopiperazinique à partir de deux acides aminés à cinq carbones. Les deux chaînes latérales du cycle seront ensuite transformées en fonction hydroxamate *via* les stratégies expliquées pour la synthèse de la fusarinine.

II.3. Le N^α-méthyl coprogène B

Le N^α-méthyl coprogène B est un trimère méthylé de la fusarinine. L'étude rétrosynthétique de cette molécule s'appuie sur la synthèse des deux molécules précédentes. Ainsi la voie la plus directe est le couplage de l'acide dimérumique avec une molécule de fusarinine préalablement N-méthylée (Figure 80).

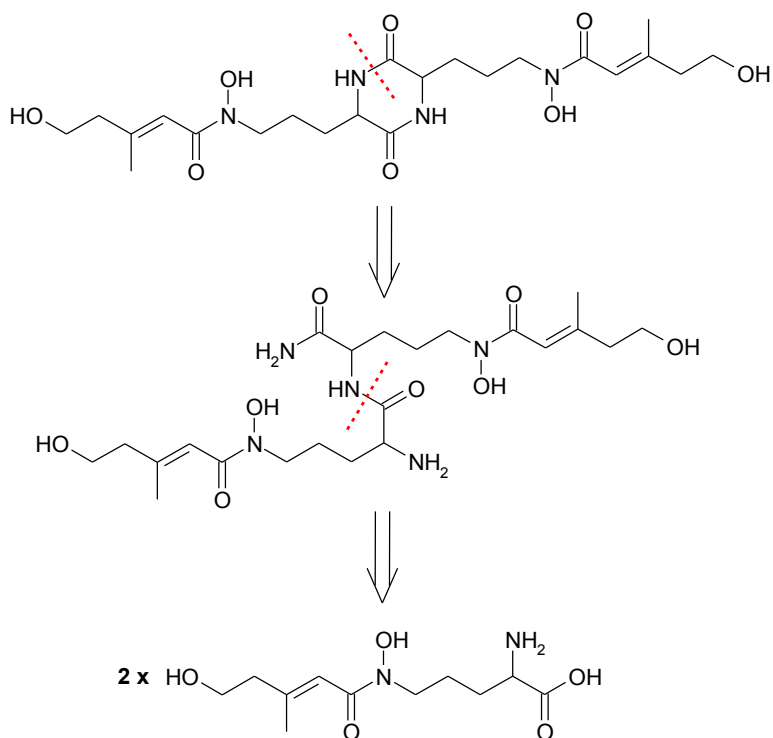


II.4. Conclusion

L'ensemble des analyses rétrosynthétiques montre que la synthèse de la fusarinine est le pivot de notre stratégie de formation de l'ensemble des sidérophores sécrétés par *S.*

apiospermum ; il est aussi le synthon de base pour leur biosynthèse chez les champignons. La fusarinine est aussi le synthon de base d'un grand nombre d'autres sidérophores (Figure 82) [5, 175]. De plus, à notre connaissance, aucune synthèse de la fusarinine n'est rapportée dans la littérature.

Voie C :



Voie D :

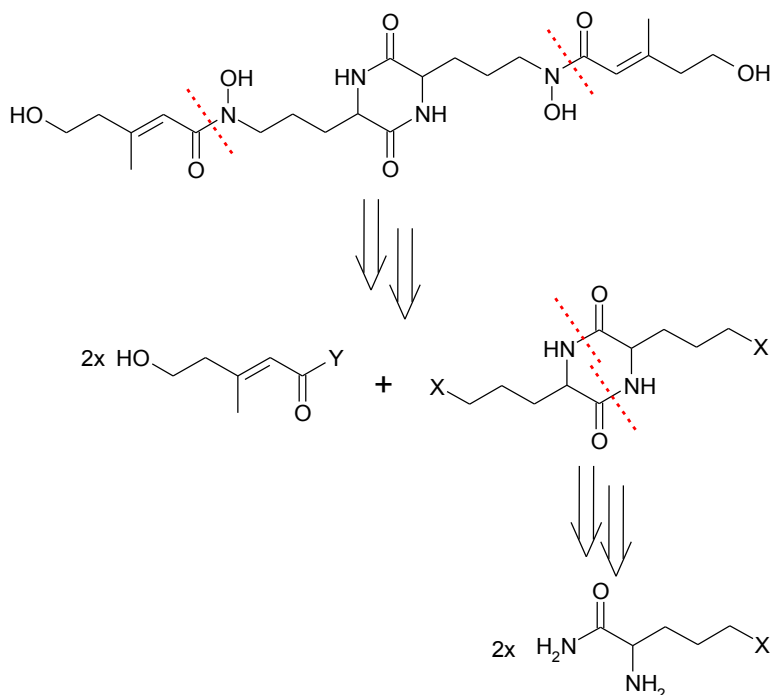


Figure 81 : Etude rétrosynthétique de l'acide dimérique

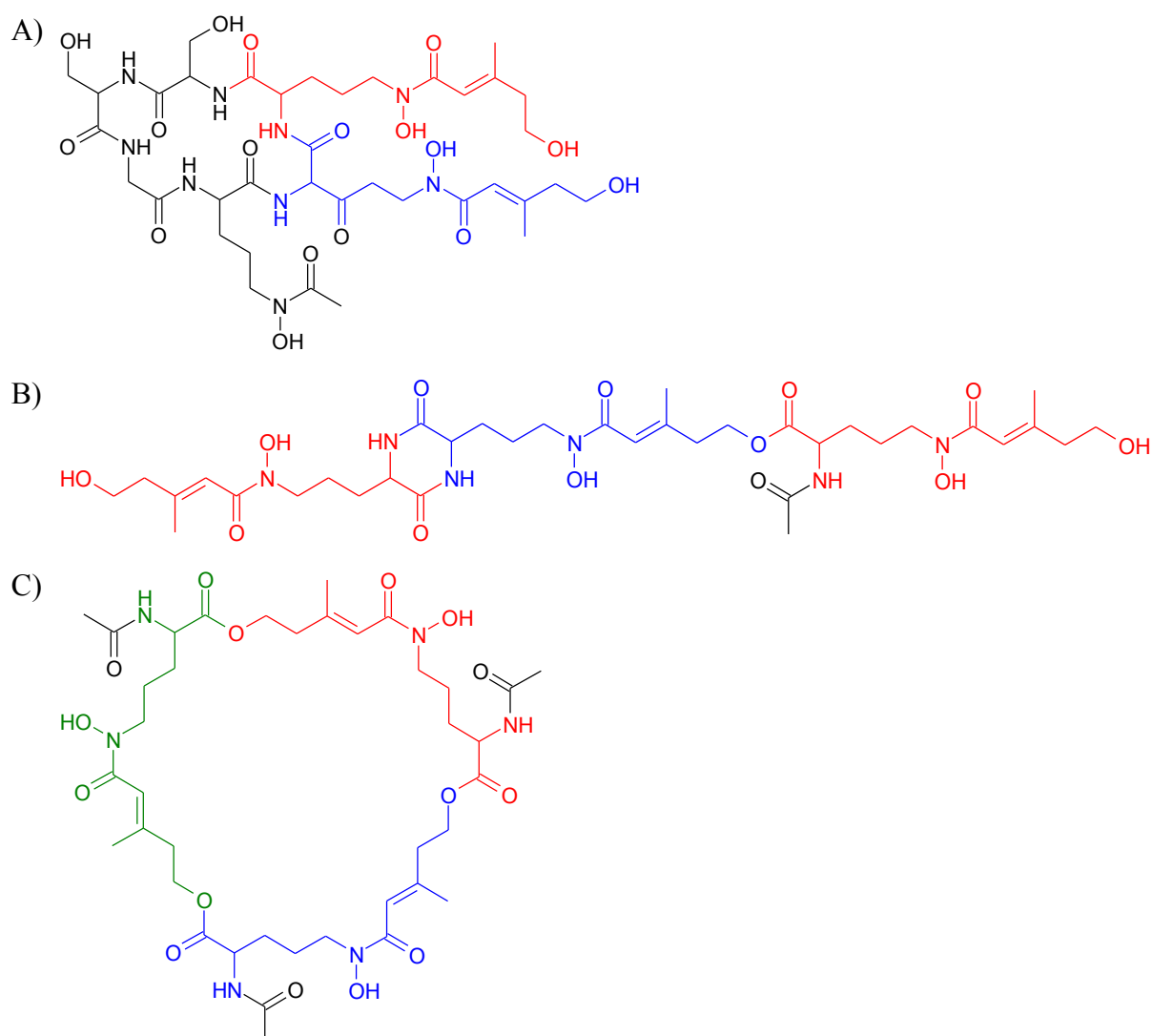


Figure 82 : Autres sidérophores ayant la fusarinine comme synthon de base ; A) asperchrome B1, B) coprogène, C) N,N',N''-Triacetylfusarinine C

III. Synthèse de la fusarinine

La voie de synthèse choisie est la voie B (Figure 79) car elle permet potentiellement d'obtenir un grand nombre d'analogues par modification de l'une des dernières étapes.

III.1. Synthèse de la partie acide 3-déshydroxymévalonique

La synthèse de l'acide (2Z)-3-deshydroxymévalonique se déroule en quatre étapes dont deux mettent en jeu des réactifs de type organométallique selon la méthode de Hollowood et Coll. [289]. L'alcool présent sur le but-3-yn-1-ol doit être protégé par un groupement stable en milieu fortement basique. Quatre groupements protecteurs ont été sélectionnés :

tertiobutyldiméthylsilanyle, tertibutyldiphénylsilanyle, tetrahydropyranyle et paratoluènesulfonyle, trois d'entre eux sont disponibles commercialement [290, 291]. Seul le 3-butyn-1-ol possédant la protection tertibutyldiphénylsilanyle ne l'est pas.

III.1.1. Formation du 5-(alkyloxy)pent-2-ynate d'alkyle

Lorsque les molécules protégées ne sont pas disponibles commercialement, la protection sur le groupement alcool est alors introduite initialement (Figure 83) [292].

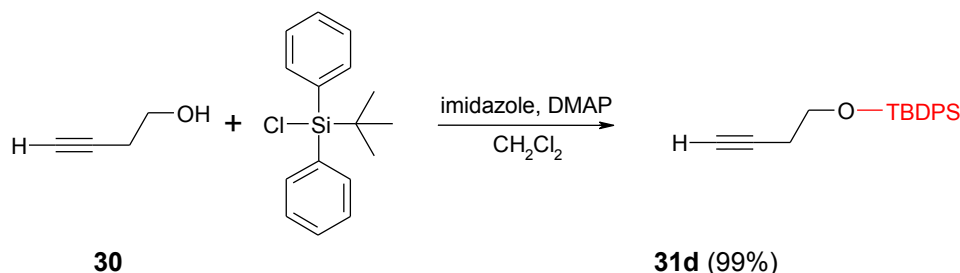


Figure 83 : Formation du 4-(*t*-buthyldiphénylsilanyloxy)but-1-yne [292]

La première étape consiste à déprotoner l'hydrogène de la fonction alcyne « vrai » par une base forte (LDA) et de faire réagir le carbanion formé sur un chloroformate de l'alkyle correspondant pour former le 5-(alkyloxy)pent-2-ynate d'alkyle [289, 293]. Les rendements obtenus pour la formation des esters **32** sont variables et compris entre 4% (**32e**) et 95% (**32g**) (Figure 84) [293].

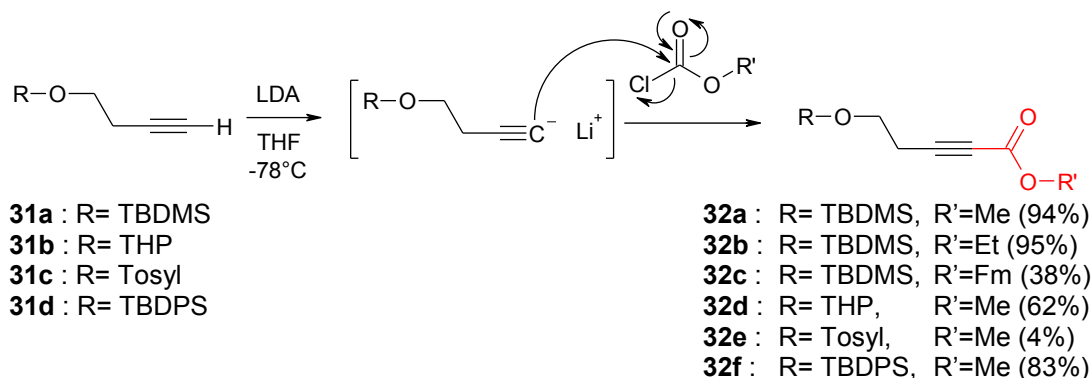


Figure 84 : Mécanisme de formation du 5-(alkyloxy)pent-2-ynate d'alkyle

Dans le cas de **32a-d,f** les rendements non quantitatifs sont dus à une réaction incomplète, le réactif **31a-b,d** restant toujours présent en fin de synthèse et pouvant être recyclé. Dans le cas de l'utilisation du produit **31c**, le produit **32e** est bien obtenu, mais d'autres produits de dégradation sont également détectés ; la RMN des mélanges obtenus indique la perte du groupement paratoluènesulfonyl. Ce groupement protecteur est aussi utilisé comme groupement activateur de la fonction alcool pour effectuer des réactions de

substitution nucléophile. Une fois formée, la molécule **32e** a pu réagir avec les nucléophiles présents dans la réaction et ainsi former un grand nombre de sous-produits.

III.1.2. Formation du (2Z)-5-(alkyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène d'alkyle

La seconde étape consiste en une addition [1+4] de type Michaël du thiophénole sur la triple liaison (Figure 85) [289].

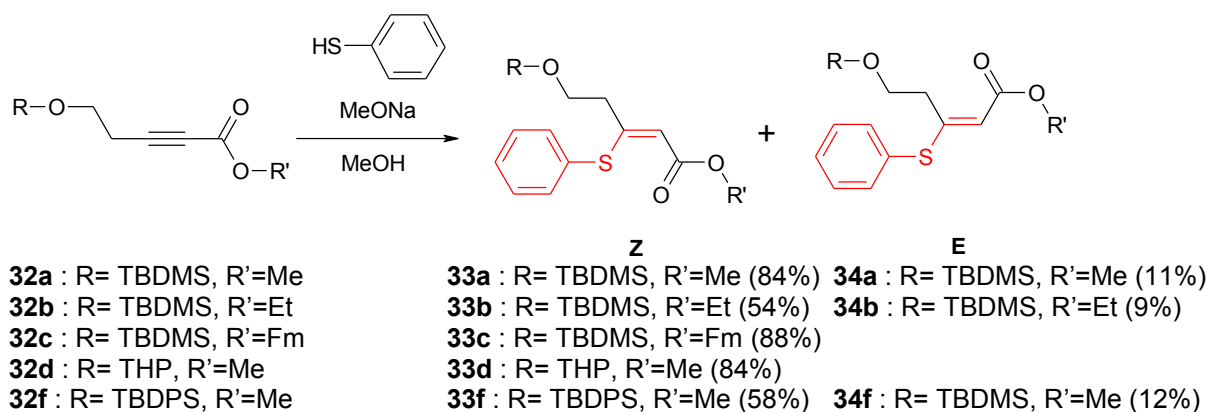


Figure 85 : Formation du (2Z)-5-(alkyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène d'alkyle

Le méthanolate de sodium (généralement 5-10% en mol) est le catalyseur lors de cette réaction. Le thiophénol réagit avec le méthanolate de sodium pour former du thiophénolate de sodium. Celui-ci réagit en position 3, sur la triple liaison, pour ainsi former deux intermédiaires carbanioniques (Figure 86). Les alcènes **33** (Z) et **34** (E) sont alors obtenus par réaction de ces intermédiaires en présence de méthanol, régénérant le méthanolate de sodium.

Lors de cette réaction, la gêne stérique engendrée entre le groupement ester et le groupement *O*-(alkyl)-éthoxy induit une orientation de façon privilégiée de la configuration Z, ester qui est plus thermodynamiquement stable (Figure 87). L'exemple de l'ester **33c** démontre ce phénomène, car l'ester de configuration E n'est jamais observé lors de la réaction. La forte interaction stérique provoquée par la présence des groupements fluorénylméthyle (Fm) et tertiobutyldiméthylsilylanyloxyéthyle empêche la formation de l'alcène de configuration E.

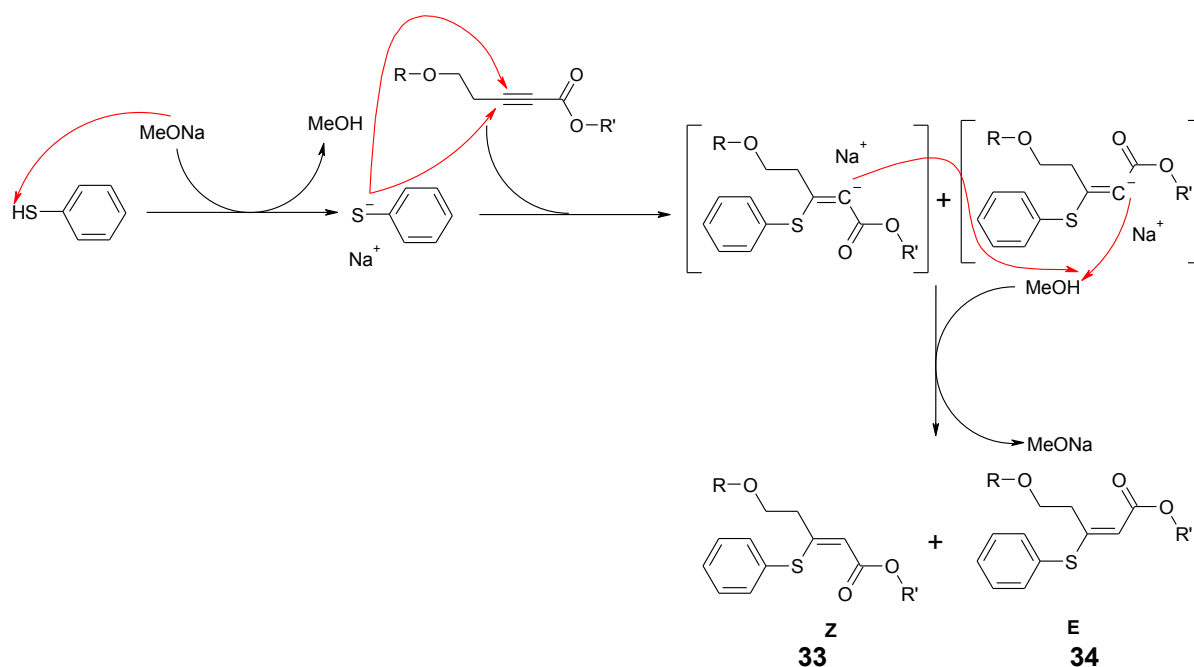


Figure 86 : Mécanisme de formation des deux isomères du 5-(alkoxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène d'alkyle

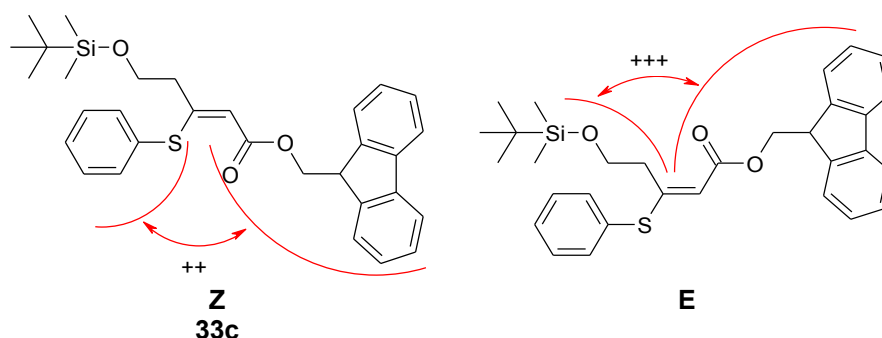


Figure 87 : Gène stérique provoqué par les différents groupements substituant de l'alcène chez le 5-(*t*-buthyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène de fluorénylméthyle

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN) permet de confirmer la stéréochimie des molécules **33**. La méthode de choix met en jeu les effets NOE (séquence NOESY) qui révèlent les atomes d'hydrogènes proches dans l'espace par couplage dipolaire. Ainsi des corrélations spécifiques existent pour l'ester **33**, corrélations qui n'existent pas pour l'ester **34**. Le spectre NOESY de la molécule **33a** (Figure 89) montre bien les corrélations caractéristiques de la configuration *Z* de la double liaison. De plus, le proton en 2 du produit **33** est plus déblindé que celui de la molécule **34**, cette constatation est compatible avec les données empiriques [294].

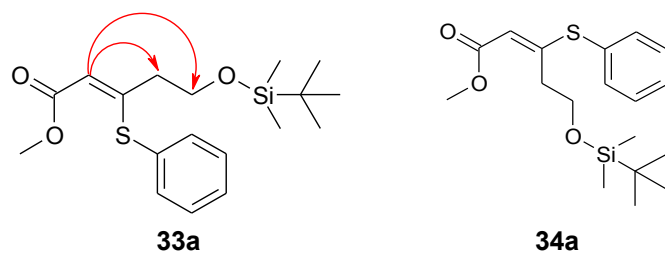


Figure 88 : Corrélations NOE caractéristiques de la configuration de la double liaison du 5-(*t*-butyldiméthylsilyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-èneate d'alkyle

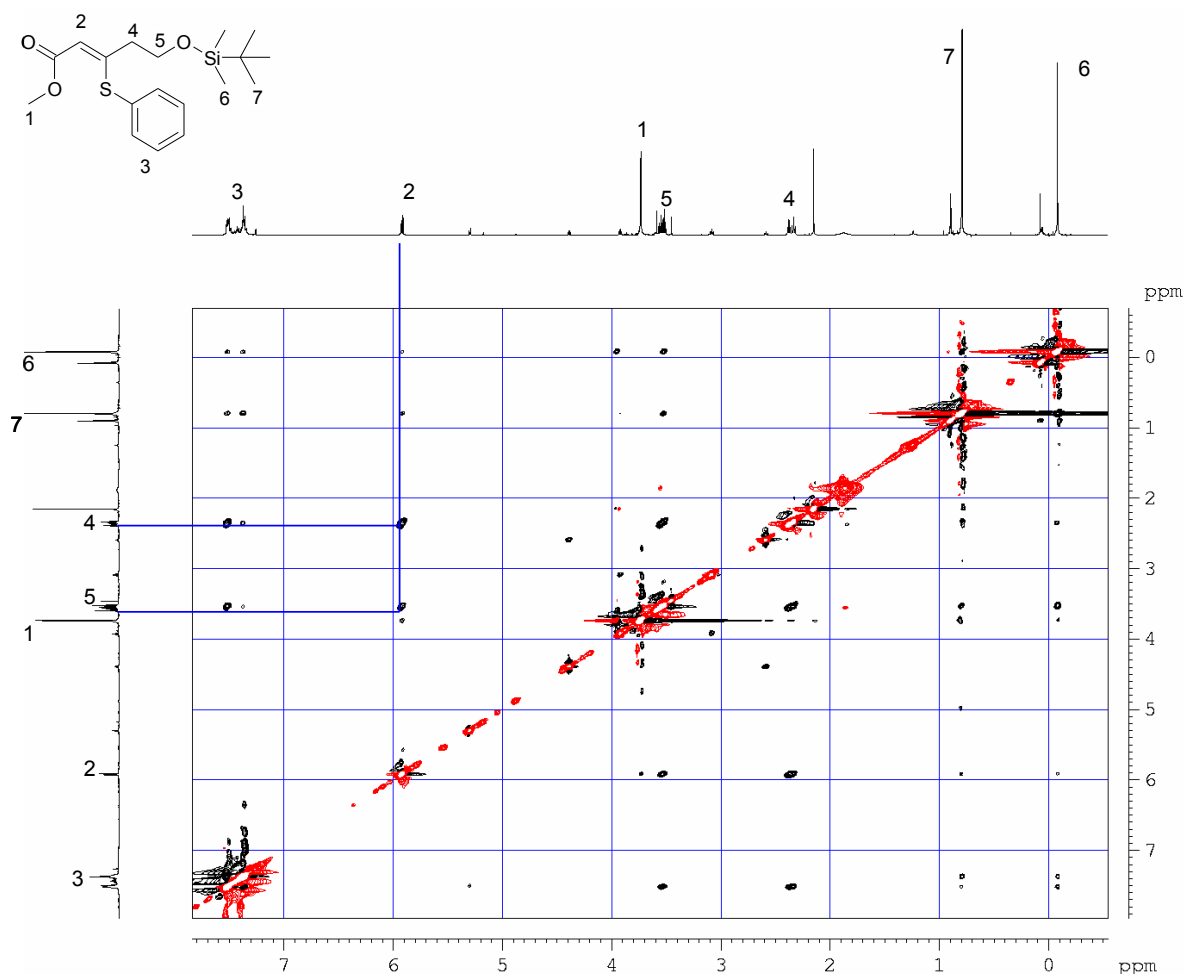


Figure 89 : Spectre NOESY du (2Z)-5-(*ter*-butyldiméthylsilyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (33a)

Dans le cas de l'ester **33d** des monocristaux ont été obtenus à partir du produit purifié et une analyse par rayons X a été effectuée (Figure 90). Le cristal ainsi obtenu est de structure triclinique ($a=9.971(2)$ Å, $b=10.170(2)$ Å, $c=10.536(2)$ Å, $\alpha=92.64(2)^\circ$, $\beta=117.10(2)^\circ$, $\gamma=112.68(2)^\circ$, $V=844.99(1638)$ Å³, $Z=2$). La structure a ainsi été élucidée et confirme la géométrie de la double liaison C3-C4 qui est bien de configuration Z.

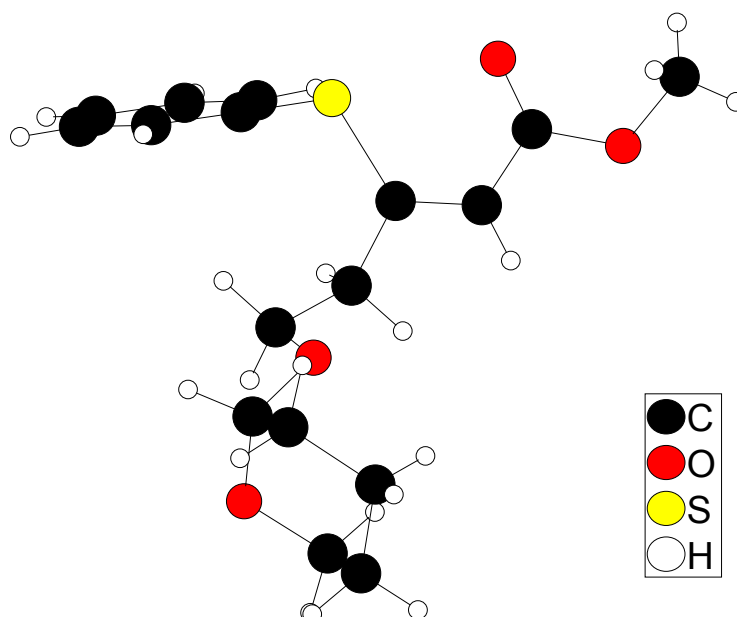


Figure 90 : Structure du (2Z) 5-(tétrahydropyranyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (33d)

III.1.3. Formation du (2E)-5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoate d'alkyle

La troisième étape consiste en la substitution du groupement phénylthio par un groupement méthyle afin d'obtenir l'ester de l'acide (2Z)-3-deshydroxymévalonique. Cette étape utilise la réaction d'un organocuprate (bromure de méthyle cuprate) préparé *in situ* (réaction du bromure de méthyle magnésien avec du iodure cuivreux) [289]. Cette réaction conduit aux esters **35a** et **b** avec des rendements respectifs de 92% et 75% (Figure 91). Avec l'exemple de l'ester **35c** aucune substitution n'a lieu dans les conditions classiques ; une augmentation de la température jusqu'au reflux, ou une augmentation du nombre d'équivalent de bromure de méthyle cuprate, ne permet pas l'apparition de l'ester **35c**. Le fort encombrement stérique et donc la faible accessibilité de la double liaison de l'ester **33c** peut expliquer ce phénomène (Figure 87). Le meilleur rendement (quantitatif) est obtenu avec l'ester **35e** qui possède une protection de l'alcool terminal de type tertibutyldiphénylsilanyle.

Le spectre ^1H -RMN NOESY de la molécule **35a** (Figure 93) montre également les corrélations caractéristiques de la configuration E de la double liaison (Figure 92). La stéréochimie de la molécule **33** est donc conservée.

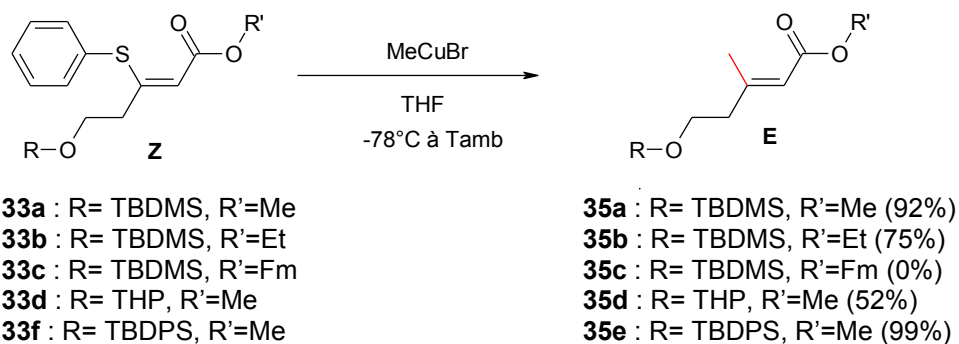


Figure 91 : Formation du (2E) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'alkyle

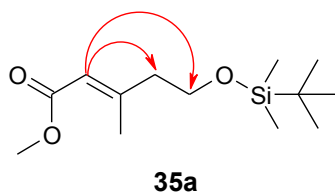


Figure 92 : Corrélations NOE caractéristiques de la configuration de la double liaison du 5-(*t*-butyldiméthylsilyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'alkyle

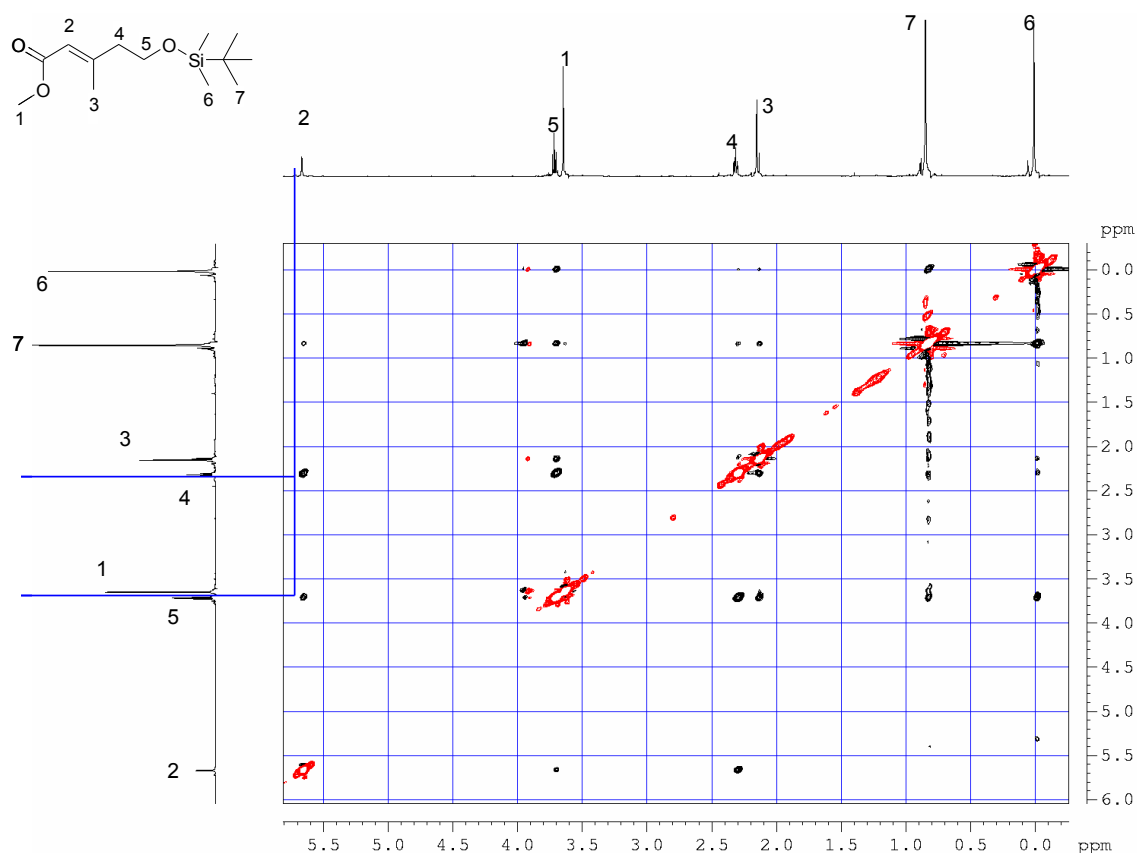


Figure 93 : Spectre ^1H -RMN NOESY de la molécule (2E) 5-(*ter*-butyldiméthylsilyloxy)-3-méthylpent-2-énoate de méthyle

D'après la littérature, l'autre configuration (Z) d'esters de type **35** a été observée *via* l'utilisation d'un organocuprate différent [295, 296].

Nous avons vérifié ces faits expérimentaux en utilisant le diméthylcuprate de lithium (formé *in situ* à partir de méthyllithium et de iodure cuivreux). Ceci a conduit à la formation d'un mélange difficile à séparer par les méthodes chromatographiques classiques (Figure 94). La configuration de la double liaison de l'ester **36** a été vérifiée par ^1H -RMN.

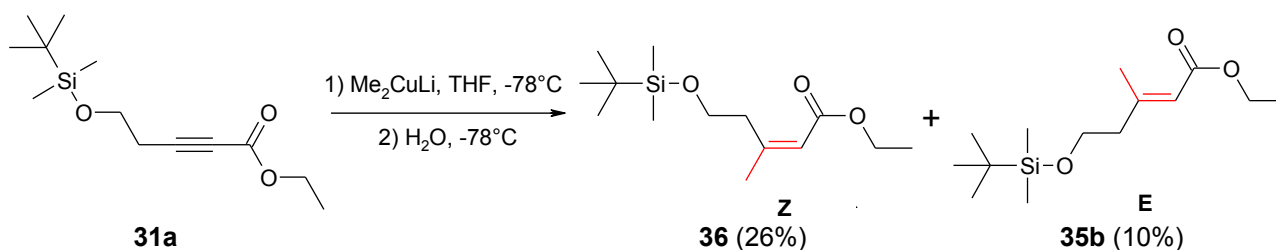


Figure 94 : Formation du (2Z) 5-(*ter*-buthyldiméthylsylaniloxy)-3-méthylpent-2-ène d'éthyle

Le mécanisme réactionnel est alors différent et permet d'orienter la réaction en direction de l'isomère Z (Figure 95) [297]. Dans un premier temps, l'approche de l'organocuprate se fait en parallèle de la triple liaison. Les deux substituants de l'alcyne sont repoussés du même côté de la molécule. Ensuite l'hydrolyse de la réaction permet de la stopper et conduit à l'ester **36** de configuration Z qui est cinétiquement favorisé. La forte gêne stérique provoquée par la présence des deux substituants de la triple liaison induit une inversion de la configuration de celle-ci expliquant la formation de l'ester **35b** thermodynamiquement favorisé.

L'étude du mécanisme de cette réaction permet de penser que l'on pourrait agir soit sur le niveau de température de réaction, soit sur le temps de réaction pour orienter celle-ci.

III.1.4. Formation de l'acide (2E) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque

L'hydrolyse basique de l'ester **35** permet d'obtenir l'acide **37** (Figure 96). D'après la littérature, elle peut être effectuée par différentes bases en présence de groupements TBDMS ou TBDPS (hydroxyde de potassium [298, 299] et hydroxyde de lithium [300, 301]).

Dans le cas de l'ester **35**, l'hydrolyse en présence d'hydroxyde de potassium ne permet pas d'obtenir des rendements satisfaisants aussi bien pour l'ester méthylique que pour l'ester éthylique. Par contre l'utilisation d'hydroxyde de lithium permet une réaction quantitative aboutissant à l'acide **37** avec deux protections : tertibutyldiméthylsilanyle, tertibutyldiphénylsilanyle.

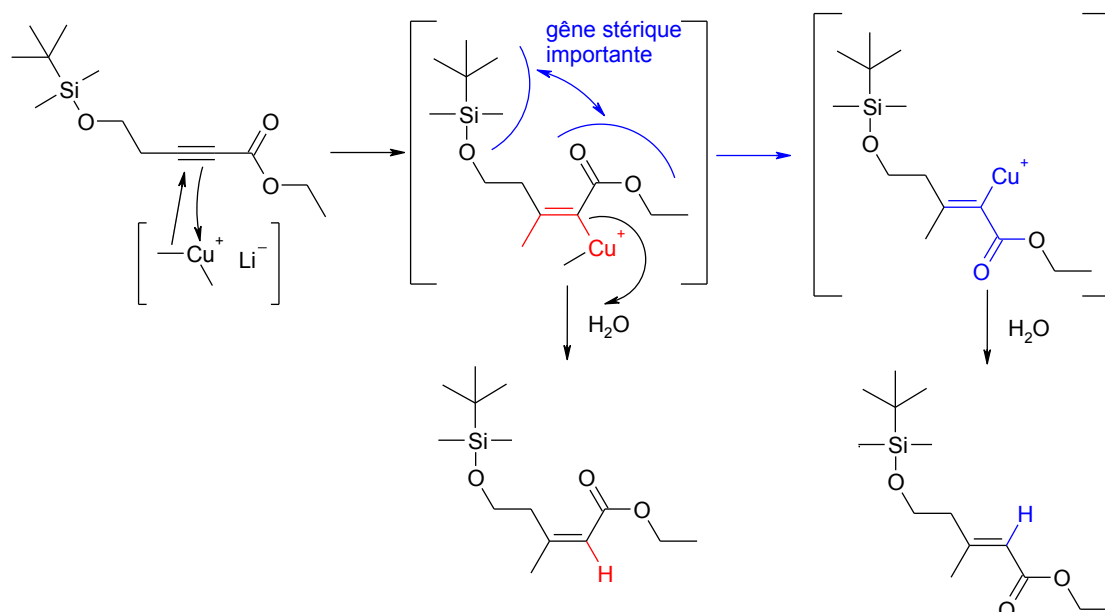


Figure 95 : Mécanisme de formation du (2Z) 5-(ter-butyldiméthylsilyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'éthyle [297]

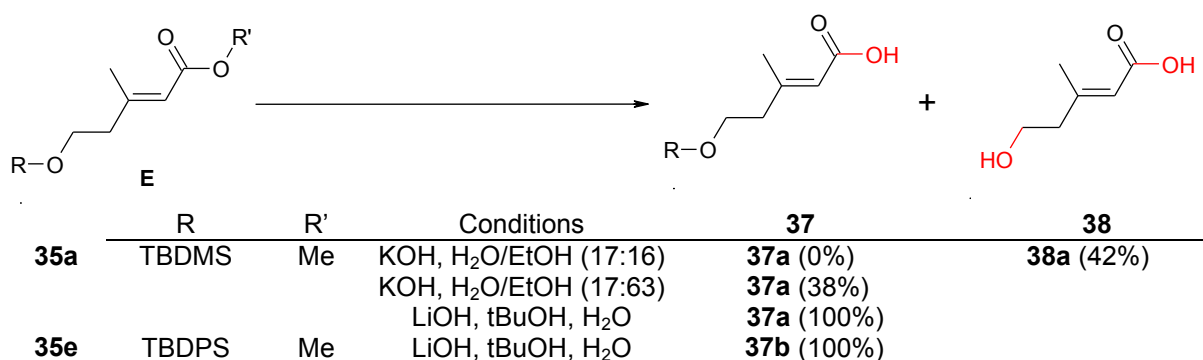


Figure 96 : Formation de l'acide (2E) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque

III.1.5. Conclusion

La synthèse de l'acide **37** est déjà publiée soit sous forme d'acide ou d'acide activé (Figure 97) :

- en 3 étapes avec un rendement de 0,5% *via* une réaction de Reformatsky [247],
- en 3 étapes à partir du but-3-yn-1-ol avec un rendement de 22% [302] ou de 65% [302, 303],
- en 6 étapes par une réaction de Wittig avec un rendement de 38% [301].

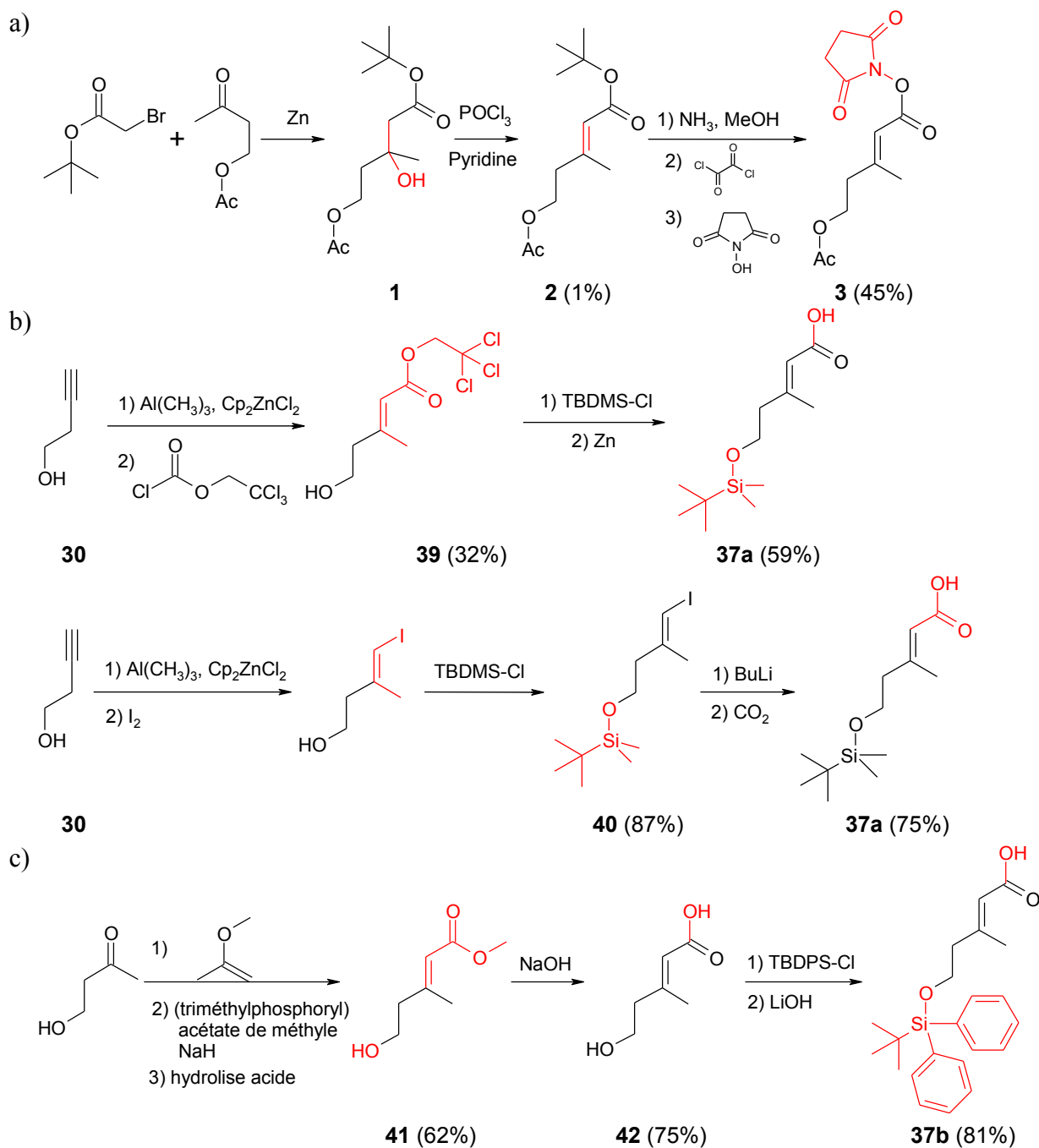


Figure 97 : Exemples de synthèses de l'acide (2E) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque préalablement publiées [247, 301-303]

En conclusion, notre stratégie de synthèse de l'acide **37**, permet son obtention en 4 étapes pour **37a** et en 5 étapes pour **37b** avec des rendements respectifs de 73% et 47% (Figure 98). Lors de ces étapes la purification des isomères Z et E de l'ester **33** ne pose pas de difficultés, ce qui permet d'obtenir l'isomère E de la molécule finale **37**.

De plus, l'utilisation d'un autre organocuprate sur la molécule **32** permet d'envisager la formation de l'isomère *Z* de l'ester **37**.

Parmi les quatre protections de la fonction alcool choisie au début de l'étude, deux (tetrahydropyranyle et paratoluènesulfonyle) affaiblissent les rendements sur plusieurs étapes de la réaction, elles ont donc été écartées.

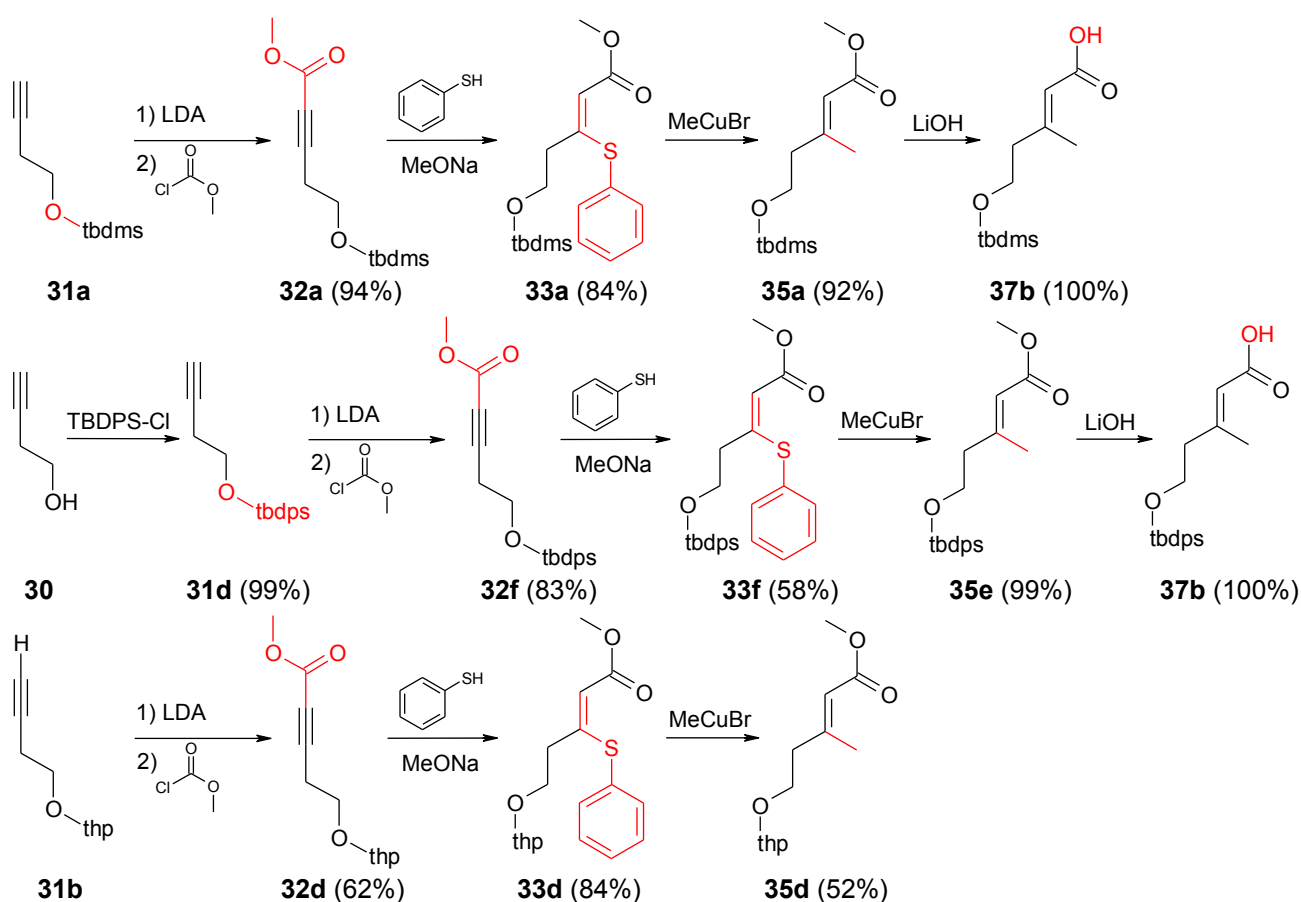


Figure 98 : Synthèse de l'acide (2*E*)-5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque

III.2. Synthèse de la partie *N*-hydroxyornithine

III.2.1. Par réaction de Mitsunobu

Afin d'obtenir l'alcool primaire pouvant être engagé dans une réaction de Mitsunobu, plusieurs étapes de protection à partir de l'acide glutamique doivent être effectuées (Figure 99).

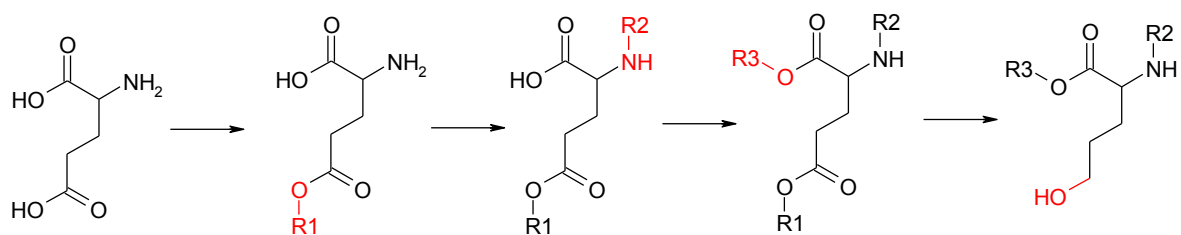


Figure 99 : Stratégie de formation de l'acide glutamique protégé

Les trois protections de l'acide glutamique doivent être choisies de telle sorte que [290, 291, 304, 305] :

- R1 et R3 différencient les deux fonctions esters pour permettre la réduction de l'ester, en position ω , en alcool primaire,
- R2 et R3 doivent permettre une déprotection simultanée pour libérer les fonctions acide et amine du groupe acide α -aminé.

Le premier critère peut être possible *via* la présence d'un ester tertibutylique et méthylique respectivement en position 1 et 5 de l'acide glutamique. La réduction prioritaire de l'ester méthylique peut s'effectuer en présence d'hydruure de diisobutylaluminium (DIBAL) [306] ou du borohydruure de sodium [307]. Ainsi, les acides en position 1 et 5 seront transformés en esters tertibutylique et méthylique.

De plus, l'estérification de la position 5 peut être effectuée sélectivement sans estérifier la position 1 en présence d'acide tétrafluoroborique [308].

Le second critère demande alors une protection qui sera éliminée dans les mêmes conditions que l'ester tertibutylique. Le choix de la protection de l'amine s'oriente vers le groupement tertibutyloxycarbonyle (Boc) [290, 291, 308, 309].

III.2.1.1. Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoate de *t*-butyle

L'acide glutamique **43** est entièrement protégé et conduit en 3 étapes à **46** (Figure 100).

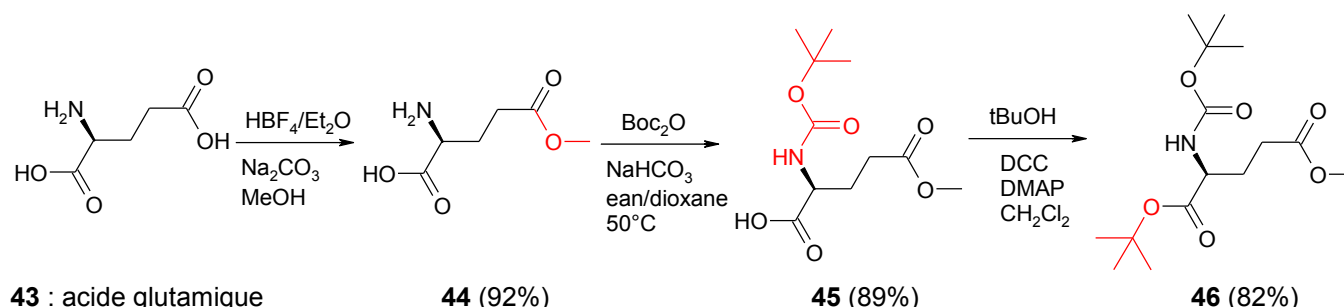


Figure 100 : Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoate de *t*-butyle en 3 étapes

L'estérification sélective de l'acide en position 5 de l'acide glutamique **43** s'effectue selon la méthode d'Albert et coll. [310] en présence d'acide tétrafluoroborique. Cet acide, en plus de catalyser la réaction d'estérification, permet de masquer la fonction acide proche de la fonction amine (Figure 101) et permet ainsi d'estérifier de façon sélective la position 5. L'ajout de sulfate de sodium dans le milieu permet de déplacer l'équilibre de formation de l'ester vers sa formation en piégeant l'eau qui se forme lors de la réaction et ainsi améliorer le rendement de la réaction. L'ester **44** est obtenu avec un rendement de 92%.

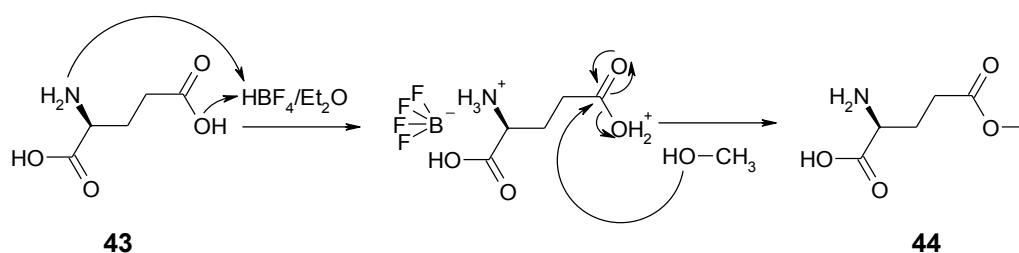


Figure 101 : Mécanisme de formation de l'acide (2S) 2-amino-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoïque

La protection de la fonction amine de l'ester **44** est effectuée dans des conditions classiques [311] en présence de di-*ter*-butyldicarbonate. L'ester **45** est obtenu avec un rendement de 89%.

L'estérification par le *ter*-butanol de la fonction acide résiduelle s'effectue à température ambiante en activant l'acide par ajout de dicyclohexylcarbodiimide. Le rendement peut encore être amélioré en présence de diméthylaminopyridine comme catalyseur (Figure 102) [307]. L'ester *ter*-butylique **46** est obtenu à partir de l'ester **45** avec un rendement de 82%.

L'acide aminé protégé **46** est donc obtenu en 3 étapes à partir de l'acide glutamique avec un rendement global de 71%.

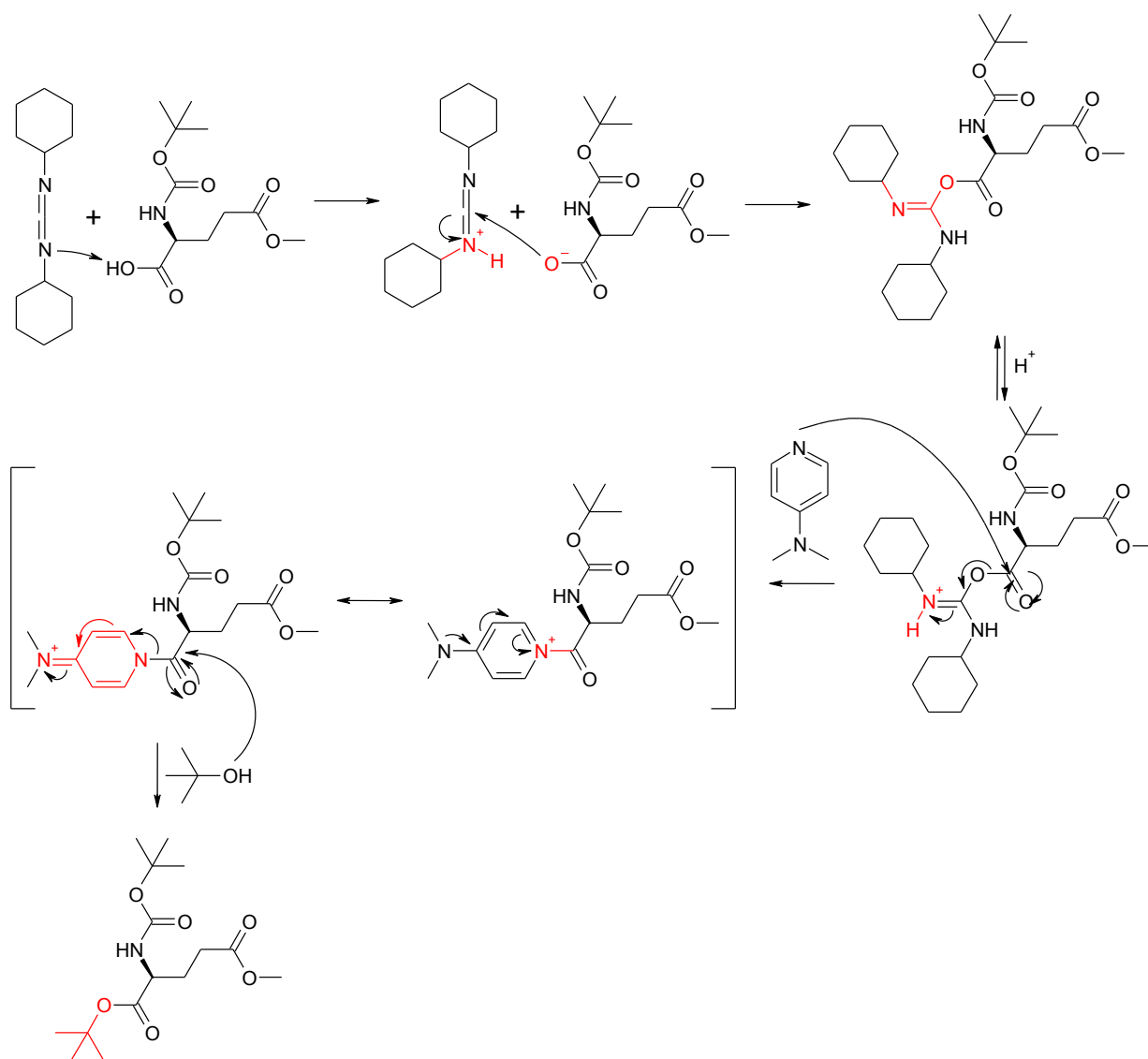


Figure 102 : Mécanisme de formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(méthoxyoxycarbonyl)-butanoate de *t*-butyle

III.2.1.2. Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-hydroxypentanoate de *t*-butyle

Afin d'obtenir la fonction hydroxylamine, l'ester en position 5 de l'acide aminé **46** doit être réduit en alcool. Cette réduction est effectuée en présence de borohydrure de sodium [265] dans un mélange eau et alcool isopropylique (1:4) et permet d'obtenir l'alcool **47** avec un rendement de 98% (Figure 103). La réaction doit être suivie très régulièrement afin d'éviter que l'ester en position 1 ne soit également réduit, formant le diol **48**.

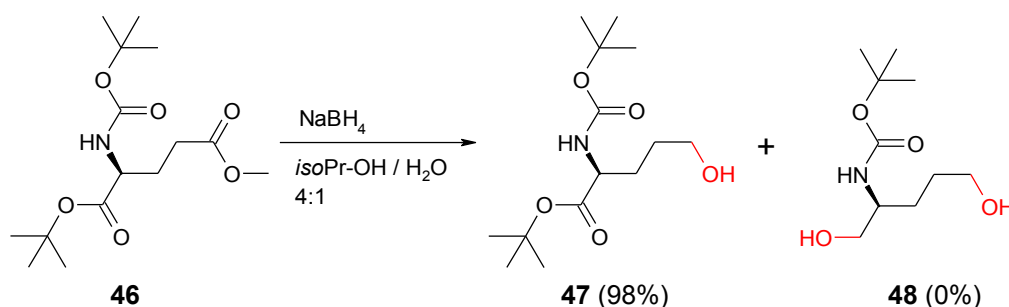


Figure 103 : Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-hydroxybutanoate de *t*-butyle

III.2.1.3. Formation du (2S) *N*⁵-(benzyloxycarbonyl)-*O*-(*t*-butyloxycarbonyl)-2-(*t*-butyloxycarbonyl amino)-5-(hydroxylamino)-pentanoate de *t*-butyle

L'alcool **47** obtenu doit être transformé en hydroxylamine protégée **51**. Pour cette étape la réaction de Mitsunobu a été choisie [258, 267-269, 312].

Les protections de l'hydroxylamine doivent être choisies de telle sorte que :

- l'ensemble des protections doivent être de type « alkyloxycarbonyl » pour permettre la réaction de Mitsunobu [264] car elles stabilisent la charge négative de l'azote nucléophile apparaissant lors de cette étape (Figure 106).
- il serait intéressant que la protection sur l'oxygène soit éliminée simultanément avec les dernières protections tertibutyloxycarbonyles,
- la déprotection de l'azote de l'hydroxylamine après la réaction de Mitsunobu, doit respecter les protections déjà présentes sur l'alcool **47**, ainsi elle ne doit pas s'effectuer en milieu acide.

Le groupement tertibutyloxycarbonyl a été choisi pour protéger l'oxygène [269, 313], et le groupement benzyloxycarbonyl pour l'azote. La réactivité de l'hydroxylamine se faisant en priorité sur l'azote [264, 269], la protection benzyloxycarbonyl s'effectue en premier à l'aide du chlorure de benzylchloroformate [310] ; le produit **49** est ainsi isolé avec un rendement de 93%. La seconde protection sur l'oxygène de **49** est introduite en présence de di-*ter*-butyldicarbonate [265] pour conduire au produit **50** avec un rendement de 87%.

50 est obtenu avec un rendement de 81% à partir du chlorhydrate d'hydroxylamine (Figure 104).

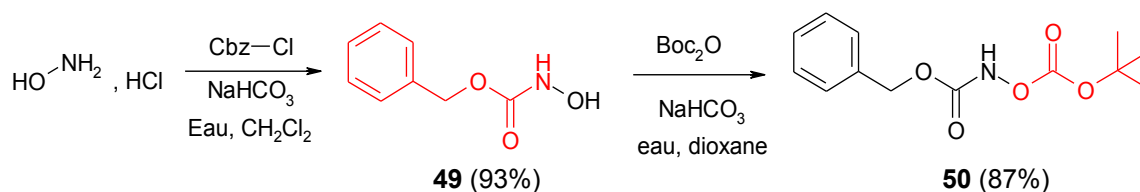


Figure 104 : Mécanisme de formation de la *N*-benzyloxycarbonyl-*O*-(*t*-butyloxycarbonyl)-hydroxylamine

La réaction de Mitsunobu [265, 269] entre l'alcool **48** et la molécule **50** conduit à l'intermédiaire **51** (Figure 106). Le produit **51** est obtenu avec un rendement de 47% (Figure 105).

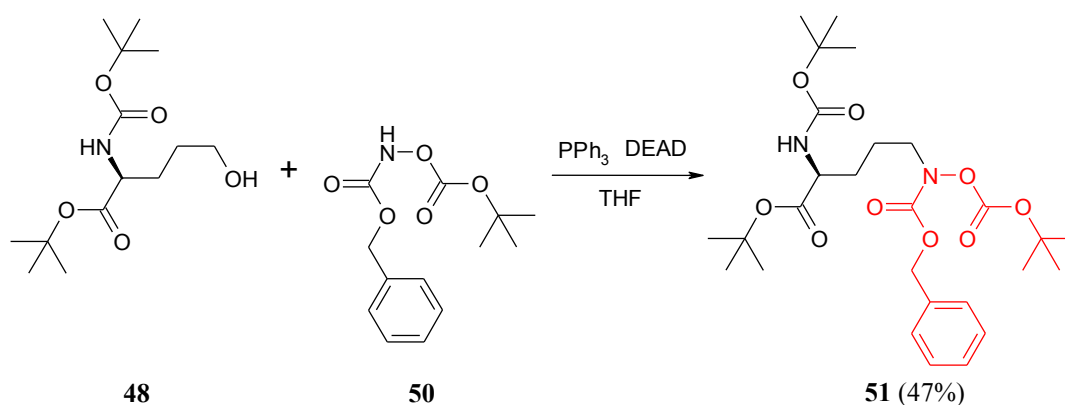


Figure 105 : Formation du (2*S*) *N*⁵-(benzyloxycarbonyl)-*O*-(*t*-butyloxycarbonyl)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(hydroxylamino)pentanoate de *t*-butyle

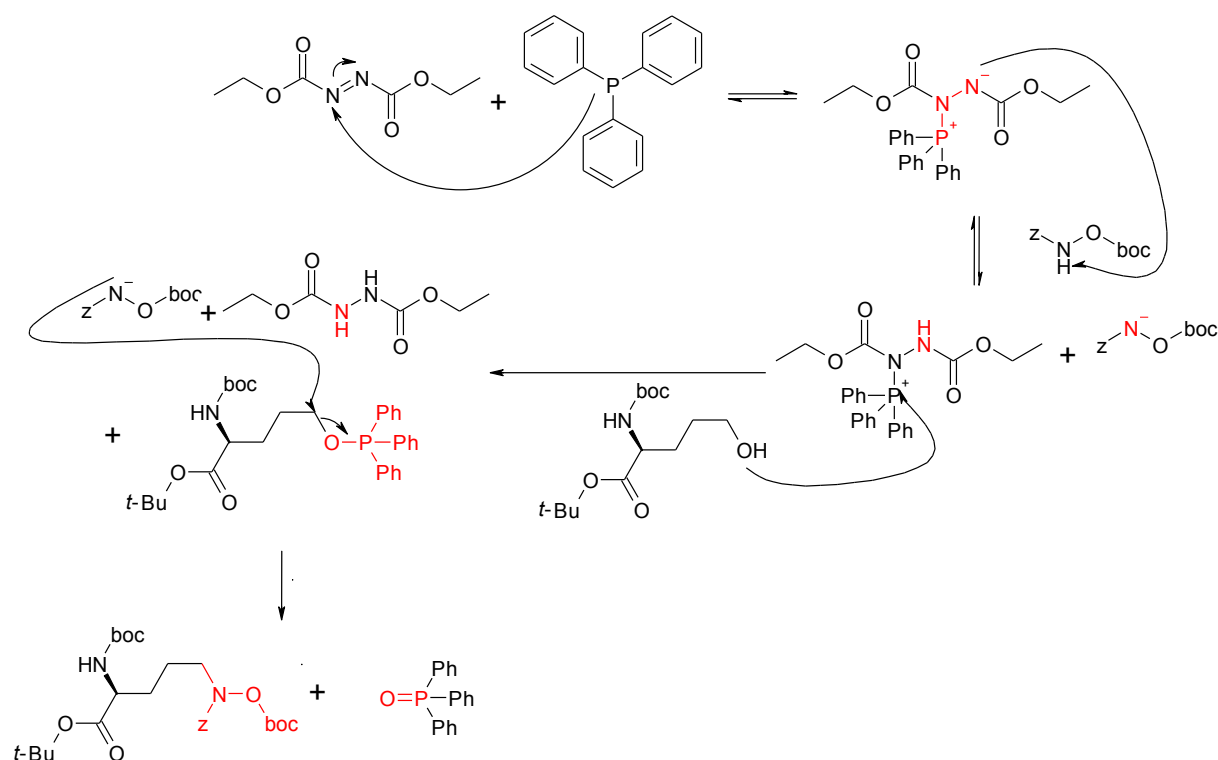


Figure 106 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu [314-316]

III.2.1.4. Formation du (2S) *O*-(*t*-butyloxycarbonyl)-2-(*t*-butyloxycarbonyl amino)-5-(hydroxylamino)-pentanoate de *t*-butyle

Afin d'obtenir la *N*-oxyornithine **52**, la protection benzyloxycarbamate de la molécule **51** doit être éliminée, la méthode de choix est l'hydrogénation catalytique sur charbon palladié [280, 315, 317, 318].

51 est inerte lors de l'utilisation de charbon palladié à 5%. Le produit obtenu après hydrogénation sur charbon palladié 10% n'est pas le produit souhaité. Le spectre RMN du carbone et du proton montre la perte de l'une des trois fonctions tertibutyliques.

Afin de déterminer la position du groupement perdu, une analyse par ESI⁺-MS a été effectuée, donnant une masse de $m/z = 289$ ($C_{14}H_{28}N_2O_4 + H^+$) ; ainsi la molécule obtenue est l'ornithine protégée **53** (Figure 107). Le groupement contenant une partie tertibutylique est celui porté par l'oxygène de la fonction hydroxylamine terminale. La perte de ce groupement s'effectue avec le départ de l'oxygène porté sur l'hydroxylamine formant alors l'amine terminale de l'ornithine protégée **53**.

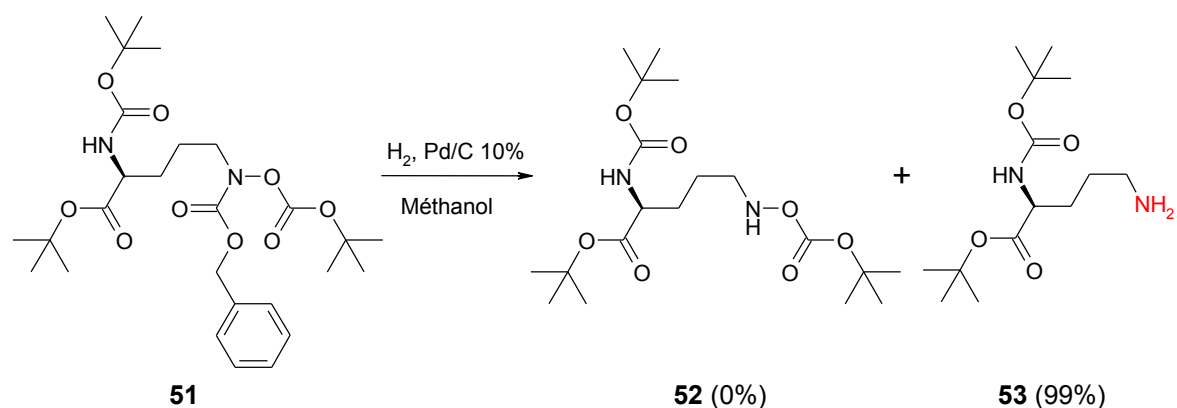


Figure 107 : Formation du (2S) 2-(*t*-butoxycarbonylamino)-5-(hydroxylamino)pentanoate de *t*-butyle

Des cas de rupture de la liaison N-O ont été reportés lors d'hydrogénation d'hydroxylamine [258, 282], indiquant une hydrogénation de la liaison dans certains cas. Ainsi, le mécanisme d'obtention du produit **53** doit se faire probablement en deux étapes (Figure 108). La première correspond à l'hydrogénation de la protection « benzylcarbamate » pour former le produit **52**. Ensuite, une seconde étape d'hydrogénation a lieu par coupure de la liaison N-O de l'hydroxylamine pour conduire à **53**.

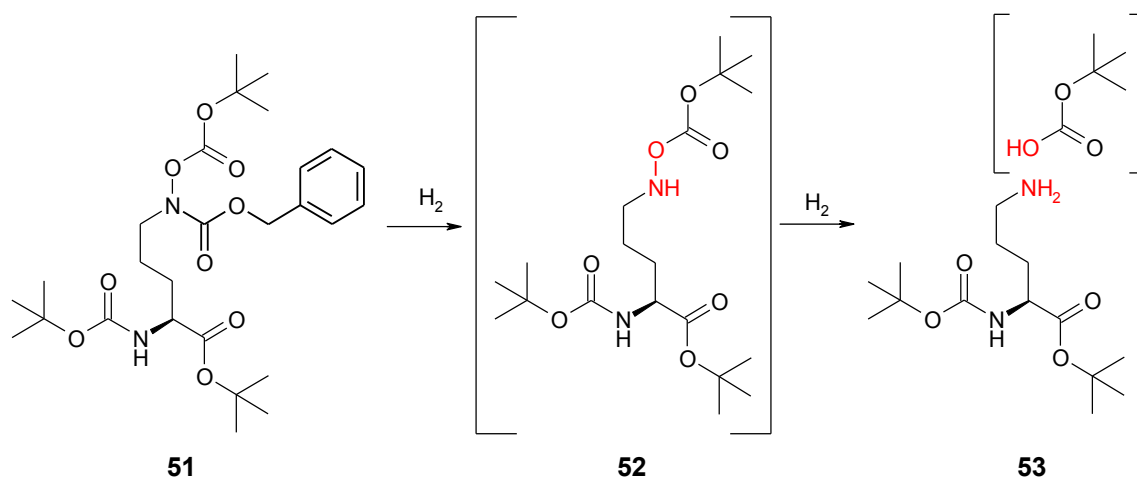


Figure 108 : Mécanisme de formation de l'ornithine protégée 53 à partir de 51

Pour pallier à la rupture de la liaison N-O, il est possible dans certains cas de réaliser la réaction de formation de l'hydroxamate directement à la suite de l'hydrogénation par l'utilisation de l'anhydride acétique comme solvant de l'hydrogénation [318]. Ainsi l'azote déprotégé de la molécule **52** pourrait être directement acétylé. Cette procédure n'est pas applicable dans notre cas, car l'acide **37** possède une double liaison qui peut être hydrogénée au cours de la réaction.

III.2.1.5. Conclusion

Cette stratégie de formation de la fonction hydroxylamine, ne conduit pas à la molécule **52** souhaitée (Figure 109). Lors de la dernière étape d'hydrogénation appliquée à **51**, le produit attendu issu de la déprotection de l'azote de l'hydroxylamine se forme, mais la réaction continue et aboutit à la formation de l'amine **53** avec un rendement de 32% à partir de l'acide glutamique.

Une solution pour obtenir l'hydroxylamine **52** pourrait être en première intention un contrôle strict de la quantité d'hydrogène ajouté lors de la dernière étape. Cependant, une autre solution serait de modifier le choix de la protection de l'azote vers d'autres protections de type carbamate ne s'éliminant pas par hydrogénation. Il existe alors plusieurs choix possibles décrits dans la littérature [269] : allylcarbamate [267, 278], trichloroethylcarbamate [267, 268], triméthylsilyléthylcarbamate.

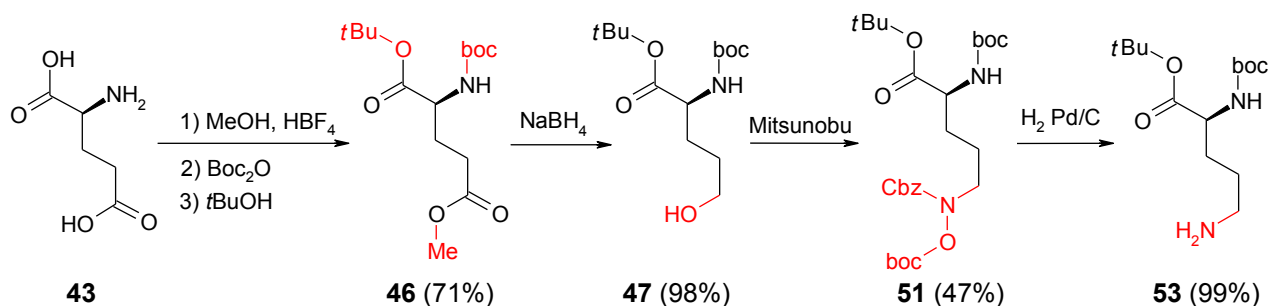


Figure 109 : Résumé de la formation de l'ornithine protégée **53** à partir d'acide glutamique

III.2.2. Par oxydation directe de l'amine terminale

Une seconde méthode doit permettre de synthétiser l'hydroxylamine nécessaire à la formation de la fusarinine, par oxydation directe de l'amine terminale de l'ornithine [290, 291]. Pour ce faire, l'ornithine doit être protégée. La fonction acide sera transformée en fonction ester tertibutylique et l'amine en position 2 sera protégée par le groupement tertibutylcarbamate. Ces deux protections pouvant ensuite être éliminées dans les mêmes conditions [290, 291, 311].

III.2.2.1. Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-aminopentanoate de *t*-butyle

Le synthon de départ utilisé est l'acide (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(*t*-butyloxycarbonylamino)-pentanoïque **54**. Il est disponible commercialement. Les deux fonctions amines présentes sur l'ornithine sont alors faciles à différencier. **54** peut également être obtenu en deux étapes à partir de l'ornithine avec un rendement de 62% (Figure 110) [319, 320].

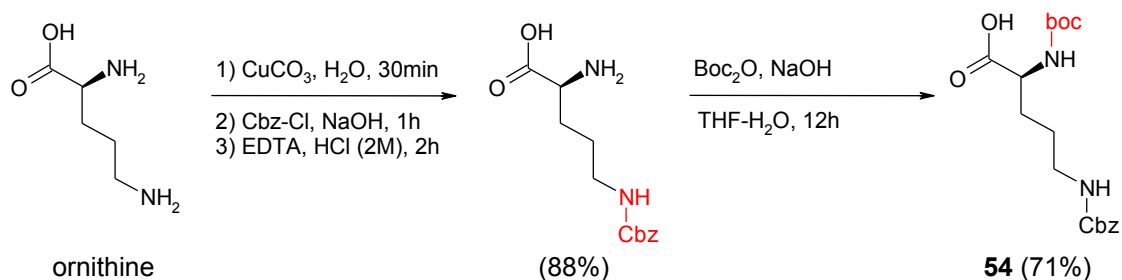


Figure 110 : Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(*t*-butyloxycarbonylamino)pentanoïque [319]

L'ornithine **53**, protégée en 1 par une fonction ester tertibuthylique et en 2 par un groupement boc peut être obtenue en deux étapes à partir de l'ornithine **54** (Figure 111). La première consiste en la protection de l'acide carboxylique par une fonction ester tertibuthylique afin d'obtenir la molécule **55**. L'hydrogénation de cette dernière aboutit à l'amine primaire **53**.

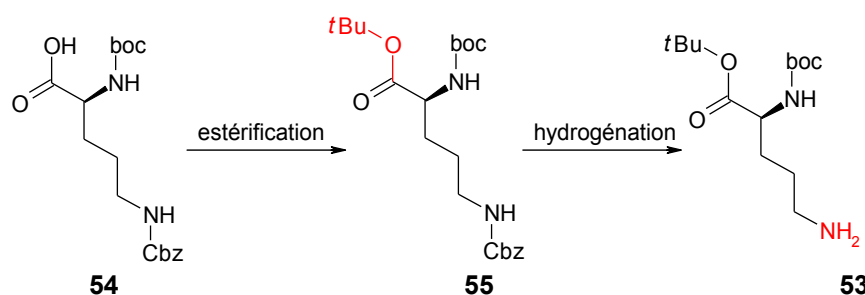


Figure 111 : Stratégie d'obtention du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-aminopentanoate de *t*-butyle

Plusieurs tentatives d'estérification de l'acide carboxylique **54** par le tertibutanol ou par le tertibutanoate de potassium, en présence de DCC et de DMAP [321, 322] ont été effectuées sans succès (Figure 112). L'utilisation de ditertibuthylacétale de diméthylformamide [323-325], réactif commercial, qui a permis la formation de l'ester **55** avec un rendement de 42% après 3 heures de reflux. L'optimisation du rendement de la réaction n'a pu être réalisée ni en chauffant à une température plus élevée, ni en augmentant la

durée de la réaction. En effet, un second produit est systématiquement formé lors de la réaction, il s'agit de l'ester méthylique **56** (rendement de 55%). L'utilisation de la technique micro-ondes n'a pas permis d'améliorer le rendement de la réaction, ni de diminuer la quantité d'ester **56** formé, cependant le temps de réaction est réduit à 10 minutes.

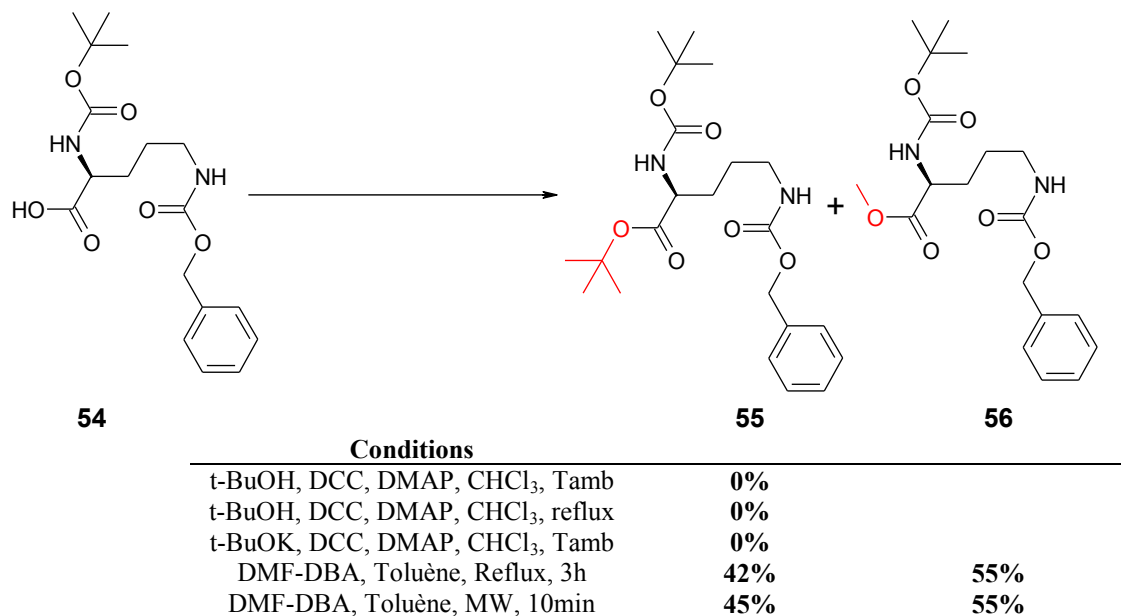


Figure 112 : Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(*t*-butyloxycarbonylamino)pentanoate de *t*-butyle

D'autres solutions pour effectuer cette estérification peuvent être apportées par l'utilisation de *N,N'*-diisopropyl-*O*-(*t*-butyl)-isourée en présence de tertibutanol en chauffant à 50°C. Cette méthodologie permet, à partir d'un réactif non commercial, d'obtenir un rendement presque quantitatif [292, 326].

L'ester **55** est alors hydrogéné ce qui permet la libération de la fonction amine terminale et l'obtention du produit **53** avec un rendement de 99% (Figure 113) [314].

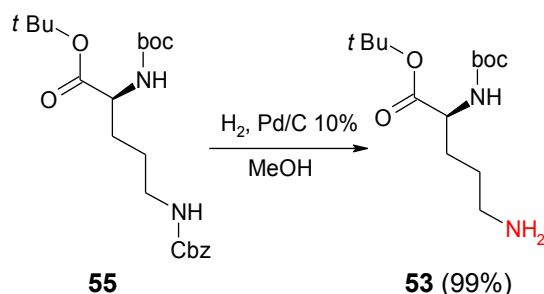


Figure 113 : Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-aminopentanoate de *t*-butyle

III.2.2.2. Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(benzoyloxyamino)pentanoate de *t*-butyle

L'oxydation de la molécule **53** doit permettre l'obtention de la N-oxyornithine **59**. D'après la littérature, les meilleurs réactifs utilisés pour l'oxydation d'amide en hydroxylamine sont le peroxyde de dibenzoyle [282-285] ou l'acide metachloroperoxybenzoïque [286]. L'utilisation du peroxyde de dibenzoyle est préférée car il a déjà été appliqué à l'oxydation de la fonction amine terminale d'acide aminé : lysine (C₆) [285, 327], ornithine (C₅) [282]. Cette oxydation se fait en milieu biphasique eau/dichlorométhane, initialement en présence de Na₂CO₃ [285, 286, 328]. Lors de l'oxydation de l'amine en hydroxylamine **58**, un produit secondaire de la réaction correspondant à l'amide **57** se forme (Figure 114). La formation de ce produit secondaire est particulièrement influencée par le pH de la phase aqueuse. L'utilisation d'un pH à 10,5 permet de limiter la formation de ce sous produit (rendement inférieur à 15%) [283, 327, 329, 330]. La formation de l'amide **57** peut encore être diminuée par l'utilisation d'un solvant polaire aprotique, tel que le diméthylformamide, et en contrôlant la présence d'ions H⁺ grâce à l'apport dans le milieu d'hydrogénophosphate dipotassique [284].

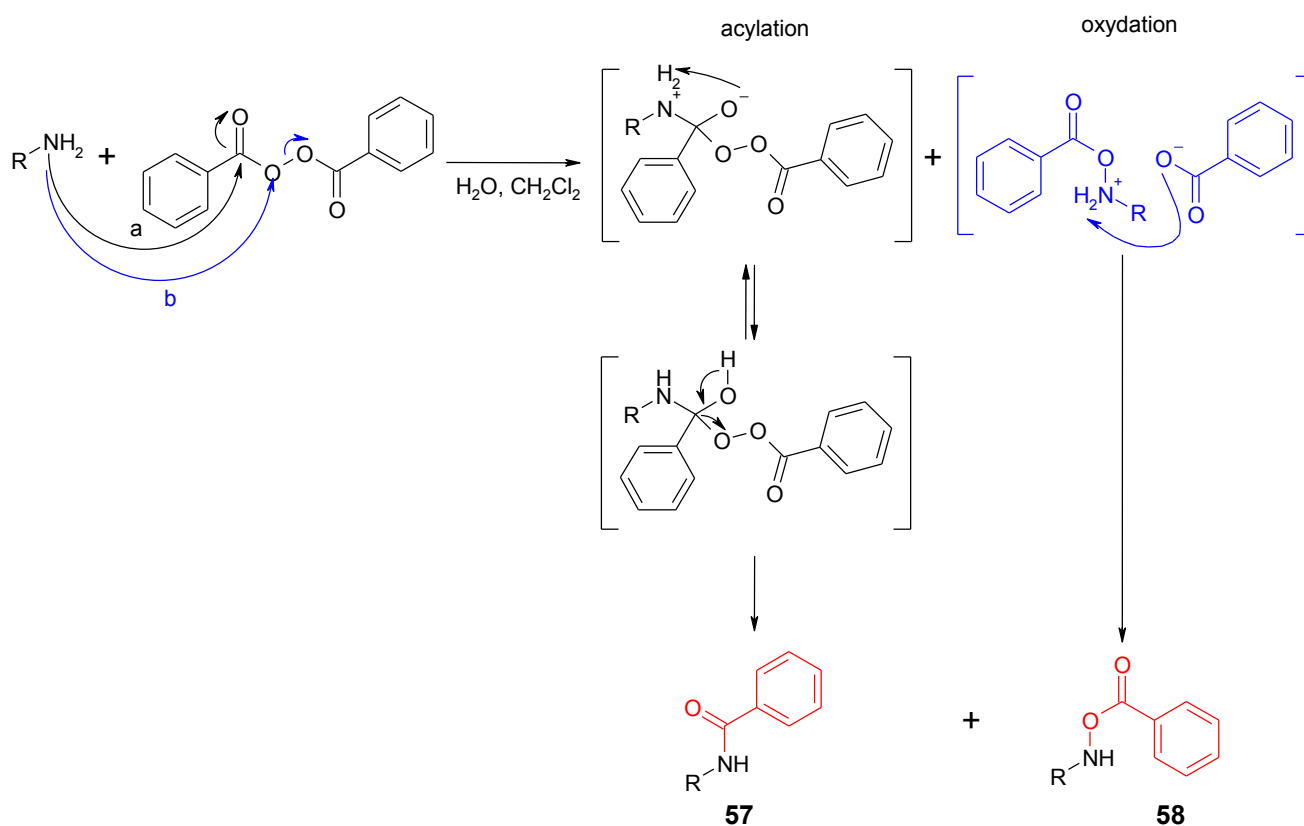


Figure 114 : Mécanisme d'oxydation et d'acylation d'une amine par le peroxyde de dibenzoyle [331]

Nous avons appliqué le protocole de Berman et coll. [284] et avons toujours observé un mélange comme précédemment. Pour ce type de réaction, l'eau est un constituant essentiel permettant de stabiliser le peroxyde de dibenzoyle. Considérant que l'absence d'eau pourrait être cruciale dans ce type de réaction, plusieurs méthodes ont été entreprises pour contrôler ce paramètre : ajout de sulfate de sodium ou de tamis moléculaire dans le milieu, filtration sur sulfate de magnésium du mélange DMF/BPO. Le suivi des différents essais de réaction (Figure 115) montre que l'eau doit être éliminée en amont de la réaction et que toute trace dans le milieu provoque la formation de l'impureté **57**.

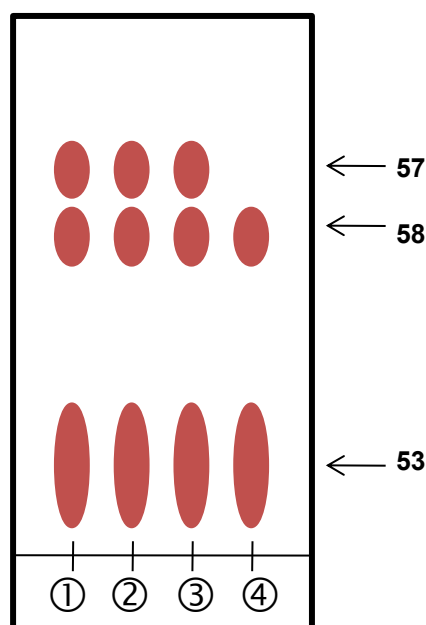


Figure 115 : CCM de comparaison des différentes méthodes de séchage du BPO au cours de la réaction (silice, 2:98 méthanol/dichlorométhane, révélation par de la ninhydrine) ; 1) pas de séchage, 2) ajout de sulfate de sodium dans le milieu, 3) ajout de tamis moléculaire dans le milieu, 4) filtration du mélange DMF/BPO sur sulfate de magnésium

Ainsi, dans ces conditions, l'oxydation de l'amine **53** conduit à l'hydroxylamine **59** avec un rendement de 47% (Figure 116). Il faut noter qu'il reste lors de la réaction du produit de départ **53** pouvant être recyclé.

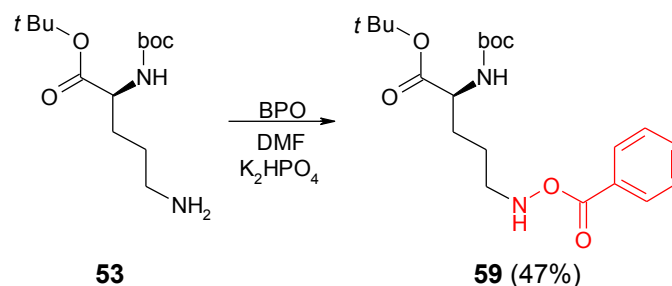


Figure 116 : Formation du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(phénylcarboxyloxyamino)-pentanoate de *t*-butyle

III.2.3. Conclusion

La seconde stratégie d'obtention de la partie oxyornithine, permet d'isoler la *N*²-(*ter*-buthyloxycarbonyl)-*N*⁵-(phénylcarboxyloxy)-*O*-(*ter*-buthyl)-ornithine **59** avec un rendement de 21% à partir de la *N*²-(*ter*-buthyloxycarbonyl)-*N*⁵-(benzyloxycarbonyl)-ornithine **54** (Figure 117).

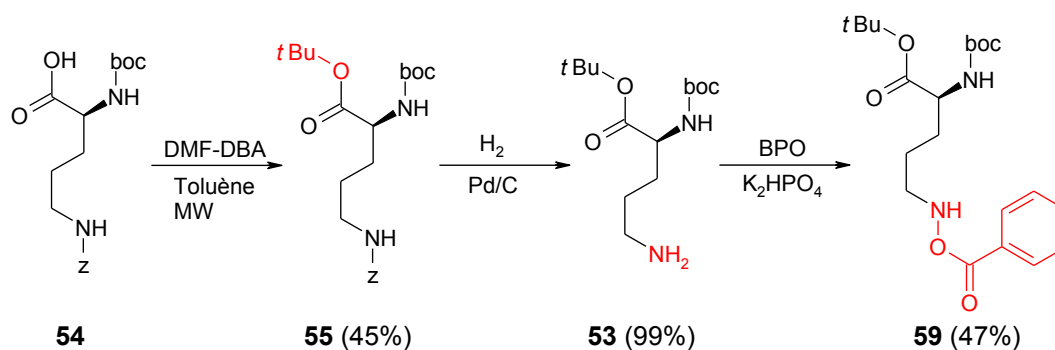


Figure 117 : Synthèse de la *N*⁵-oxyornithine

Le rendement permettant d'obtenir cette molécule reste faible, et plusieurs stratégies pourraient permettre de l'améliorer en modifiant les différentes étapes. Ce pourrait être le cas lors de la première étape en utilisant le *N,N'*-diisopropyl-*O*-*t*-buthylisouré en présence de tertibutanol en chauffant à 50°C [292, 326]. Selon la littérature, la troisième étape pourrait être optimisée [283, 284, 327, 329, 330].

III.3. Synthèse de la fusarinine protégée

La structure fusarinine peut être obtenue grâce à un couplage peptidique entre la *N*⁵-oxyornithine **59** et l'acide deshydroxymévalonique **37**. La littérature fournit plusieurs hypothèses pour effectuer ce couplage. Dans tous les cas, l'acide **37** doit être activé [332]. Il est possible de transformer l'acide en chlorure d'acyle *via* l'utilisation de chlorure de thionyle

ou le chlorure d'oxalyle [333]. Une seconde solution consiste en l'activation par la méthode des carbodiimides tels que le dicyclohexylcarbodiimide ou le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide [327].

Ces deux stratégies ont été tentées afin d'obtenir la fusarinine protégée **60**. Seule l'activation de l'acide **37b** par du chlorure de thionyle a conduit au produit souhaité **60** avec un rendement de 4,2% (Figure 118).

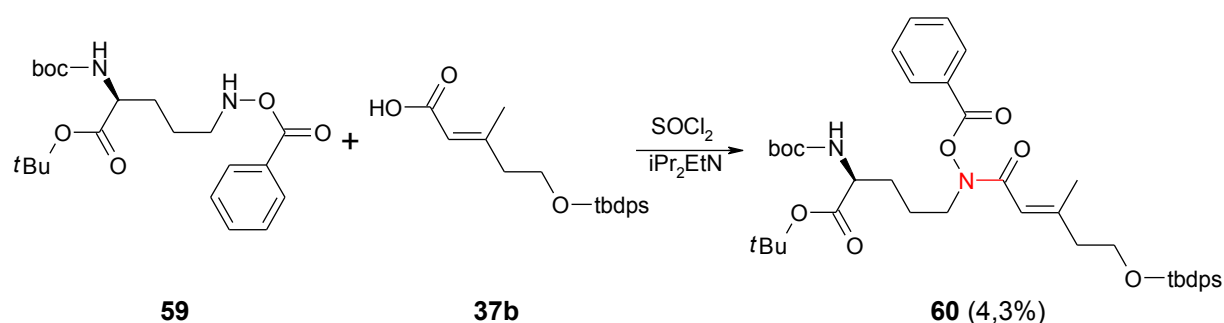


Figure 118 : synthèse de la fusarinine protégée

La méthode de spectrométrie de masse par ionisation négative en électrospray a mis en évidence un ion moléculaire $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ de $m/z=793$ correspondant à **60**. Un pic de fragmentation $m/z=537$ est également noté (Figure 119).

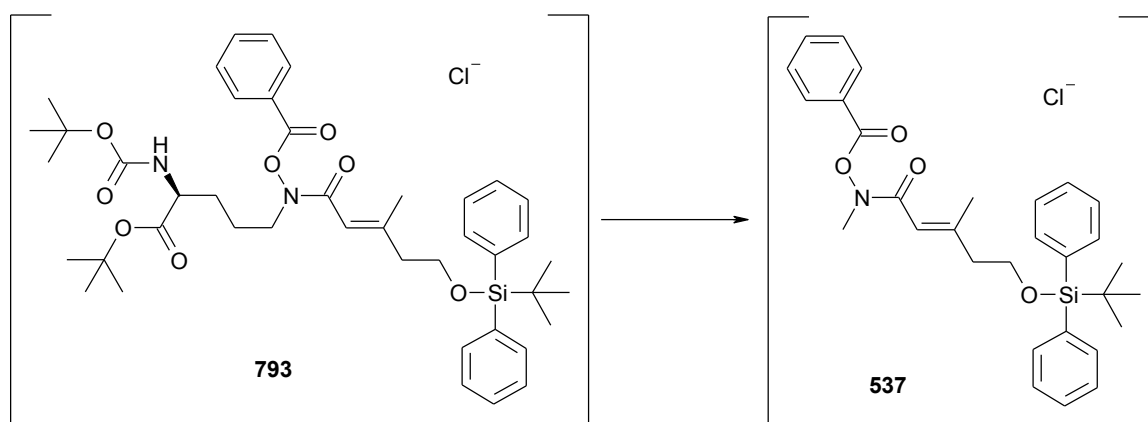


Figure 119 : Fragmentation par spectrométrie de masse obtenue par ionisation négative en électrospray de la molécule 60

Pour obtenir la fusarinine **62**, deux étapes restent à réaliser (Figure 120). Une première étape pourrait consister en la déprotection du groupement benzoyle sur la fonction hydroxamate *via* l'utilisation d'ammoniac méthanolique [282-285]. La seconde pourrait consister en une déprotection simultanée en milieu acide des trois dernières protections.

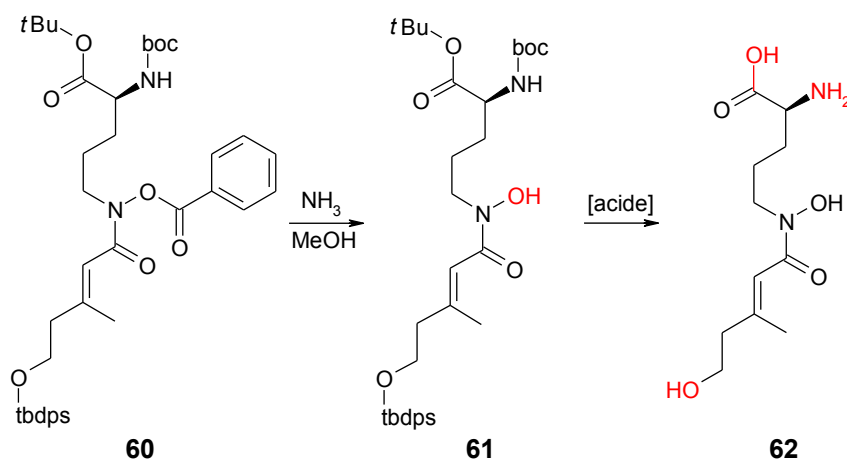


Figure 120 : Déprotection de la fusarinine

IV. Conclusions

Pour la première fois, un précurseur de la fusarinine a été synthétisé avec un rendement de 2%. Notre prochain objectif consistera à augmenter le rendement global de notre synthèse.

Ceci ouvre la voie à la synthèse d'un grand nombre de nouvelles molécules comme, par exemple, les deux sidérophores sécrétés par *S. apiospermum* (l'acide dimérumique ou le N^α-méthyl coprogène B) ou un grand nombre d'autres sidérophores de type asperchrome, coprogène ou fusarinine (Figure 122) [175].

De plus, la fusarinine protégée **60** obtenue permet d’imaginer plusieurs stratégies de déprotection permettant de fonctionnaliser ultérieurement la molécule (Figure 121). Ainsi un grand nombre de molécules peut être imaginé à partir de ce squelette de base.

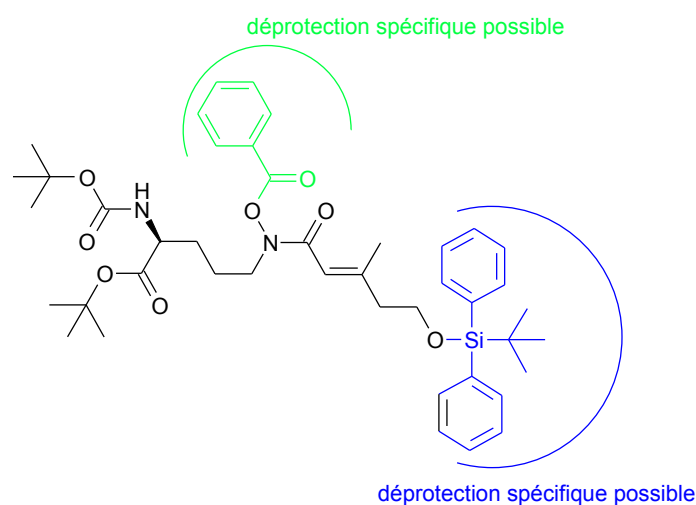


Figure 121 : Spécificité des protections de la fusarinine 60

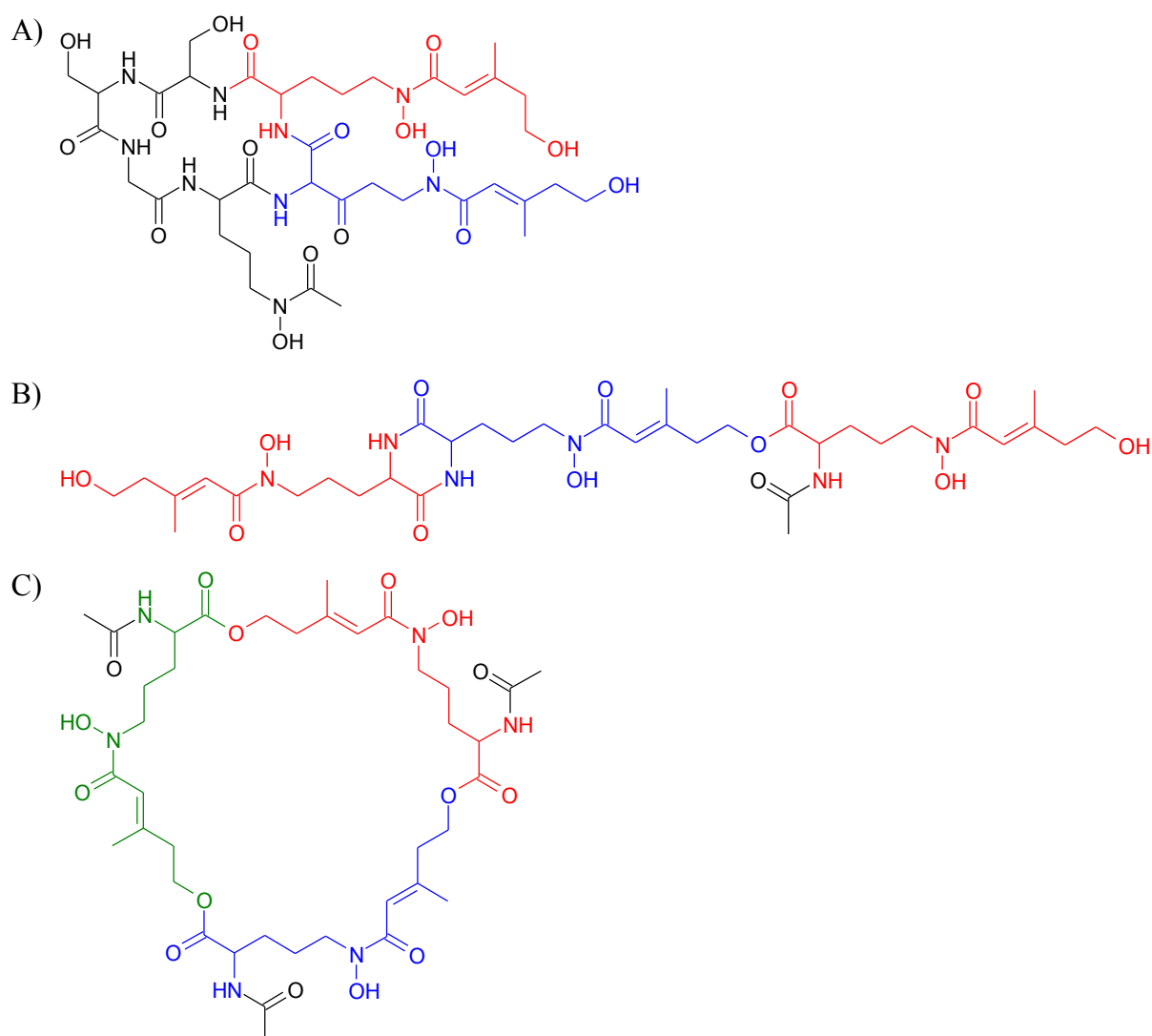


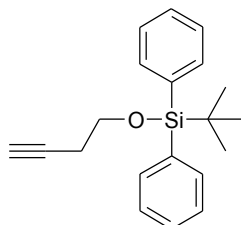
Figure 122 : Autres sidérophores ayant la fusarinine comme synthon de base ; A) asperchrome B1, B) coprogène, C) N,N',N''-Triacetylfusarinine C [5]

V. Matériel et méthodes

L'ensemble des réactifs et des solvants a été fourni par Acros, Aldrich, Avocado, Carlo Erba, Fluka, Lancaster et VWR. L'ensemble des réactions a été suivi par Chromatographie sur Couche Mince Merck SilicaGel 60F₂₅₄ (0,25 mm) en plaque aluminium. Les produits obtenus ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice Chromagel 60ACC (40-63 nm) de chez Carlo Erba. Les points de fusion ont été déterminés par un Electrothermal 8100 et sont reportés sans correction. Les spectres infrarouges ont été effectués sur plaque KBr ou par ATR à l'aide d'un Bruker Vector 22 à transformée de Fourier. Les spectres RMN ¹H et ¹³C

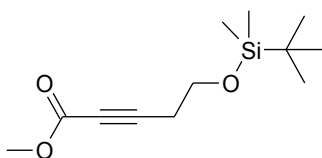
ont été effectués dans le chloroforme ou l'eau deutériées [334]. sur un Jeol GSX 270WB. Les analyses 2D ont été effectuées sur un Bruker 500 MHz. Les spectres de masse ont été réalisés par la Plateforme Intégrée d'Analyse Moléculaire (PIAM).

V.1. Synthèse du 4-(*t*-butyldiphénylsilanyloxy)but-1-yne (**31d**)



La procédure de Nicolaou et coll. a été utilisée [264]. Dans 35ml de dichlorométhane, 1,75 ml de but-3-yn-1-ol (23,1 mmol), 2,51 g d'imidazole (37,0 mmol) et 0,22g de paradiméthylaminopyridine (1,79 mmol) sont ajoutés, puis le tout est agité. Ensuite 5 ml de chlorure de tertibutyldiphénylsilanyle (19,0 mmol) sont ajoutés à 0°C et la réaction est laissée agitée 30 minutes. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 25 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 1 N puis agitée 30 minutes. Le produit de la réaction est alors extrait par 3 fois avec 50 ml de dichlorométhane et la phase organique est lavée par 3 fois avec 20 ml d'une solution de chlorure de sodium saturée. La phase organique est alors séchée avec du sulfate de sodium anhydre et évaporée pour obtenir 5,514 g de l'éther **31d** (18,9 mmol, 99%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,72(d, 4H), 7,4(m, 6H), 3,82(t, 2H, 7Hz), 2,48(t+d, 2H, 7Hz+3Hz), 2,0(t, 1H, 3Hz) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 135,5(CH arom.), 133,6(C quat. arom.), 129,7(CH arom.), 127,7(CH arom.), 81,5(C quat. alcyne), 69,3(CH alcyne), 62,4(CH_2), 26,8(CH_3), 22,6(CH_2), 19,2(C quat.) ; Mass (ESI+) $m/z=331,0[\text{M}+\text{Na}]^+$.

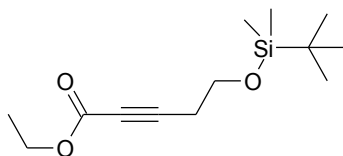
V.2. Synthèse du 5-(*t*-butyldiméthylsilanyloxy)pent-2-ynate de méthyle (**32a**)



Dans un ballon de 100 ml préalablement séché, 1 ml de diisopropylamine (7,11 mmol) sèche est ajouté à 26 ml de tétrahydrofurane sec à -75°C. Ensuite 5,6 ml d'une solution de *n*-butyllitium 2 M (11,2 mmol) dans du cyclohexane sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité à

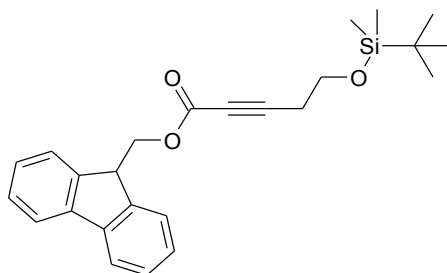
0°C pendant 10 minutes. A -75°C, 1,9 ml de 4-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-1-butyne (9,20 mmol) est ajouté au mélange qui est ensuite agité pendant 30 minutes. Puis 2,3 ml de chloroformate de méthyle (29,77 mmol) sont ajoutés, et le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite suspendu dans 50 ml de diéthyléther, puis filtré sur verre fritté. Le filtrat est évaporé. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur silice dans une colonne avec 86 g de silice ; l'éluant utilisé est (1:10) diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 2,09 g de produit **32a** sont obtenus (8,66 mmol, 94%). RMN ¹H (CDCl₃) δ(ppm) 3,77(t, 2H, 7Hz), 3,75(s, 3H), 2,54(t, 2H, 7Hz), 0,89(s, 9H), 0,07(s, 6H) ; ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 154,2(C=O), 86,9(C quat.), 73,8(C quat.), 59,8(CH₂), 52,67(CH₃), 22,8(CH₃), 22,7(CH₂), 19,0(C quat.), -5,3(CH₃) ; Mass (ESI+) m/z=265,1 [M+Na]⁺ ; IR (ATR, cm⁻¹) 2244(C≡C), 1717(C=O), 1251(Si-CH₃), 1075(Si-O).

V.3. Synthèse du 5-(*t*-butyldiméthylsilanyloxy)pent-2-ynate d'éthyle (**32b**)



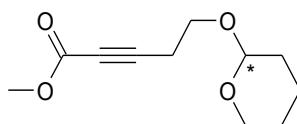
Dans un ballon de 100 ml préalablement séché, 3,83 ml de diisopropylamine (27,2 mmol) sèche sont ajoutés à 70 ml de tétrahydrofurane sec à -75°C. Ensuite 12,9 ml d'une solution de *n*-butyllitium 2 M (25,8 mmol) dans du cyclohexane sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité à 0°C pendant 10 minutes. A -75°C, 5 ml de 4-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-1-butyne (24,2 mmol) sont ajoutés au mélange qui est ensuite agité pendant 30 minutes. Puis 7 ml de chloroformate d'éthyle (73,21 mmol) sont ajoutés, et le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est enfin suspendu dans 200 ml de diéthyléther, puis filtré sur verre fritté. Le filtrat est évaporé. 8,96 g de produit **32b** sont obtenus (35,0 mmol, 95%). RMN ¹H (CDCl₃) δ(ppm) 4,14(q, 2H), 3,73(t, 2H), 1,25(t, 3H), 0,85(s, 9H), 0,04(s, 6H) ; ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 153,5(C=O), 86,2(C quat.), 74,0(C quat.) 61,8(CH₂), 60,7(CH₂), 25,8(CH₃), 23,1(CH₂), 18,3(C quat.), 14,0(CH₃), -5,4(CH₃) ; Mass (ESI+) m/z = 279,0[M+Na]⁺.

V.4. Synthèse du 5-(*t*-butyldiméthylsilanyloxy)pent-2-ynate de fluorényle (32c)



Dans un ballon préalablement séché, 0,25 ml de diisopropylamine (1,78 mmol) sèche est ajouté à 6,5 ml de tétrahydrofurane sec à -75°C. Ensuite 1,27 ml d'une solution de *n*-butyllithium 2,2 M (2,79 mmol) dans du cyclohexane est ajouté. Le mélange est ensuite agité à 0°C pendant 10 minutes. A -75°C, 0,5 ml de 4-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-1-butyne (2,42 mmol) est ajouté au mélange qui est ensuite agité pendant 30 minutes. Puis 1,925 g de chloroformate de 9-fluorényle (7,44 mmol) est ajouté, et le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite suspendu dans 50 ml de diéthyléther, puis filtré sur verre fritté. Le filtrat est évaporé. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur silice dans une colonne de silice (×30) ; l'éluant utilisé est (1:10) diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 0,376 g de produit **32c** est obtenu (0,925 mmol, 38%). RMN ¹H (CDCl₃) δ(ppm) 7,77(d, 2H, 7,6Hz), 7,63(d, 2H, 7,3Hz), 7,42(t+d, 2H, 7,3Hz+1,3Hz), 7,33(t+d, 2H, 7,6Hz+1,3Hz), 4,43(d, 2H, 7,6Hz), 4,29(t, 1H, 7,6Hz), 3,84(t, 2H, 6,6Hz), 2,62(t, 2H, 6,6Hz), 0,93(s, 9H), 0,12(s, 6H) ; ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 152,6(C=O), 143,5(C quat. arom.), 141,3(C quat. arom.), 127,9(CH arom.), 127,2(CH arom.), 125,1(CH arom.), 120,0(CH arom.), 87,4(C quat. alcyne), 73,9(C quat. alcyne), 67,7(CH₂), 60,7(CH₂), 46,5(CH), 25,8(CH₃), 23,3(CH₂), 18,3(C quat.), -5,3(CH₃).

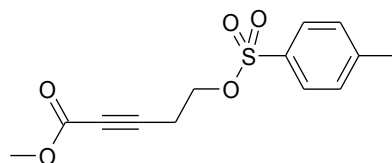
V.5. Synthèse du 5-(tetrahydropyranyloxy)pent-2-ynate de méthyle (32d)



Dans un ballon de 100 ml préalablement séché, 2,5 ml de diisopropylamine (17,78 mmol) sèche sont ajoutés à 55 ml de tétrahydrofurane sec à -75°C. Ensuite 12,7 ml

d'une solution de *n*-butyllitium 2,2 M (27,94 mmol) dans du cyclohexane sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité à 0°C pendant 10 minutes. A -75°C, 3,6 ml de 4-(tetrahydropyranyloxy)-1-butyne (22,97 mmol) sont ajoutés au mélange qui est ensuite agité pendant 30 minutes. Puis 5,75 ml de chloroformate de méthyle (74,42 mmol) sont ajoutés, et le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite suspendu dans 100 ml de diéthyléther, puis filtré sur verre fritté. Le filtrat est évaporé. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur silice dans une colonne de silice (×30) ; l'éluant utilisé est (1:10) diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 3,011 g de produit **32d** sont obtenus (14,2 mmol, 62%). RMN ¹H δ(ppm) 4,59(t, 1H, 3,5Hz), 3,8(m, 2H), 3,70(s, 3H), 3,55(m, 1H), 3,45(m, 1H), 2,59(t, 2H, 6,7hz), 1,8-1,4(m, 6H) ; ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 153,8(C=O), 98,6(CH), 86,5(C quat.), 73,4(C quat.), 64,3(CH₂), 62,0(CH₂), 52,1(CH₃), 30,328(CH₂), 25,2(CH₂), 20,1(CH₂), 19,1(CH₂) ; Mass (EI) m/z = 210,9[M-H]⁻.

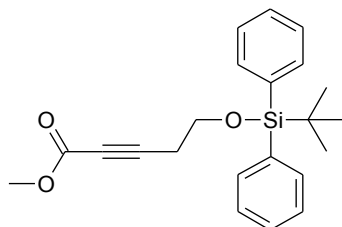
V.6. Synthèse du 5-(p-toluènesulfonyloxy)pent-2-ynate de méthyle (**32e**)



Dans un ballon de 100 ml préalablement séché, 2,5 ml de diisopropylamine (17,78 mmol) sèche sont ajoutés à 55 ml de tétrahydrofurane sec à -75°C. Ensuite 12,7 ml d'une solution de *n*-butyllitium 2,2 M (27,9 mmol) dans du cyclohexane sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité à 0°C pendant 30 minutes. A -75°C, 4,9 ml de 4-(paratoluènesulfonyloxy)-1-butyne (27,7 mmol) sont ajoutés au mélange qui est ensuite agité pendant 30 minutes. Puis 5,75 ml de chloroformate de méthyle (74,42 mmol) sont ajoutés, et le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite suspendu dans 100 ml de diéthyléther, puis filtré sur verre fritté. Le filtrat est évaporé. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur silice dans une colonne de silice (×30) ; l'éluant utilisé est (1:10) diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 0,291 g de produit **32e** est obtenu (1,03 mmol, 4%). RMN ¹H δ(ppm) 7,7(d, 2H, 8Hz), 7,3(d, 2H, 8Hz), 4,1(t, 2H, 7Hz), 3,7(s, 3H), 2,7(t, 2H, 7Hz), 2,4(s, 3H) ; ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 153,5(C=O), 145,2(C arom., quat.), 132,6(C arom., quat.), 130,0(CH arom.), 128,0(CH arom.), 83,0(C quat.), 74,5(C

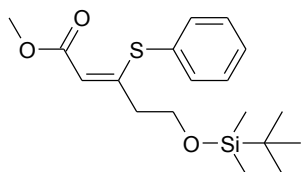
quat.), 66,1(CH₂), 52,7(CH₃), 21,6(CH₃), 19,7(CH₂) ; Mass (ESI+) $m/z = 283,0[M+H]^+$, $m/z = 305,0[M+Na]^+$.

V.7. Synthèse du 5-(*t*-butyldiphénylsilanyloxy)pent-2-ynate de méthyle (32f)

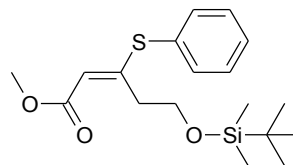


Dans un ballon de 100 ml préalablement séché, 2,0 ml de diisopropylamine (14,22 mmol) sèche sont ajoutés à 50 ml de tétrahydrofurane sec à -75°C. Ensuite 9,6 ml d'une solution de *n*-butyllitium 2 M (19,2 mmol) dans du cyclohexane sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité à 0°C pendant 30 minutes. A -75°C, 3,00 g de l'alcyne **31d** (9,72 mmol) sont ajoutés au mélange qui est ensuite agité pendant 30 minutes. Puis 4,56 ml de chloroformate de méthyle (59,5 mmol) sont ajoutés, et le mélange est agité à température ambiante pour une nuit. Le mélange est ensuite suspendu dans 100 ml de diéthyléther, puis filtré sur verre fritté. Le filtrat est évaporé. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur silice dans une colonne de silice (×20) ; l'éluant utilisé est (1:10) diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 2,972 g de produit **32f** sont obtenus (8,11 mmol, 83%). RMN ¹H δ(ppm) 7,7(m, 4H), 7,4(m, 6H), 3,8(t, 2H, 7Hz), 3,7(s, 3H), 2,6(t, 2H, 7Hz), 1,1(s, 9H) ; ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 153,2(C=O), 135,5(CH arom.), 133,5(C quat. arom.), 129,6(CH arom.), 127,6(CH arom.), 88,8(C quat. alcyne), 75,8(C quat. alcyne), 61,8(CH₂), 50,8(CH₃), 26,8(CH₃), 19,1(CH₂), 18,9(C quat.) ; Mass (ESI+) $m/z = [M+Na]^+$; Mass (ESI+) $m/z = 405,1[M+K]^+$.

V.8. Synthèse du (2Z) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (33a) et du (2E) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (34a)



33a

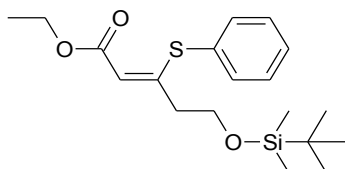


34a

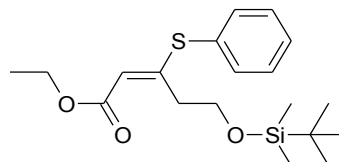
Dans un ballon de 50 ml, 1,0337 g de **32a** (4,27 mmol) et 550 μ l de thiophénol (5,38 mmol) sont ajoutés à 10 ml de méthanol. Après avoir agité pendant quelques minutes le mélange, 200 μ l de méthanolate de sodium fraîchement préparé y sont ajoutés. L'agitation est laissée pendant toute la nuit à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, et le solide obtenu est suspendu dans du diéthyldéther. La suspension est ensuite filtrée sur coton puis évaporée. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur silice dans une colonne avec 165 g de silice ; l'éluant utilisé est (1:10) diéthyldéther/éther de pétrole 40-65°C. 1,21 g de produit **33a** est obtenu (3,60 mmol, 84%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,5(m, 2H), 7,3(m, 3H), 5,899(s, 1H), 3,71(s, 3H), 3,507(t, 2H), 2,325(t, 2H), 0,782(s, 9H), 0,091(s, 6H) ; Mass (ESI+) $m/z=353,23$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z=726,5$ $[2\text{M}+\text{Na}]^+$; IR (ATR, cm^{-1}) 3060 (=C-H), 1703(C=O), 1581(C=C), 1254(Si-CH₃), 1091-(Si-O).

De plus 0,15 g de produit **34a** est obtenu (0,460 mmol, 10%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,5-7,2(m, 5H), 5,188(s, 1H), 3,917(t, 2H), 3,597(s, 3H), 3,112(t, 2H), 0,930(s, 9H), 0,107(s, 6H).

V.9. Synthèse du (2Z) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate d'éthyle (33b) et du (2E) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate d'éthyle (34b)



33b

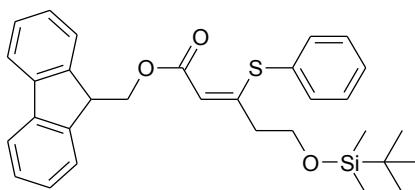


34b

Dans un ballon de 50 ml, 0,8866 g de **32b** (3,46 mmol) et 410 μ l de thiophénol (4,01 mmol) sont ajoutés à 10 ml de méthanol. Après avoir agité pendant quelques minutes le mélange, 17 mg de sodium (0,739 mmol) y sont ajoutés. L'agitation est laissée pendant toute la nuit à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, et le solide obtenu est suspendu dans du diéthyléther. La suspension est ensuite filtrée sur coton puis évaporée. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur colonne de silice ; l'éluant utilisé est 1:10 diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 0,650 g de produit **33b** est obtenu (1,86 mmol, 54%). RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,6-7,3(m, 5H), 5,91(s, 1H), 4,23(q, 2H, 7Hz), 3,54(t, 2H, 7Hz), 2,35(t, 2H, 7Hz), 1,30(t, 3H, 7Hz), 0,82(s, 9H), 0,06(s, 6H) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 165,9(C=O), 157,3(C quat), 135,6(CH arom.), 130,8(C quat. arom.), 129,7(CH arom.), 129,1(CH arom.), 113,5(CH alcène), 61,8(CH_2), 59,9(CH_2), 39,5(CH_2), 25,8(CH_3), 18,2(C quat.), 14,4(CH_3), -5,3(CH_3).

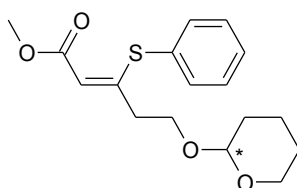
De plus, 0,110 g de produit **34b** est obtenu (0,314 mmol, 9%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,5-7,2(m, 5H), 5,2(s, 1H), 4,1(q, 2H, 8,5Hz), 3,9(t, 2H, 6,7Hz), 3,1(t, 2H, 6,7Hz), 1,2(t, 3H, 8,5Hz), 0,9(s, 9H), 0,1(s, 6H).

V.10. Synthèse du (2Z) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de fluorényle (33c)



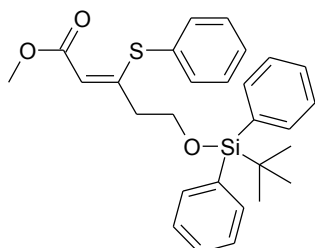
Dans un ballon de 50 ml, 0,364 g de **32c** (0,896 mmol) et 1,15 ml de thiophénol (0,00401 mol) sont ajoutés à 10 ml de méthanol. Après avoir agité pendant quelques minutes le mélange, 200 μ l de méthanolate de sodium fraîchement préparé y sont ajoutés. L'agitation est laissée pendant toute la nuit à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, et le solide obtenu est suspendu dans du diéthyléther. La suspension est ensuite filtrée sur coton puis évaporée. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur colonne de silice ; l'éluant utilisé est 1:10 diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 0,409 g de produit **33c** est obtenu (0,791 mmol, 88%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,8(d, 2H), 7,7(d, 2H), 7,6(m, 2H), 7,4-7,3(m, 7H), 6,1(s, 1H), 4,5(d, 2H, 7,6Hz), 4,3(t, 1H, 7,6Hz), 3,6(t, 2H, 6,6Hz), 2,4(t, 2H, 6,6Hz) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 165,9(C=O), 158,7(C quat.), 144,0(C quat. arom.), 141,3(C quat. arom.), 135,7(CH arom.), 130,8(C quat. arom.), 129,3(CH arom.), 127,6(CH arom.), 127,0(CH arom.), 125,1(CH arom.), 119,9(CH arom.), 113,1(CH alcène), 66,0(CH_2), 61,7(CH_2), 46,7(CH), 39,5(CH_2), 25,8(CH_3), 18,1(C quat.), -5,1(CH_3).

V.11. Synthèse du (2Z) 5-(tetrahydropyranyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (**33d**)

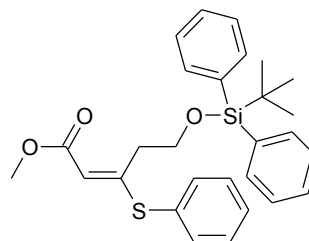


Dans un ballon de 100 ml, 3,011 g de **32d** (14,19 mmol) et 1,83 ml de thiophénol (17,82 mmol) sont ajoutés à 30 ml de méthanol. Après avoir agité pendant quelques minutes le mélange à 0°C, 700 μ l de méthanolate de sodium fraîchement préparé y sont ajoutés. L'agitation est laissée pendant toute la nuit à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, et le solide obtenu est suspendu dans du diéthyléther. La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté, puis le filtrat est évaporé. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur colonne de silice ; l'éluant utilisé est 1:10 diéthyléther/éther de pétrole 40-65°C. 3,819 g de produit **33d** sont obtenus (11,84 mmol, 84%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,5(m, 2H), 7,4(m, 3H), 5,9(s, 1H), 4,4(t, 1H, 3,9Hz), 3,8(s, 3H), 3,6(m, 2H), 3,4(m, 2H), 2,4(t, 2H, 6,6hz), 1,8-1,4(m, 6H) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 166,4(C=O), 157,9(C quat.), 135,8(CH arom.), 130,7(C quat. arom.), 129,8(C arom.), 129,1(C arom.), 112,9(CH alcène), 98,0(CH), 65,7(CH_2), 62,1(CH_2), 51,1(CH_3), 36,6(CH_2), 30,4(CH_2), 25,3(CH_2), 19,3(CH_2).

V.12. Synthèse du (2Z) 5-(*ter*-butyldiphénylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (33f) et du (2E) 5-(*ter*-butyldiphénylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (34f)



33f

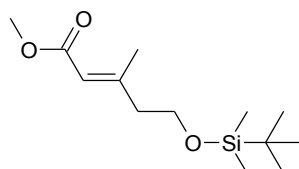


34f

Dans un ballon de 50 ml, 1,059 g de **32f** (2,89 mmol) et 550 μ l de thiophénol (3,67 mmol) sont ajoutés à 7 ml de méthanol. Après avoir agité pendant quelques minutes le mélange à 0°C, 20 mg de sodium y sont ajoutés. L'agitation est laissée pendant toute la nuit à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, et le solide obtenu est suspendu dans du diéther. La suspension est ensuite filtrée sur coton puis évaporée. Le produit est enfin purifié par chromatographie sur silice dans une colonne avec 80 g de silice ; l'éluant utilisé est (1:10) diéther/éther de pétrole 40-65°C. 808 mg de produit **33f** sont obtenus (1,69 mmol, 58%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,6(m, 4H), 7,4-7,3(m, 11H), 6,00(s, 1H), 3,79(s, 3H), 3,61(t, 2H, 6,4Hz), 2,43(t, 2H, 6,4Hz), 1,04(s, 9H) ; Mass (ESI+) $m/z=477,13$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z=974,5$ $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

De plus 168 mg de produit **34f** sont obtenus (0,352 mmol, 12%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,7(m, 4H), 7,5-7,3(m, 11H), 5,21(s, 1H), 3,96(t, 2H, 6,4Hz), 3,57(s, 3H), 3,22(t, 2H, 6,4Hz), 1,10(s, 9H) ; Mass (ESI+) $m/z = 477,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 499,1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

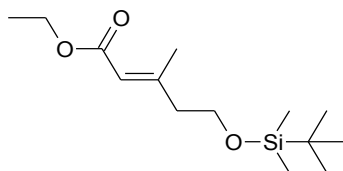
V.13. Synthèse du (2E) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-énoate de méthyle (35a)



Dans un ballon de 100 ml sous azote, 2,11 g d'iodure cuivreux (11,1 mmol) sont ajoutés à 27 ml de tétrahydrofurane sec. Ensuite, à -75°C, 6 ml d'une solution de bromure de

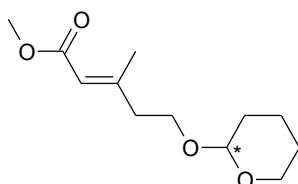
méthylmagnésien 1,4 M dans du toluène/tétrahydrofurane (8,4 mmol) sont ajoutés au mélange, avant de le laisser pendant 10 minutes à 0°C, une coloration jaune apparaît alors dans le ballon. Une fois revenu à -75°C, 1,8286 g de **33a** (5,19 mmol) est ajouté. La réaction est finalement agitée à 0°C pendant 1 heure, avant d'être filtrée sur un verre fritté et évaporée. Le tout est ensuite suspendu dans du diéthyléther, puis filtré sur coton, avant d'être évaporé. 1,31 g de produit **35a** est obtenu (5,06 mmol, 92%). RMN ¹H (CDCl₃) δ(ppm) 5,74(d, 1H, 1,1Hz), 3,80(t, 2H, 6,3Hz), 3,73(s, 3H), 2,40(t, 2H, 6,3Hz), 2,24(d, 3H, 1,1Hz), 0,94(s, 9H), 0,092(s, 6H) ; ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 167,0(C=O), 157,4(C quat. alcène), 116,6(CH alcène), 61,2(CH₂), 50,9(CH₃), 44,0(CH₂), 25,8(CH₃), 19,2(C quat.), 18,2(CH₃), -5,4(CH₃).

V.14. Synthèse du (2*E*) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-énoate d'éthyle (**35b**)



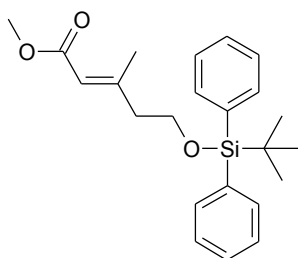
Dans un ballon de 100 ml sous azote, 3,0 g d'iodure cuivreux (15,8 mmol) sont ajoutés à 48 ml de tétrahydrofurane sec. Ensuite, à -75°C, 10 ml d'une solution de bromure de méthylmagnésien 1,4 M dans du toluène/tétrahydrofurane (14 mmol) sont ajoutés au mélange, avant de le laisser pendant 10 minutes à 0°C, une coloration jaune apparaît alors dans le ballon. Une fois revenu à -75°C, 1,5010 g de **33b** (4,01 mmol) est ajouté. La réaction est finalement agitée à 0°C pendant 1 heure, avant d'être filtrée sur un verre fritté et évaporée. Le tout est ensuite suspendu dans du diéthyléther, puis filtré sur coton, avant d'être évaporé. Ainsi, 0,8174 g de produit **35b** est obtenu (3,00 mmol, 75%). RMN ¹H (CDCl₃) δ(ppm) 5,67(d, 1H), 4,13(q, 2H, 7,1Hz), 3,74(t, 2H, 6,4Hz), 2,34(t, 2H, 6,4Hz), 2,18(s, 3H), 1,26(t, 3H, 7,1Hz), 0,88(s, 9H), 0,044(s, 6H).

V.15. Synthèse du (2*E*) 5-(tetrahydropyranyloxy)-3-méthylpent-2-énoate de méthyle (**35d**)



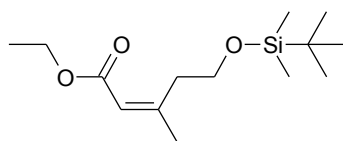
Dans un ballon de 250 ml sous azote, 15,1 g d'iodure cuivreux (79,5 mmol) sont ajoutés à 110 ml de tétrahydrofurane sec. Ensuite, à -75°C, 20 ml d'une solution de bromure de méthylmagnésien 3 M dans du diéthyléther (60 mmol) sont ajoutés au mélange, avant de le laisser pendant 10 minutes à 0°C, une coloration jaune apparaît alors dans le ballon. Une fois celui-ci revenu à -75°C, 3,206 g de **33d** (9,94 mmol) sont ajoutés. La réaction est finalement agitée à 0°C pendant 1 heure, avant d'être filtrée sur un verre fritté et évaporée. Le tout est ensuite suspendu dans du diéthyléther, puis filtré sur coton, avant d'être évaporé. Ainsi, 1,177 g de produit **35d** est obtenu (5,16 mmol, 52%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 5,63(s, 1H), 4,45(m, 1H), 3,73(m, 1H), 3,66(t, 2H, 6,4Hz), 3,57(s, 3H), 3,40(m, 1H), 2,30(t, 2H, 6,4Hz), 2,09(s, 3H), 1,8-1,3(m, 6H).

V.16. Synthèse du (2*E*) 5-(*ter*-butyldiphénylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-énoate de méthyle (**35e**)



Dans un ballon de 50 ml sous azote, 1,0 g d'iodure cuivreux (5,3 mmol) est ajouté à 12,5 ml de tétrahydrofurane sec. Ensuite, à -75°C, 1,3 ml d'une solution de bromure de méthylmagnésien 3 M dans du diéthyléther (3,9 mmol) est ajouté au mélange, avant de le laisser pendant 10 minutes à 0°C, une coloration jaune apparaît alors dans le ballon. Une fois revenu à -75°C, 1,549 g de **33f** (3,249 mmol) est ajouté. La réaction est finalement agitée à 0°C pendant 1 heure, avant d'être filtrée sur un verre fritté et évaporée. Le tout est ensuite suspendu dans du diéthyléther, puis filtré sur coton, avant d'être évaporé. Ainsi, 1,230 g de produit **35e** est obtenu (3,215 mmol, 99%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,68(m, 4H), 7,43(m, 6H), 5,74(d, 1H, 1,3Hz), 3,84(t, 2H, 6,6Hz), 3,73(s, 3H), 2,41(t, 2H, 6,6Hz), 2,17(d, 3H, 1,3Hz), 1,11(s, 9H) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 166,9(C=O), 156,9(C quat. alcène), 135,5(C arom.), 133,6(C quat. arom.), 129,6(C arom.), 127,6(C arom.), 117,0(CH alcène), 61,9(CH_2), 50,7(CH_3), 43,7(CH_2), 26,8(CH_3), 19,1(CH_3), 18,9(C quat.) ; Mass (ESI+) $m/z = 405,1[\text{M}+\text{Na}]^+$.

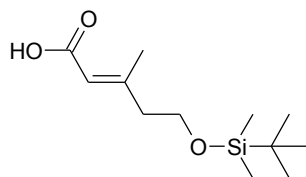
V.17. Synthèse du (2Z) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-énoate d'éthyle (36)



Dans un ballon de 100 ml sous atmosphère d'azote, 750 mg d'iodure cuivreur (7,06 mmol) sont ajoutés à 20 ml de tétrahydrofurane sec à -78°C. Ensuite, 5,4 ml de méthyllithium 1,6M dans du diéther (8,64 mmol) sont ajoutés dans le ballon qui est agité pendant une heure. Puis, 1,005 g de l'ester 32b (3,919 mmol) est ajouté rapidement à l'aide d'environ 5 ml de tétrahydrofurane sec. Après dix minutes, 2 ml d'eau sont ajoutés, puis le milieu est ramené à température ambiante. Ensuite, 100 ml de diéther sont ajoutés au mélange réactionnel qui est filtré sur verre fritté. Le filtrat est ensuite lavé à deux reprises par 100 ml d'eau distillée puis séché avec du sulfate de sodium. Une fois séché, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice ; l'éluant utilisé est 4:96 diéther/cyclohexane. Ainsi, 0,2742 g de produit **36** est obtenu (1,006 mmol, 26%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 5,71(s, 1H), 4,14(q, 2H, 7,1Hz), 3,78(t, 2H, 6,4Hz), 2,84(t, 2H, 6,4Hz), 1,95(d, 3H, 1,1Hz), 1,29(t, 3H, 7,1Hz), 0,88(s, 9H), 0,05(s, 6H).

De plus 0,1180 mg de produit **35b** est obtenu (0,378 mmol, 10%).

V.18. Synthèse de l'acide (2E) 5-(*ter*-butyldiméthylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque (37a)



V.18.1. Par de l'hydroxyde de potassium

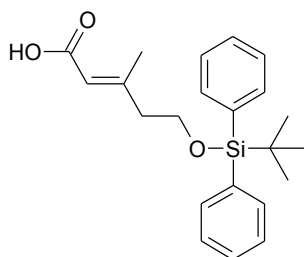
Dans un ballon de 10 ml, 0,72 ml d'une solution (25% d'éthanol) d'hydroxyde de potassium à 0,7111 M (0,51 mmol) est ajouté à 0,1306 g de l'ester **35a** (0,506 mmol). Ensuite, de l'éthanol est ajouté goutte à goutte (0,75 ml) jusqu'à dissolution complète de l'ester **35a**. Après quelques minutes d'agitation, le milieu réactionnel est neutralisé par une solution d'acide chlorhydrique de pH 5, puis l'acide **37a** est extrait à trois reprises par 20 ml

d'acétate d'éthyle. Après séchage de la phase organique par du sulfate de sodium et évaporation du solvant à pression réduite, 0,0464 g de l'acide **37a** est obtenu (0,1902 mmol, 38%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 5,72(s, 1H), 3,77(t, 2H, 6,4Hz), 2,38(t, 2H, 6,4Hz), 2,20(s, 3H), 0,89(s, 9H), 0,06(s, 6H) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 171,3(C=O), 160,2(C quat. alcène), 116,4(CH alcène), 61,1(CH_2), 44,2(CH_2), 25,9(CH_3), 19,5(CH_3), 18,3(C quat.), -5,3(CH_3).

V.18.2. Par de l'hydroxyde de lithium

Dans un ballon de 25 ml, 20 mg de l'ester **35a** (0,078 mmol) sont dissous dans 2,6 ml de tertibuthanol puis 1,12 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium 2 M (2,24 mmol) y est ajouté. Le mélange est agité pendant une nuit à 35°C, puis 12 ml d'acétate d'éthyle et 6 ml d'une solution de KH_2PO_4 et NaHSO_4 (KH_2PO_4 à 0,92 M, NaHSO_4 0,08 M, saturé en NaCl) sont ajoutés dans le milieu réactionnel. Ensuite l'acide **37a** est extrait par de l'acétate d'éthyle par 2 fois. Après séchage de la phase organique par du sulfate de sodium et évaporation du solvant à pression réduite, 0,0190 g de l'acide **37a** est obtenu (0,078 mmol, 100%). Dans le cas où la réaction n'était pas totale, l'ensemble des étapes est à nouveau effectué sur l'extrait.

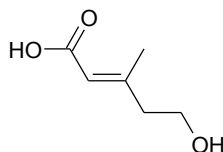
V.19. Synthèse de l'acide (2E) 5-(*ter*-butyldiphénylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque (**37b**)



Dans un ballon de 500 ml, 568 mg de l'ester **35e** (1,484 mmol) sont dissous dans 264 ml de tertibuthanol puis 55 ml d'une solution d'hydroxyde de lithium 2 M (110 mmol) y sont ajoutés. Le mélange est agité pendant une nuit à reflux (dans le cas où la réaction n'est pas finie, de la solution d'hydroxyde de lithium est ajoutée), puis le milieu réactionnel est mélangé à 500 ml d'acétate d'éthyle. Ensuite, 350 ml d'une solution de KH_2PO_4 et NaHSO_4 (KH_2PO_4 à 0,92 M, NaHSO_4 0,08 M, saturé en NaCl) sont ajoutés dans le milieu réactionnel. Ensuite l'acide **37b** est extrait par de l'acétate d'éthyle par 2 fois. Après séchage de la phase organique par du sulfate de sodium et évaporation du solvant à pression réduite, 0,560 g de l'acide **37b** est obtenu (1,52 mmol, 100%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,65(d, 4H), 7,4(m,

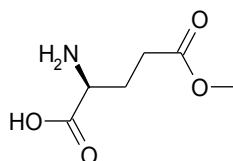
6H), 5,73(s, 1H), 3,80(t, 2H, 6,3Hz), 2,42(t, 2H, 6,3Hz), 2,13(s, 3H), 1,06(s, 9H) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 171,2(C=O), 159,9(C quat. alcène), 135,6(CH arom.), 133,6(C arom. quat.), 129,7(CH arom.), 127,7(CH arom.), 116,8(CH alcène), 61,8(CH_2), 44,0(CH_2), 26,8(CH_3), 19,3(C quat.), 19,2(CH_3).

V.20. Synthèse de l'acide (2E) 5-hydroxy-3-méthylpent-2-énoïque (38)



Dans un ballon de 10 ml, 2,49 ml d'une solution (25% d'éthanol) d'hydroxyde de potassium à 0,1001 M (2,49 mmol) sont ajoutés à 0,1083 g de l'ester **35a** (0,419 mmol). Ensuite, de l'éthanol est ajouté goutte à goutte (1 ml) jusqu'à dissolution complète de l'ester **35a**. Après quelques minutes d'agitation, le milieu réactionnel est neutralisé par une solution d'acide chlorhydrique de pH 5, puis l'acide **38** est extrait à trois reprises par 20 ml d'acétate d'éthyle. Après séchage de la phase organique par du sulfate de sodium et évaporation du solvant à pression réduite, 0,0227 g de l'acide **38** est obtenu (0,1746 mmol, 42%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 5,76(s, 1H), 3,82(t, 2H, 6,4Hz), 2,44(t, 2H, 6,4Hz), 2,21(s, 3H).

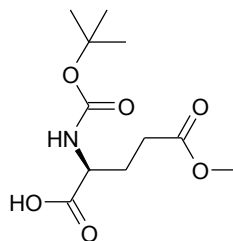
V.21. Synthèse de l'acide (2S) 2-amino-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoïque (44)



Dans un ballon de 250ml, 10,18g d'acide glutamique (68,8 mmol) ainsi que 11,31 g de sulfate de sodium sont ajoutés. Après l'ajout de 118 ml de méthanol, le mélange réactionnel est agité puis 18,8 ml d'une solution d'acide tétrafluoroborique dans de l'éther à 54% (136 mmol) sont ajoutés. Le tout est laissé agité pendant une nuit à température ambiante avant d'être filtré puis neutralisé par 20 ml de diéthylamine. Après évaporation, la solution est suspendue dans de l'acétate d'éthyle puis filtrée. Après séchage, 10,24 g de produit **44** (63,2 mmol, 92%) sont obtenus. RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 3,75(t, 1H), 3,67(s, 3H), 3,54(t, 2H),

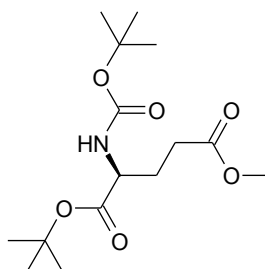
2,12(t, 2H) ^{13}C (D_2O , étalon : dioxane) $\delta(\text{ppm})$ 175,8(C=O), 174,4(C=O), 54,5(CH), 53,0(CH_3), 30,3(CH_2), 26,1(CH_2). Mass (ESI+) $m/z = 162,3[\text{M}+\text{H}]^+$, (IE+, exact) $m/z = 130,0508[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$; $[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH) = +4,7.

V.22. Synthèse de l'acide (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoïque (45)



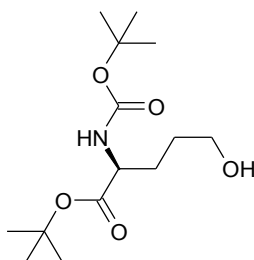
Dans un ballon de 150 ml, 5,1035 g de l'acide aminé **44** (0,0317 mol) sont dissous dans 20 ml d'eau pendant 30 min à 0°C. Ensuite, 35 ml de 1,4-dioxane sont ajoutés au mélange avant d'agiter pendant 20 min supplémentaires. Dans le milieu réactionnel, 7,6693 g de di-*t*-butyldicarbonate (0,0351 mol) et 2,49 g d'hydrogencarbonate de sodium (0,0361 mol) sont ajoutés, avant d'agiter pendant 4 h à 50°C. l'eau et le 1,4-dioxane sont ensuite évaporés sous vide, et le mélange est dissous dans 250 ml d'une solution d'hydrogénosulfate de potassium à 5%. Le produit **45** est alors extrait par de l'éther. La phase aqueuse est neutralisée jusqu'à pH 2-3 par de la soude à 1% avant que le produit **45** soit à nouveau extrait par de l'acétate d'éthyle. Après avoir été séchées par du sulfate de sodium, les deux phases organiques sont rassemblées et évaporées sous vide pour aboutir à 6,1045 g de l'acide amine **45** (0,0281 mol, 89%). RMN ^1H (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ 8,54(s, 1H), 6,66(d, 0,4H, 7,1Hz), 5,22(d, 0,6H, 7,1Hz), 4,35(m, 1H), 3,69(s, 3H), 2,48(m, 2H), 2,25(m, 1H), 2,05(m, 1H), 1,47(s, 9H); ^{13}C (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ 175,8(C=O), 173,4(C=O), 155,5(C=O), 80,4(C quat.), 52,8(CH), 30,1(CH_2), 28,3(CH_3), 27,4(CH_2); Mass (ESI+) $m/z = 284,0 [\text{M}+\text{Na}]^+$; $[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH) = -10,0.

V.23. Synthèse du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoate de *t*-butyle (46)



Dans un ballon de 250 ml, 6,8 g de l'acide-aminé **45** (0,028 mol), 5,9 g de *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (0,029 mol) et 0,319 g de *p*-(diméthylamino)-pyridine (0,00261 mol) sont mélangés dans 2,8 ml de *t*-buthanol (0,0295 mol) et 100 ml de chloroforme pendant une nuit à température ambiante. Le mélange est ensuite lavé par de l'eau, par une solution d'acide acétique à pH 5, puis de nouveau par de l'eau. La phase organique est séchée avec du sulfate de sodium puis évaporée sous vide donnant 7,95 g de l'ester **46** (0,029 mol, 89%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 5,05(d, 1H, 7,1Hz), 4,20(m, 1H), 3,68(s, 3H), 2,39(m, 2H), 2,2-1,8(m, 2H), 1,47(s, 9H), 1,44(s, 9H); ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 173,2(C=O), 171,2(C=O), 155,2(C=O), 82,1(C quat.), 79,7(C quat.), 53,3(CH), 51,7(CH₃), 30,1(CH₂), 28,3(CH₃), 28,1(CH₂), 28,0(CH₃). Mass (ESI+) $m/z = 317,9[\text{M}+\text{H}]^+$; $[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH) = -7,0.

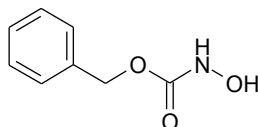
V.24. Synthèse du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-hydroxypentanoate de *t*-butyle (47)



Dans un ballon de 100 ml, 7,95 g de l'ester **46** (0,029 mol) sont dissous dans 45 ml de 1:4 eau/isopropanol. Ensuite, 1,88 g de borohydrure de sodium (0,0549 mol) est ajouté dans le mélange, qui est agité pendant 1 journée (en contrôlant régulièrement la réaction). À la disparition complète de l'ester **46**, 50 ml d'eau sont ajoutés au mélange et l'alcool **47** est extrait par 3 fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite séchée par du

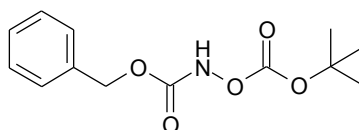
sulfate de sodium puis évaporée pour aboutir à 7,14 g de l'alcool **47** (0,029, 98%). RMN ^1H (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ 5,24(d, 1H, 8,5Hz), 4,12(m, 1H), 3,59(t, 2H, 6,0Hz), 1,9-1,5(m, 4H), 1,41(s, 9H), 1,39(s, 9H) ; ^{13}C (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ 171,8(C=O), 155,4(C=O), 81,75(C quat.), 79,6(C quat.), 61,8(CH_2), 53,6(CH), 28,3(CH_2), 28,23(CH_3), 28,17(CH_2), 27,9(CH_3) ; $[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH) = -1,9.

V.25. Synthèse du *N*-(benzyloxycarbonyl)-hydroxylamine (**49**)



La procédure de Frankel et coll. a été utilisée [264]. Dans un erlenmeyer, 8,54 g d'hydroxylamine hydrochlorique (124,70 mmol) et 13,07 g d'hydrogénocarbonate de sodium (155,57 mmol) sont ajoutés à 170 ml d'eau. Ensuite, 4,4 ml de chloroformate de benzyle (30 ;82 mmol) préalablement dilués dans 30 ml de dichlorométhane sont ajoutés à la solution. Le mélange biphasique est alors agité une nuit. La *N*-(benzyloxycarbonyl)-hydroxylamine **49** est ensuite extrait par du dichlorométhane. L'évaporation sous vide permet d'obtenir 4,7615 g (28,51 mmol, 93%) d'hydroxylamine **49**. RMN ^1H (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ 7,36(s, 5H), 5,18(s, 2H) ; ^{13}C (CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$ 158,9(C=O), 135,4(C arom. Quat.), 128,6(CH arom.), 128,5(CH arom.), 128,3(CH arom.), 67,9(CH_2) ; Mass (ESI+) m/z = 190,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

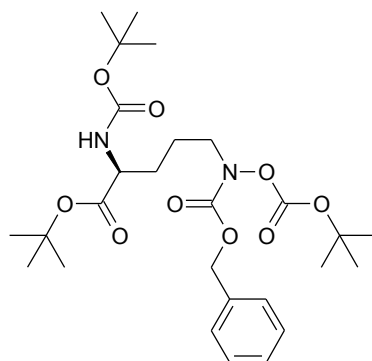
V.26. Synthèse du *N*-benzyloxycarbonyl-*O*-(*t*-butyloxycarbonyl)-hydroxylamine (**50**)



Dans un ballon à 0°C, 20 ml d'eau et 28 ml de 1,4-dioxane sont ajoutés à 4,7 g de l'hydroxylamine **49** (28,1 mmol), la solution est alors agitée pendant 30 minutes. Ensuite, 6,25 g de di-*t*-butyldicarbonate (28,6 mmol) et 2 g de hydrogénocarbonate de sodium (23,2 mmol) sont introduits dans le ballon avant de chauffer le mélange sous agitation à 50°C pendant 4 h. Après évaporation sous vide le mélange est dissous dans 100 ml d'une solution de hydrogénosulfate de potassium à 5%. Une extraction par 3 fois par 50 ml de diéthyléther est effectuée, puis la phase aqueuse est neutralisée avec une solution de HCl 10% jusqu'à

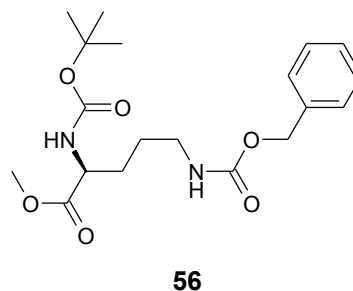
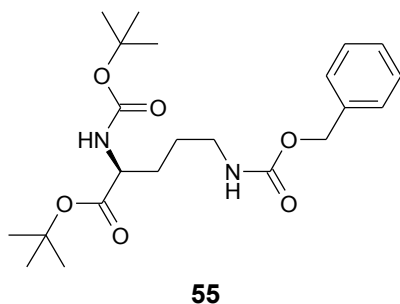
l'obtention d'un pH de 2-3. Une seconde extraction est réalisée par 3 fois par 50ml d'acétate d'éthyle. Les deux phases organiques sont ensuite rassemblées puis évaporées sous vide pour obtenir 6,5044 g d'hydroxylamine protégée **50** (24,36 mmol, 87%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,91(s, 1H), 7,36(s, 5H), 5,21(s, 2H), 1,51(s, 9H).

V.27. Synthèse du (2S) N^5 -(benzyloxycarbonyl)-O-(*t*-butyloxycarbonyl)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(hydroxylamino)-pentanoate de *t*-butyle (**51**)



Dans un ballon, 33 ml de tétrahydrofurane préalablement séchés sont ajoutés à 0,9928g de l'alcool **47** (3,435 mmol), 1,0464 g de triphénylphosphine (3,989 mmol) et 1,13768 g d'hydroxylamine **50** (5,176 mmol). Le mélange est ensuite mis sous azote, et agité à 0°C. Enfin 0,6 ml de diéthylazodicarboxylate (3,8 mmol) est ajouté et la réaction est laissée sous agitation pendant une nuit. Le contenu de la réaction est ensuite évaporé sous vide, puis le produit attendu **51** est purifié par chromatographie sur silice ($\times 50$) avec un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexane (15:85) comme éluant. Ainsi, 0,8729 g de produit **51** est obtenu (1,626 mmol, 47%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,33(s, 5H), 5,18(s, 2H), 5,00(d, 1H, 8,1Hz), 4,16(m, 1H), 3,68(t, 2H, 5,0Hz), 1,68(m, 4H), 1,48(s, 9H), 1,46(s, 9H), 1,44(s, 9H); ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 171,6(C=O), 155,5(C=O), 152,2(C=O), 135,6(C quat. arom.), 128,4(CH arom.), 128,2(CH arom.), 127,9(CH arom.), 85,2(C quat.), 81,8(C quat.), 79,6(C quat.), 68,1(CH_2), 53,7(CH), 49,9(CH_2), 29,9(CH_2), 28,3(CH_3), 27,9(CH_3), 27,5(CH_3), 23,0(CH_2); Mass (ESI+) $m/z=561,3[\text{M}+\text{Na}]^+$.

V.28. Synthèse du (2S) 2-(*t*-butoxycarbonylamino)-5-(*t*-butoxycarbonylamino)-pentanoate de *t*-butyle (**55**) et du (2S) 2-(*t*-butoxycarbonylamino)-5-(*t*-butoxycarbonylamino)-pentanoate de méthyle (**56**)



V.28.1. Par chauffage à reflux

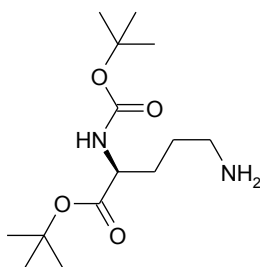
Dans un ballon, 13,5 ml de toluène sont ajoutés à 2,541 g d'acide (2S) 2-(*t*-butoxycarbonylamino)-5-(*t*-butoxycarbonylamino)pentanoïque (6,934 mmol). Le mélange est ensuite chauffé à reflux. Une fois le reflux atteint, 4 ml de di-*ter*-buthylacétale de diméthylformamide 90% (15,01 mmol) sont ajoutés et le chauffage est maintenu pendant 3h. Le toluène est ensuite évaporé sous vide, et le produit est purifié par chromatographie sur silice ($\times 30$), l'éluant utilisé est un mélange acétate d'éthyle cyclohexane 2:8. Après évaporation de l'éluant, 1,214 g de l'ester tertiobutylique **55** est obtenu (2,873 mmol, 42%). RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,32(s, 5H), 5,14(d, 1H), 5,07(s, 2H), 4,16(m, 1H), 3,19(m, 2H), 1,78(m, 1H), 1,60(m, 1H+2H), 1,45(s, 9H), 1,43(s, 9H) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 171,58(C=O), 156,4(C=O), 155,3(C=O), 136,7(C arom. quat.), 128,5(CH arom.), 128,04(CH arom.), 128,02(CH arom.), 82,0(C quat.), 79,7(C quat.), 66,7(CH_2), 53,3(CH), 40,5(CH_2), 30,3(CH_2), 28,3(CH_3), 28,0(CH_3), 25,8(CH_2) ; Mass (ESI+) $m/z = 422,9[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 445,1[\text{M}+\text{Na}]^+$; $[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH) = -19,2.

De plus, 1,452 g de l'ester méthylique **56** (3,817 mmol, 55%) est obtenu. RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,33(s, 5H), 5,16(d, 1H), 5,07(s, 2H), 5,03(m, 1H), 4,28(m, 1H), 3,72(s, 3H), 3,19(m, 2H), 1,81(m, 1H), 1,59(m, 1H+2H), 1,43(s, 9H) ; ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) 173,0(C=O), 156,4(C=O), 155,3(C=O), 136,6(C arom. quat.), 128,5(CH arom.), 128,06(CH arom.), 128,04(CH arom.), 80,1(C quat.), 66,7(CH_2), 53,2(CH), 52,3(CH_3), 40,6(CH_2), 30,1(CH_2), 28,3(CH_3), 26,0(CH_2) ; Mass (ESI+) $m/z = 403,2[\text{M}+\text{Na}]^+$; $[\alpha]_{\text{D}}$ (MeOH) = -7,6.

V.28.2. Par micro-ondes

Dans de la verrerie adéquate, 10,7 ml de toluène sont ajoutés à 2,1507 g d'acide (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(*t*-butyloxycarbonylamino)pentanoïque (5,869 mmol), puis 3,4 ml de di-*ter*-buthylacétale de diméthylformamide 90% (12,8 mmol) sont ajoutés. La réaction est alors chauffée pendant 10 minutes à 160°C par microondes (Biotage© Pathfinder, Absorption level: High, Pre-stirring: 20, Initial power: 0, Dynamic deflector optimization: On). Le toluène est ensuite évaporé sous vide, et le produit est purifié par chromatographie sur silice ($\times 30$), l'éluant utilisé est un mélange acétate d'éthyle cyclohexane 2:8. Après évaporation de l'éluant, 1,122 g de l'ester tertiobutylique **55** est obtenu (2,655 mmol, 45%), ainsi que 1,225 g de l'ester méthylique **56** (3,219 mmol, 55%).

V.29. Synthèse du (2S) 5-amino-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-pentanoate de *t*-butyle (**52**)



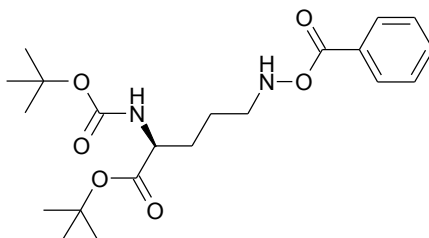
V.29.1. À partir du (2S) *N*⁵-(benzyloxycarbonyl)-*O*-(*t*-butyloxycarbonyl)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(hydroxylamino)-pentanoate de *t*-butyle (**51**)

Dans un ballon de 25 ml, 2 ml de méthanol sont ajoutés à 55,3 mg de l'acide aminé **51** (0,103 mmol) et 17,2 mg de palladium supporté sur charbon à 10%. De l'hydrogène est introduit pendant l'agitation vigoureuse du mélange jusqu'à disparition totale de l'acide aminé **51**. Le milieu est ensuite filtré sur célite®. Le méthanol est enfin évaporé sous vide pour obtenir 29,5 mg de l'amine **52** (0,102 mmol, 99%). RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) 8,1(m, 2H), 5,42(d, 1H, 6,7Hz), 4,11(m, 1H), 3,05(m, 2H), 2,0-1,6(m, 4H), 1,47(s, 9H), 1,43(s, 9H) ; ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) 171,8(C=O), 155,4(C=O), 81,7(C quat.), 79,6(C quat.), 53,8(CH), 41,5(CH₂), 30,2(CH₂), 28,8(CH₂), 28,3(CH₃), 28,0(CH₃) ; Mass (ESI+) $m/z=289,2[M+H]^+$.

V.29.2. À partir du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(*t*-butyloxycarbonylamino)-pentanoate de *t*-butyle (55)

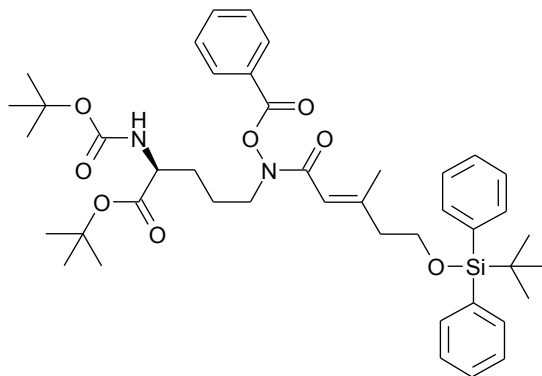
Dans un ballon de 250 ml, 100 ml de méthanol sont ajoutés à 1,214 g de l'acide aminé **55** (2,873 mmol) et 300 mg de palladium supporté sur charbon à 10%. De l'hydrogène est introduit pendant l'agitation vigoureuse du mélange jusqu'à disparition totale de l'acide aminé **55**. Le milieu est ensuite filtré sur célite®. Le méthanol est enfin évaporé sous vide pour obtenir 0,8274 g de l'amine **52** (2,839 mmol, 99%). $[\alpha]_D$ (MeOH) = -21,4.

V.30. Synthèse du (2S) 2-(*t*-butyloxycarbonylamino)-5-(phénylcarbonyloxyamino)-aminopentanoate de *t*-butyle (59)



Dans un ballon de 25 ml préalablement séché, 0,5 ml de DMF sec est ajouté à 0,424 g de l'amine **52** (1,47 mmol), 0,32 g de K₂HPO₄ (2,0 mmol). Ensuite, 0,489 g de peroxyde de dibenzoyle stabilisé par 25% d'eau est suspendu à 2,5 ml de DMF sec, puis est ajouté par filtration à travers des cartouches contenant du sulfate de sodium dans le mélange réactionnel. Le mélange est agité sous azote pendant 1h30 avant ajout de 10 ml d'eau désionisée. L'hydroxylamine **59** est extrait par 2 fois avec de l'acétate d'éthyle, puis la phase aqueuse est à nouveau extraite par 2 fois avec de l'acétate d'éthyle après ajout de 5 ml d'une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium. Les phases organiques sont réunies puis séchées avec du sulfate de magnésium, avant d'être évaporées. L'hydroxylamine est purifiée par chromatographie sur gel de silice (×50) avec comme éluant un mélange 2:98 méthanol/dichlorométhane. Ainsi 0,243 g de l'hydroxylamine est obtenu (0,690 mmol, 47%). RMN ¹H (CDCl₃) δ(ppm) 7,81(d, 2H, Hz), 7,44(m, 3H), 6,72(m, 1H), 5,20(d, 1H, Hz), 4,21(m, 1H), 3,55(m, 2H), 1,9-1,6(m, 4H), 1,47(s, 9H), 1,45(s, 9H); ¹³C (CDCl₃) δ(ppm) 171,6(C=O), 167,5(C=O), 157,9(C=O), 134,6(C arom. quat.), 131,3(C arom.), 128,5(C arom.), 127,0(C arom.), 82,2(C quat.), 79,9(C quat.), 53,3(CH), 39,3(CH₂), 30,8(CH₂), 28,3(CH₃), 28,0(CH₃), 25,2(CH₂); $[\alpha]_D$ (MeOH) = -18,4.

V.31. Synthèse du (2S, 1'E) 2-[(5'-(*ter*-butyldiphénylsilanyloxy)-3'-méthylbut-1'-énylcarbonyl)-(t-butyloxycarbonyl)-amino]-5-(phénylcarbonyloxyamino)-aminopentanoate de *t*-butyle (60)



Dans un ballon de 10 ml, 13 mg de l'acide **37b** (0,035 mmol) sont dissous dans 0,5 ml de dichlorométhane. Avant d'être chauffés à reflux pendant 2 h, 18,6 μ l de diisopropylethylamine (0,105 mmol), puis 11,7 μ l de chlorure de thionyl (0,158 mmol) sont ajoutés. Ensuite le solvant ainsi que le chlorure de thionyl sont évaporés sous vide, formant ainsi le chlorure d'acyl de l'acide **37b**. Celui-ci est repris dans 0,3 ml de dichlorométhane. Puis 18 mg de l'hydroxylamine **59** (0,051 mmol) préalablement dissous dans 2 ml de dichlorométhane sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 1 h de reflux, le milieu réactionnel est lavé avec de l'eau ultra-pure, puis séché avec du sulfate de magnésium, avant d'être évaporé sous vide. Le produit **60** est alors purifié par chromatographie sur couche mince avec comme éluant 2:8 diéthyléther/éther de pétrole 45-60°C. De cette façon, 1,2 mg de la fusarinine protégée **60** (0,0015 mmol, 4,3%) est obtenu. RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 7,71(m, 3H), 7,64(m, 4H), 7,40(m, 8H), 5,74(s, 1H), 5,36(s, 1H), 4,16(m, 1H), 3,80(t, 2H, 6,4Hz), 2,89(m, 2H), 2,39(t, 2H, 6,3Hz), 2,12(s, 3H), 1,9-1,6(m, 4H), 1,26(s, 18H), 1,05(s, 9H) ; Mass (ESI-) $m/z=793,41[\text{M}+\text{Cl}]^-$, $m/z= 537,13[\text{ion fils}]$.

Conclusion

Conclusion

Scedosporium apiospermum est un pathogène opportuniste fongique émergent [4] particulièrement impliqué dans la mucoviscidose [3]. Les difficultés de son traitement par les antifongiques utilisés en thérapeutique [25] en font une cible privilégiée pour la recherche de nouvelles molécules. Peu d'informations existent sur ce pathogène et ses interactions avec l'hôte [76-78]. Notre travail a consisté en l'étude du métabolisme du fer chez *S. apiospermum* et plus particulièrement a permis l'identification de deux sidérophores chez ce champignon.

Nous avons montré que grâce à ces sidérophores [65], *S. apiospermum* était capable de soustraire le fer contenu dans les protéines d'hôte telles que ferritine et transferrine.

Une étude préliminaire des conditions de production de ces sidérophores par le champignon, a montré que leur sécrétion était optimale dans un milieu de culture déplété en fer (concentration inférieure à $0,1\mu\text{M}$), de pH basique (8), après 3 jours d'incubation à 37°C .

Disposant de ces sidérophores en quantités suffisantes, une séparation et une identification ont été entreprises. Après extraction liquide/liquide [175] à partir de filtrat de culture puis une analyse par RP-CLHP-UV/MSⁿ [201], deux sidérophores sécrétés par *S. apiospermum* ont été identifiés : l'acide dimérumique et le N^α-méthyl coprogène B (Figure 123). Ces deux sidérophores sont de type hydroxamate, ce qui confirme les résultats obtenus lors des tests généraux de caractérisation effectués sur le milieu de culture. Ces sidérophores ont également été identifiés chez d'autres champignons tels que *H. capsulatum* [172]. Ces résultats sont en accord avec les résultats trouvés dans la littérature : les champignons produiraient uniquement des sidérophores de type hydroxamate [5], à l'exception des zygomycètes chez qui des sidérophores de type acide α -hydroxycarboxylique ont été décrits [73].

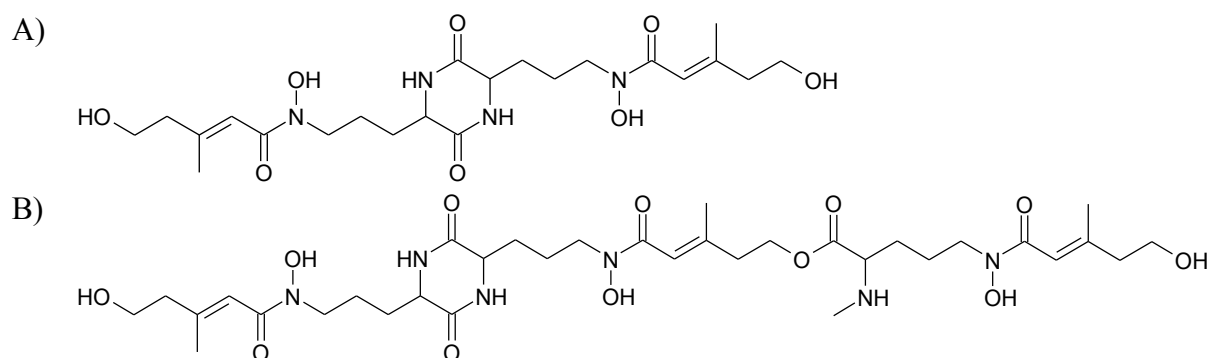


Figure 123 : Structure de l'acide dimérumique (A) et du N^α-méthyl coprogène B (B)

Afin de finaliser l'identification de ces sidérophores et d'étudier leurs propriétés physicochimiques, leur synthèse a été entreprise. Notre choix s'est porté sur la synthèse du

monomère fusarinine précurseur de l'acide dimérumique et du N^α-méthyl coprogène B. La synthèse de la fusarinine protégée **60** a été effectuée avec un rendement global de 2% (Figure 124). Elle permettra, outre d'accéder aux sidérophores de *S. apiospermum*, d'envisager la synthèse d'autre type de sidérophores appartenant aux familles des asperchromes, des coprogènes et des fusarinines, retrouvés chez divers champignons du genre *Aspergillus* ou *Histoplasma* [5, 69, 168, 172].

L'étude de la production en sidérophore a été étendue à plusieurs souches de *S. apiospermum*. Nous avons observé que la capacité de production de ces molécules dépend de l'origine des souches. Les isolats cliniques d'origine pulmonaires semblent avoir une production en N^α-méthyl coprogène B plus importante que celle des souches d'origine environnementale. Cette distinction entre les isolats cliniques et les souches environnementales a également été observée par de Hoog et coll., en s'appuyant sur d'autres critères écologiques et physiologiques [225].

Afin d'approfondir cette étude, une méthode d'extraction des sidérophores plus rapide et plus efficace a été mise au point. Cette méthode piège les sidérophores à l'aide d'une résine Amberlite XAD-4 [197]. Elle s'avère à la fois facile à mettre en jeu et d'un meilleur rendement comparé à la méthode d'extraction liquide/liquide.

L'extraction sur résine Amberlite XAD-4 suivie de l'analyse par RP-CLHP-UV/MSⁿ a été appliquée à d'autres champignons impliqués dans la mucoviscidose. Ce protocole a permis la détection de ferrichrysine chez *A. flavus*, d'acide dimérumique, de ferrichrysine et de coprogène chez *A. terreus*, de N,N',N''-triacétylfusarinine C chez *A. fumigatus* et de N^α-méthyl coprogène B chez *S. aurantiacum* (Figure 125). Ces résultats appuyés des données de la littérature, montrent que le N^α-méthyl coprogène B est un marqueur spécifique de la présence pulmonaire du complexe d'espèces *S. apiospermum* dans le cas de patients mucoviscidosiques.



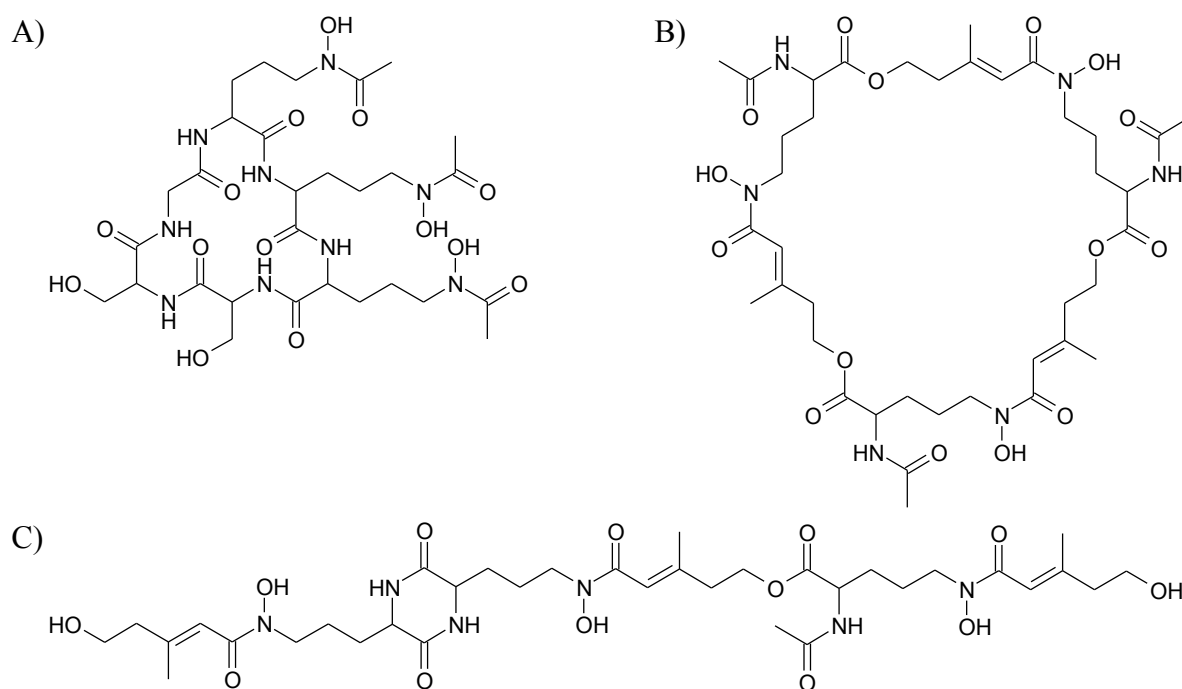


Figure 125 : Sidérophores détectés dans le genre *Aspergillus* : A) ferrichrysrine, B) *N,N',N''*-triacétylfusarinine C, C) coprogène

Fort de ces résultats, la recherche de sidérophores a été appliquée aux expectorations de malades atteints de mucoviscidose [216] et présentant une colonisation respiratoire. L'analyse a montré que le N^α-méthyl coprogène B est détecté dans trois des cinq expectorations positives à *S. apiospermum*. Ce résultat montre l'intérêt du N^α-méthyl coprogène B comme marqueur spécifique des infections fongiques pulmonaires à *S. apiospermum* chez les malades atteints de la mucoviscidose. Cette méthode est non invasive et permet un diagnostic plus précoce qu'une analyse sérologique ou qu'un examen mycologique des expectorations. Cependant, afin d'augmenter la sensibilité de la détection des sidérophores une mise au point de notre technique doit être opérée.

A la vue de ces résultats des questions demeurent sur l'implication des sidérophores dans la colonisation fongique pulmonaire et leurs interactions avec l'hôte [8, 220, 224, 335]. Certaines de ces questions pourraient être résolues par l'utilisation de molécules de synthèse. En particulier, il serait possible de clarifier l'interaction entre ces sidérophores et les protéines de stockage et de transport du fer de l'hôte, ou avec certaines protéines, telles que la lipocaline, connues pour piéger certaines structures de type hydroxamates [335, 336]. De plus, l'utilisation de sidérophores conjugués à des traceurs (fluorophores par exemple [337])

permettraient de mieux appréhender les mécanismes d'acquisition du fer chez ce pathogène. Ces molécules pourraient également être utilisées pour étudier ces mécanismes d'acquisition chez d'autres pathogènes.

L'outil d'analyse rapide des sidérophores que constitue l'utilisation de résine Amberlite XAD-4 suivie d'une analyse RP-CLHP-UV/MSn, pourrait être mis à profit pour l'étude de l'interaction hôte pathogène, afin de relier précisément la capacité des souches à produire des sidérophores à leur pouvoir pathogène dans des modèles animaux [54].

Plusieurs travaux montrent la disparition du pouvoir pathogène des microorganismes en l'absence de production de sidérophores [9, 85-87]. Notre méthode de détection des sidérophores pourrait être utilisée comme test quantitatif simple et rapide dans la recherche de molécules capables d'inhiber la production de sidérophores par les champignons. Ces molécules pourraient ensuite être utilisées dans le traitement de patients atteints d'infections dues à *S. apiospermum* [335, 338].

D'autres stratégies thérapeutiques pourraient bénéficier des connaissances des mécanismes d'acquisition du fer chez *S. apiospermum*. Ainsi, l'utilisation de conjugués sidérophores-antifongiques pourrait mettre à profit la stratégie dite du « Cheval de Troie » [92] qui permet au médicament de pénétrer dans le champignon et ainsi de potentialiser le traitement de l'infection. Pour ce faire, la synthèse du vecteur type « sidérophore », de structure identique ou proche de ceux de *S. apiospermum*, s'avère nécessaire. Sur ces sidérophores ou analogues seront conjugués des molécules antifongiques, qui seraient alors testés sur des modèles murins de scédosporioses respiratoires expérimentales. Ceci permettrait l'utilisation de nouveaux principes actifs complétant l'arsenal thérapeutique en direction de *S. apiospermum*.

Bibliographie

1. P. B. Davis; *Cystic Fibrosis Since 1938*; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; **2006**; 173(5); 475-482
2. C. Koch and N. Høiby; *Diagnosis and Treatment of Cystic Fibrosis*; Respiration; **2000**; 67(3); 239-247
3. B. Cimon, D. Chabasse, and J.-P. Bouchara; *Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose*; Revue Francophone des Laboratoires; **2007**; 37(397); 59-65
4. J. Guarro, A. S. Kantarcioglu, R. Horré, J. L. Rodriguez-Tudelas, M. Cuenca Estrella, J. Berenguer, and G. S. De Hoog; *Scedosporium apiospermum: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist*; Medical Mycology; **2006**; 44(4); 295-327
5. J. C. Renshaw, G. D. Robson, A. P. J. Trinci, M. G. Wiebe, F. R. Livens, D. Collison, and R. J. Taylor; *Fungal siderophores: structures, functions and applications*; Mycological Research; **2002**; 106(10); 1123-1142
6. D. H. Howard; *Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi*; Clinical Microbiology Reviews; **1999**; 12(3); 394-404
7. T. Ammari and K. Mengel; *Total soluble Fe in soil solutions of chemically different soils*; Geoderma; **2006**; 136(3-4); 876-885
8. Iain Lamont, Anna Konings, and David Reid; *Iron acquisition by Pseudomonas aeruginosa in the lungs of patients with cystic fibrosis*; BioMetals; **2009**; 22(1); 53-60
9. A. H. T. Hissen, A. N. C. Wan, M. L. Warwas, L. J. Pinto, and M. M. Moore; *The Aspergillus fumigatus siderophore biosynthetic gene sidA, encoding L-ornithine N⁵-oxygenase, is required for virulence.*; Infection and Immunity; **2005**; 73(9); 5493-5503
10. Z. D. Liu and R. C. Hider; *Design of iron chelators with therapeutic application*; Coordination Chemistry Reviews; **2002**; 232; 151-171
11. C. Hershko; *Oral iron chelators: new opportunities and new dilemmas*; Haematologica; **2006**; 91(10); 1307-1312
12. A. Pramanik and V. Braun; *Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of Streptococcus pneumoniae R6*; Journal of Bacteriology; **2006**; 188(11); 3978-3886
13. G. Bernier, V. Girijavallabhan, A. Murray, N. Niyaz, P. Ding, M. J. Miller, and F. Malouin; *Desketoneoenactin-Siderophore Conjugates for Candida: Evidence of Iron Transport-Dependent Species Selectivity*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2005**; 49(1); 241-248
14. K. A. Marr, R. A. Carter, F. Crippa, A. Wald, and L. Corey; *Epidemiology and Outcome of Mould Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients*; Clinical Infectious Diseases; **2002**; 34(7); 909-917
15. G. Cremer and P. Boiron; *Epidemiology and biology of Scedosporium species*; Journal de Mycologie Médicale; **1996**; 6(4); 165-171
16. B. Cimon, J. Carrère, J.-P. Chazalotte, J.-L. Giniès, D. Chabasse, and J.-P. Bouchara; *Mycoses bronchopulmonaires au cours de la mucoviscidose. Résultats d'une étude épidémiologique longitudinale sur une période de 5 ans.*; Journal de Mycologie Médicale; **2000**; 10; 128-135
17. B. Cimon, J. Carrère, J.-F. Vinatier, J.-P. Chazalotte, D. Chabasse, and J.-P. Bouchara; *Clinical significance of Scedosporium apiospermum in patients with cystic fibrosis*; European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; **2000**; 19(1); 53-56

18. G. S. de Hoog; *Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host*; Antonie van Leeuwenhoek; **1993**; 63(2); 105-109
19. R Horre, KP Schaal, R Siekmeier, B Sterzik, GS de Hoog, and N Schnitzler; *Isolation of Fungi, Especially Exophiala dermatitidis, in Patients Suffering from Cystic Fibrosis. A Prospective Study*; Respiration; **2004**; 71(4); 360-366
20. E. C. M. Williamson, D. Speers, I. H. Artur, G. Harnett, G. Ryan, and T. J. J. Inglis; *Molecular Epidemiology of Scedosporium apiospermum Infection Determined by PCR Amplification of Ribosomal Intergenic Spacer Sequences in Patients with Chronic Lung Disease*; Journal of Clinical Microbiology; **2001**; 39(1); 47-50
21. B. Cimon, J. Carrère, J.P. Chazalotte, J.-L. Giniès, P. Six, D. Chabasse, and J.-P. Bouchara; *Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis*; Journal de Mycologie médicale; **1995**; 5; 211-216
22. F. Gilgado, J. Cano, J. Gene, and J. Guarro; *Molecular phylogeny of the Pseudallescheria boydii species complex: proposal of two new species*; Journal of Clinical Microbiology; **2005**; 43(10); 4930-4942
23. F. Gilgado, J. Cano, J. Gene, D. A. Sutton, and J. Guarro; *Molecular and Phenotypic Data Supporting Distinct Species Statuses for Scedosporium apiospermum and Pseudallescheria boydii and the Proposed New Species Scedosporium dehoogii*; Journal of Clinical Microbiology; **2008**; 46(2); 766-771
24. A. Harun, H. Perdomo, F. Gilgado, S. C. A. Chen, J. Cano, J. Guarro, and W. Meyer; *Genotyping of Scedosporium species: a review of molecular approaches*; Medical Mycology; **2009**; 47(4); 406 - 414
25. J. Meletiadis, J. F. G. M. Meis, J. W. Mouton, J. L. Rodriguez-Tudela, J. P. Donnelly, P. E. Verweij, and the EUROFUNG Network; *In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical Scedosporium isolates*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2002**; 46(1); 62-68
26. J. Rainer and G. S. De Hoog; *Molecular taxonomy and ecology of Pseudallescheria, Petriella and Scedosporium prolificans (Microascaceae) containing opportunistic agents on humans*; Mycological Research; **2006**; 110(2); 151-160
27. T. Miyamoto, R. Sasaoka, M. Kawaguchi, S. Ishioka, T. Inoue, N. Yamada, and M. Mihara; *Scedosporium apiospermum skin infection: A case report and review of the literature*; Journal of the American Academy of Dermatology; **1998**; 39(3); 498-500
28. L. Török, G. Simon, A. Csornai, M. Tápai, and I. Török; *Scedosporium apiospermum infection imitating lymphocutaneous sporotrichosis in a patient with myeloblastic-monocytic leukaemia*; British Journal of Dermatology; **1995**; 133; 805-809
29. D. Lavy, O. Morin, G. Venet, Y. Maugars, A. Prost, and J.-M. Berthelot; *Pseudallescheria boydii knee arthritis in a young immunocompetent adult two years after a compound patellar fracture*; Joint Bone Spine; **2001**; 68(6); 517-520
30. J. J. Canet, X. Pagnierols, C. Sánchez, P. Vives, and J. Garau; *Lymphocutaneous syndrome due to Scedosporium apiospermum*; Clinical Microbiology and Infection; **2001**; 7(11); 648-650
31. H. S. Bhally, C. Shields, S. Y. Lin, and W. G. Merz; *Otitis caused by Scedosporium apiospermum in an immunocompetent child*; International journal of pediatric otorhinolaryngology; **2004**; 68(7); 975-978
32. A. Acharya, A. Ghimire, B. Khanal, S. Bhattacharya, N. Kumari, and R. Kanungo; *Brain Abscess due to Scedosporium apiospermum in a nonimmunocompromised child*; Indian Journal of Medicinal Microbiology; **2006**; 24(3); 231-232
33. A. Khurshid, V. T. Barnett, M. Sekosan, A. S. Ginzburg, and E. Önal; *Disseminated Pseudallescheria boydii Infection in a Nonimmunocompromised Host*; Chest; **1999**; 116(2); 572-574

34. P. Muñoz, M. Marín, P. Tornero, P. Martín Rabadán, M. Rodríguez-Creixéms, and E. Bouza; *Successful Outcome of Scedosporium apiospermum Disseminated Infection Treated with Voriconazole in a Patient Receiving Corticosteroid Therapy*; Clinical Infectious Diseases; **2000**; 31(6); 1499-1501
35. M. Montejo, M. L. Muñiz, S. Zárraga, K. Aguirrebengoa, J. J. Amenabar, L. López-Soria, and R. Gonzalez; *Case reports. Infection due to Scedosporium apiospermum in renal transplant recipients: a report of two cases and literature review of central nervous system and cutaneous infections by Pseudallescheria boydii / Sc. apiospermum*; Mycoses; **2002**; 45(9-10); 418-127
36. S. Kusne, S. Ariyanayagam-Baksh, D.C. Strollo, and J. Abernethy; *Invasive Scedosporium apiospermum infection in a heart transplant recipient presenting with multiple skin nodules and a pulmonary consolidation*; Transplant infectious disease; **2000**; 2(4); 191-196
37. M. Al Refaï, C. Duhamelb, J.-P. Le Rochaisa, and P. Icard; *Lung scedosporiosis: a differential diagnosis of aspergillosis*; European Journal of Cardio-Thoracic Surgery; **2002**; 21(5); 938-939
38. J. Ahmed, D. M. Ditmars, T. Sheppard, R. Del Busto, K. K. Venkat, and R. Parasuraman; *Recurrence of Scedosporium Apiospermum Infection following Renal Re-Transplantation*; American Journal of Transplantation; **2004**; 4; 1720-1724
39. S. Guignard, D. Hubert, B. Dupont, P. Anract, D. Alioua, H. Guerini, A. Paugam, and M. Dougados; *Multifocal Scedosporium apiospermum spondylitis in a cystic fibrosis patient*; Journal of Cystic Fibrosis; **2008**; 7(1); 89-91
40. F. Symoens, C. Knoop, M. Schrooyen, O. Denis, M. Estenne, N. Nolard, and F. Jacobs; *Disseminated Scedosporium apiospermum infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation*; Journal of Heart and Lung Transplantation; **2006**; 25(5); 603-607
41. A. Katragkou, J. Dotis, M. Kotsiou, M. Tamiolaki, and E. Roilides; *Scedosporium apiospermum infection after near-drowning*; Mycoses; **2007**; 50(5); 412-421
42. C. Garzoni, S. Emonet, L. Legout, R. Benedict, P. Hoffmeyer, L. Bernard, and J. Garbino; *Atypical Infections in Tsunami Survivors*; Emerging Infectious Diseases; **2005**; 11(10); 1591-1593
43. J. Riddell, C. E. Chenoweth, and C. A. Kauffman; *Disseminated Scedosporium apiospermum infection in a previously healthy woman with HELLP syndrome*; Mycoses; **2004**; 47(9-10); 442-446
44. C. Hennequin, N. Benailly, C. Silly, M. Sorin, P. Scheinmann, G. Lenoir, J. L. Gaillard, and P. Berche; *In vitro susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis*; Antimicrobial agents and chemotherapy; **1997**; 41(9); 2064-2066
45. T. J. Walsh, J. Peter, D. A. McGough, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, and P. A. Pizzo; *Activities of Amphotericin B and Antifungal Azoles Alone and in Combination against Pseudallescheria boydii*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **1995**; 39(6); 1361-1364
46. C. Gil-Lamaignere, E. Roilides, J. Mosquera, A. Maloukou, and T. J. Walsh; *Antifungal Triazoles and Polymorphonuclear Leukocytes Synergize To Cause Increased Hyphal Damage to Scedosporium prolificans and Scedosporium apiospermum*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2002**; 46(7); 2234-2237
47. C. Hennequin; *Epidémiologie des Mycoses invasives. L'expérience d'un centre hospitalo-universitaire parisien*; Revue de Médecine Interne; **1996**; 17; 754-760
48. J. Huet, *Rappels sur les champignons pathogènes*, dans *Traité de Chimie Thérapeutique - Volume 5 - Principaux antifongiques et Antiparasitaires - Tome 1 - Antifongiques*, T. DOC, Editor. **1999**, Editions Médicales Internationales. p. 3-6.

49. J. Nielsen Kahn, M.-J. Hsu, F. Racine, R. Giacobbe, and M. Motyl; *Caspofungin Susceptibility in Aspergillus and Non-Aspergillus Molds: Inhibition of Glucan Synthase and Reduction of β -D-1,3 Glucan Levels in Culture*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2006**; 50(6); 2214-2216
50. M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez, E. Mellado, M. J. Buitrago, A. Monzon, and J. L. Rodriguez-Tudela; *Head-to-Head Comparison of the Activities of Currently Available Antifungal Agents against 3,378 Spanish Clinical Isolates of Yeasts and Filamentous Fungi*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2006**; 50(3); 917-921
51. E. López-Oviedo, A. I. Aller, C. Martín, C. Castro, M. Ramirez, J. M. Pemán, E. Cantón, C. Almeida, and E. Martín-Mazuelos; *Evaluation of Disk Diffusion Method for Determining Posaconazole Susceptibility of Filamentous Fungi: Comparison with CLSI Broth Microdilution Method*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2006**; 50(3); 1108-1111
52. M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez, E. Mellado, G. Garcia-Effron, A. Monzon, and J. L. Rodriguez-Tudela; *In Vitro Activity of Ravuconazole against 923 Clinical Isolates of Nordermatophyte Filamentous Fungi*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2005**; 49(12); 5136-5138
53. F. Sabatelli, R. Patel, P. A. Mann, C. A. Mendrick, C. C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T. A. Black, and P. M. McNicholas; *In Vitro Activities of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a Large Collection of Clinically Important Molds and Yeasts*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2006**; 50(6); 2009-2015
54. J. Capilla and J. Guarro; *Correlation between In Vitro Susceptibility of Scedosporium apiospermum to Voriconazole and In Vivo Outcome of Scedosporiosis in Guinea Pigs*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2004**; 48(10); 4009-4011
55. C. Yustes and J. Guarro; *In Vitro Synergistic Interaction between Amphotericin B and Micafungin against Scedosporium spp.*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2005**; 49(8); 3498-3500
56. K. Heyn, A. Tredup, S. Salvenmoser, and F.-M. C. Müller; *Effect of Voriconazole Combined with Micafungin against Candida, Aspergillus, and Scedosporium spp. and Fusarium solani*; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; **2005**; 49(12); 5157-5159
57. R. M. Winn, C. Gil-Lamagnere, E. Roilides, M. Simitopoulou, C. A. Lyman, A. Maloukou, and T. J. Walsh; *Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against Fusarium spp. and Scedosporium spp.*; Cytokine+; **2005**; 31(1); 1-8
58. J.-F. Briat and G. Vert; *Acquisition et gestion du fer par les plantes*; Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures; **2004**; 13(2); 183-201
59. T. Ganz; *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*; Blood; **2003**; 102(3); 783-788
60. D. J. Kosman; *Molecular mechanisms of iron uptake in fungi*; Molecular Microbiology; **2003**; 47(5); 1185-1197
61. C. C. Philpott; *Iron uptake in fungi: A system for every source*; Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research; **2006**; 1763(7); 636-645
62. L. Johnson; *Iron and siderophores in fungal-host interactions*; Mycological Research; **2008**; 112(Pt 2); 170-183
63. G. Winkelmann; *Ecology of siderophores with special reference to the fungi*; Biometals; **2007**; 20(3-4); 379-392
64. H. Haas, M. Eisendle, and B. G. Turgeon; *Siderophores in fungal physiology and virulence*; Annual Review of Phytopathology; **2008**; 46; 149-87

65. A. H. T. Hissen, J. M. T. Chow, L. J. Pinto, and M. M. Moore; *Survival of Aspergillus fumigatus in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores*; Infection and Immunity; **2004**; 72(3); 1402-1408
66. J. H. Brock, P. H. Williams, J. Licéaga, and K. G. Wooldridge; *Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of Escherichia coli and to other microorganisms.*; Infection and Immunity; **1991**; 59(9); 3185
67. T. A. Kendall, M. F. Hochella Jr., and U. Becker; *Computational modeling of azotobactin–goethite/diaspore interactions: applications to molecular force measurements and siderophore–mineral reactivity*; Chemical Geology; **2005**; 216(1-2); 17-35
68. J. B. Neilands; *Methodology of Siderophores*; Structure and Bonding; **1984**; 58; 1-24
69. H. Drechsel and G. Jung; *Peptide Siderophores*; Journal of Peptide Science; **1998**; 4; 147-181
70. A. E. Witter, D. A. Hutchins, A. Butler, and G. W. Luther III; *Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater*; Marine Chemistry; **2000**; 69(1-2); 1-17
71. K. N. Raymond, G. Müller, and B. F. Matzanke; *Complexation of iron by siderophores - A review of their solution and structural chemistry and biological function*; Topics in Current Chemistry; **1984**; 123; 49-102
72. N. von Wirén, H. Marschner, and V. Römheld; *Uptake Kinetics of Iron-Phytosiderophores in two Maize Genotypes Differing in Iron Efficiency*; Physiologia Plantarum; **1995**; 93(4); 611-616
73. D. van der Helm and G. Winkelmann, *Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi*, dans *Metal Ions in Fungi*, G. Winkelmann and D.R. Winge, Editors. **1994**, Marcel Dekker, Inc. p. 39-98.
74. L. H. Hogan, B. S. Klein, and S. M. Levitz; *Virulence Factors of Medically Important Fungi*; Clinical Microbiology Reviews; **1996**; 9(4); 469–488
75. L. L. Ma and C. H. Mody; *When There Is a Fungus Among Us, What Makes it Virulent?*; American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology; **2002**; 26(3)
76. B. A. Silvia, M. R. Pinto, R. M.A. Soares, E. Barreto-Bergter, and A. L.S. Santos; *Pseudallescheria boydii release metalloproteinases capable of cleaving several proteinaceous compounds*; Research in Microbiology; **2006**; 157(5); 425-432
77. G. Larcher, B. Cimon, F. Symoens, G. Tronchin, D. Chabasse, and J.-P. Bouchara; *A 33 kDa serine proteinase from Scedosporium apiospermum*; The Biochemical Journal; **1996**; 315(1); 119-126
78. O. C. Lima, G. Larcher, P. Vandeputte, A. Lebouil, D. Chabasse, P. Simoneau, and J.-P. Bouchara; *Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from Scedosporium apiospermum*; Microbes and Infection; **2007**; 9(5); 558-565
79. R. Pakdaman, M. Petitjean, and J.-M. El Hage Chahine; *Transferrins - A mechanism for iron uptake by lactoferrin*; European Journal of Biochemistry; **1998**; 254(1); 144-153
80. G. F. Tidmarsh, P. E. Klebba, and L. T. Rosenberg; *Rapid release of iron from ferritin by siderophores*; Journal of Inorganic Biochemistry; **1983**; 18(2); 161-168
81. R.-Y. Park, H.-Y. Sun, M.-H. Choi, Y.-H. Bai, and S.-H. Shin; *Staphylococcus aureus Siderophore-Mediated Iron-Acquisition System Plays a Dominant and Essential Role in the Utilization of Transferrin-Bound Iron*; Journal of Microbiology; **2005**; 43(2); 183-190

82. C. Wolz, K. Hohloch, A. Ocaktan, K. Poole, R. W. Evans, N. Rochel, A. M. Albrecht-Gary, M. A. Abdallah, and G. Döring; *Iron release from transferrin by pyoverdine and elastase from Pseudomonas aeruginosa*; Infection and Immunity; **1994**; 62(9); 4021-4027
83. B. E. Britigan, M. B. Hayek, B. N. Doebebling, and R. B. Fick Jr.; *Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the Pseudomonas aeruginosa-infected lungs of patients with cystic fibrosis*; Infection and Immunity; **1993**; 61(12); 5049-5055
84. B. Mei, A. Budde, and S. Leong; *sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in Ustilago maydis: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **1993**; 90(3); 903-907
85. M. Schrettl, E. Bignell, C. Kragl, C. Joechl, T. Rogers, H. N. Arst, Jr., K. Haynes, and H. Haas; *Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for Aspergillus fumigatus virulence*; The Journal of Experimental Medicine; **2004**; 200(9); 1213-1219
86. H. Takase, H. Nitani, K. Hoshino, and T. Otani; *Impact of Siderophore Production on Pseudomonas aeruginosa Infections in Immunosuppressed Mice*; Infection and Immunity; **2000**; 68(4); 1834
87. J. A. Lindsay and T. V. Riley; *Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression*; Infection and Immunity; **1994**; 62(6); 2309-2314
88. J. M. C. Gutteridge, R. Richmond, and B. Halliwell; *Inhibition of the Iron-Catalysed Formation of Hydroxyl Radicals from Superoxide and of Lipid Peroxidation by Desferrioxamine*; Biochemical Journal; **1979**; 184(2); 469-472
89. E. S. Henle and S. Linn; *Formation, Prevention, and Repair of DNA Damage by Iron/Hydrogen Peroxide*; Journal of Biological Chemistry; **1997**; 272(31); 19095-19098
90. S. D. Aust and B. C. White; *Iron chelation prevents tissue injury following ischemia*; Advances in Free Radical Biology & Medicine; **1985**; 1(1); 1-17
91. *Metal chelation therapy, oxygen radicals, and human disease*; Lancet; **1985**; 1(8421); 143-145
92. M. J. Miller and F. Malouin, Chapter 13: *Siderophore-mediated drug delivery : the design, synthesis, and study of siderophore-antibiotic and antifungal conjugates*, dans *The Development of Iron Chelators for Clinical Use*, I. CRC Press, Editor. **1994**. p. 275-306.
93. J. Savulescu; *Thalassaemia major: the murky story of deferiprone*; British Medical Journal; **2004**; 328(358-359)
94. D. Loukopoulos. *Management of the haemoglobinopathies*. dans *Congress of the European Haematology Association*. **2000**. Birmingham, UK.
95. G. S. Tilbrook and R.C. Hider; *Iron Chelators for Clinical Use*; Metal Ions in Biological Systems; **1998**; 35; 691-730
96. P. Ackrill, J.P. Day, and Ahmed R.; *Aluminum and iron overload in chronic dialysis*; Kidney international. Supplement; **1988**; 24; S163-167
97. S. J. Hayflick; *Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation: From Genes to Pathogenesis*; Seminar in Pediatric Neurology; **2006**; 13(3); 182-185
98. C. Quintana, S. Bellefquih, J. Y. Laval, J. L. Guerquin-Kern, T. D. Wu, J. Avila, I. Ferrer, R. Arranz, and C. Patiño; *Study of localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level*; Journal of Structural Biology; **2006**; 153; 42-53

99. D. T. Dexter, F. R. Wells, A. J. Lee, F. Agid, Y. Agid, P. Jenner, and C. D. Marsden; *Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease*; Journal of Neurochemistry; **1989**; 52(6); 1830-1836
100. R. C. Hider, A. R. Mohd-Nor, J. Silver, I. E. G. Morrison, and L. V. C. Rees; *Model Compounds for Microbial Iron-transport Compounds. Part I. Solution Chemistry and Mossbauer Study of Iron(II) and Iron(III) Complexes from Phenolic and Catecholic Systems*; Journal of the Chemical Society Dalton Transaction; **1981**; 609-622
101. H. Zheng, M. B.H. Youdim, L. M. Weiner, and M. Fridkin; *Novel potential neuroprotective agents with both iron chelating and amino acid-based derivatives targeting central nervous system neurons*; Biochemical Pharmacology; **2005**; 70(11); 1642–1652
102. K. N. Raymond and W. S. Smith, *Actinide-specific sequestering agents and decontamination applications*, dans *Bonding Problems*. **1981**. p. 159-186.
103. J.-L. Pierre and G. Lescoat; *Une santé de fer*; Actualité Chimique; **2003**(novembre-décembre); 123-127
104. G Muller and K N Raymond; *Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in Streptomyces pilosus.*; Journal of Bacteriology; **1984**; 160(1); 304-312
105. J. R. Boelaert, J. van Cutsem, M. de Locht, Y.-J. Schneider, and R. R. Crichton; *Deferoxamine augments growth and pathogenicity of Rhizopus, while hydroxypyridinone chelators have no effect*; Kidney International; **1994**; 45(3); 667-671
106. J. R. Boelaert, M. de Locht, J. van Cutsem, V. Kerrels, B. Cantinieaux, A. Verdonck, H. W. van Landuyt, and Y. J. Schneider; *Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. In vitro and in vivo animal studies.*; Journal of Clinical Investigation; **1993**; 91(5); 1979
107. A. Doléans, *Utilisation in vitro du Desféral® en tant que sidérophore par Rhizopus oryzae, agent de mucormycose humaine*, dans *UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénieries de la Santé*. **2002**, Université d'Angers: Angers. p. 66.
108. M. de Locht, J. R. Boelaert, and Y. J. Schneider; *Iron uptake from ferrioxamine and from ferrirhizoferrin by germinating spores of Rhizopus microsporus*; Biochemical Pharmacology; **1994**; 47(10); 1843-50
109. H. M. Reyes, E. J. Tingle, A. Z. Fenves, J. Spiegel, and E. C. Burton; *Pulmonary invasive mucormycosis in a patient with secondary iron overload following deferoxamine therapy*; Proceedings (Baylor University. Medical Center); **2008**; 21(4); 378–381
110. R. J. Bergeron, M. Guo Xin, W. R. Weimar, R. E. Smith, and J. Wiegand; *Significance of Asymmetric Sites in Choosing Siderophores as Deferration Agents*; Journal of Medicinal Chemistry; **2001**; 44(15); 2469-2478
111. H. Drechsel and G. Winkelmann; *The configuration of the chiral carbon atoms in staphyloferrin A and analysis of the transport properties in Staphylococcus aureus*; BioMetals; **2005**; 18(1); 75-81
112. Novartis Pharma Oncologie, *Guide de Suivi pour le Traitement par Exjade® (déférasirox)*. **2006**.
113. R. Galanello, A. Piga, G. L. Forni, Y. Bertrand, M. L. Foschini, E. Bordone, G. Leoni, A. Lavagetto, A. Zappu, F. Longo, H. Maseruka, N. Hewson, R. Sechaud, R. Belleli, and D. Alberti; *Phase II clinical evaluation of deferiasirox, a once-daily oral chelating agent, in pediatric patients with β -thalassemia major*; Haematologica; **2006**; 91(10); 1343-1351
114. A. Piga, C. Gaglioti, E. Fogliacco, and F. Tricta; *Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis*; Haematologica; **2003**; 88(5); 489-496

115. R. J. Bergeron, G. T. Elliott, S. J. Kline, R. Ramphal, and L. St. James III; *Bacteriostatic and Fungostatic Action of Catecholamide Iron Chelators*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **1983**; 24(5); 725-730
116. A. Tsafack, M. Loyevsky, P. Ponka, and Z. I. Cabantchik; *Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials : IV, Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoyl hydrazone derivatives*; *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*; **1996**; 127(6); 574-582
117. I. S. Darwish, C. Patel, and M. J. Miller; *Synthesis of the Antifungal Agent Norneoenactin A*; *Journal of Organic Chemistry*; **1993**; 58(22); 6072-6075
118. H. Okada, K. Yamamoto, S. Tsutano, and S. Nakamura; *A New Group of Antibiotics, Hydroxamic Acid Antimycotic Antibiotics - I. Precursor-Initiated Changes in Productivity and Biosynthesis of Neoenactins NL₁ and NL₂*; *Journal of Antibiotics*; **1988**; 41(7); 869-874
119. I. S. Darwish and M. J. Miller; *Synthesis of the Antifungal Agent Neoenactin A and Its N-Deshydroxy Derivative*; *Journal of Organic Chemistry*; **1994**; 59(2); 451-454
120. M. J. Miller; *Microbial Iron Chelators as Drug Delivery Agents: The Rational Design and Synthesis of Siderophore-Drug Conjugates*; *Accounts of Chemical Research*; **1993**; 26; 241-249
121. L. Vértessy, W. Aretz, H.-W. Fehlhaber, and H. Kogler; *3. Salmycin A-D, antibiotika aus Streptomyces violaceus, DSM 8286, mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur*; *Helvetica Chimica Acta*; **1995**; 78; 46-60
122. W. Falda; *N.D. prof part of 'Trojan Horse' discovery - Method may allow sneaking delivery of antibiotics into cells resistant to drug*; *South Bend Tribune*; **2000**; September 29
123. E. K. Dolence, A. A. Minnick, C.-E. Lin, M. J. Miller, and S. M. Payne; *Synthesis and Siderophore and Antibacterial Activity of N⁵-Acetyl-N⁵-hydroxy-L-ornithine-Derived Siderophore-β-Lactam Conjugates: Iron-Transport-Mediated Drug Delivery*; *Journal of Medicinal Chemistry*; **1991**; 34(3); 968-978
124. Ute Möllmann, Lothar Heinisch, Adolf Bauernfeind, Thilo Köhler, and Dorothe Ankel-Fuchs; *Siderophores as drug delivery agents: application of the "Trojan Horse" strategy*; *BioMetals*; **2009**; Online First
125. Y. Lu and M. J. Miller; *Syntheses and Studies of Multiwarhead Siderophore-5-Fuorouridine Conjugates*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **1999**; 7; 3025-3038
126. A. Ghosh, M. Ghosh, C. Niu, F. Malouin, U. Möllmann, and M. J. Miller; *Iron transport-mediated drug delivery using mixed-ligand siderophore-β-lactam conjugates*; *Chemistry & Biology*; **1996**; 3(12); 1011-1019
127. M. Ghosh and M. J. Miller; *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Isocyanurate-based Antifungal and Macrolide Antibiotic Conjugates: Iron Transport-mediated Drug Delivery*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **1995**; 3(11); 1519-1525
128. J.-Y. Wach, S. Bonazzi, and K. Gademann; *Antimicrobial Surfaces through Natural Product Hybrids*; *Angewandte Chemie (International edition in English)*; **2008**; 47; ?-?
129. Y. Aniya, I. I. Ohtani, T. Higa, C. Miyagi, H. Gibo, M. Shimabukuro, H. Nakanishi, and J. Taira; *Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, Monascus Anka*; *Free Radical Biology & Medicine*; **2000**; 28(6); 999-1004
130. J. Taira, C. Miyagi, and Y. Aniya; *Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, Monascus anka: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and hemeprotein-mediated oxidation*; *Biochemical Pharmacology*; **2002**; 63(5); 1019-1026
131. J. B. Summers, K. H. Kim, H. Mazdiyasn, J. H. Holms, J. D. Ratajczyk, A. O. Stewart, R. D. Dyer, and G. W. Cartert; *Hydroxamic Acid Inhibitors of 5-Lipoxygenase: Quantitative Structure-Activity Relationships*; *Journal of Medicinal Chemistry*; **1990**; 33(3); 992-998

132. R. D. Abeysinghe, P. J. Roberts, C. E. Cooper, K. H. MacLean, R. C. Hider, and J. B. Porter; *The Environment of the Lipoxygenase Iron Binding Site Explored with Novel Hydroxypyridinone Iron Chelators*; Journal of Biological Chemistry; **1996**; 271(14); 7965-7972
133. H. T. Shigeura and C. N. Gordon; *Further Studies on the Activity of Hadacidin*; Cancer Research; **1962**; 22; 1356-1361
134. E. A. Kaszka, C. O. Gitterman, E. L. Dulaney, and K. Folkers; *Hadacidin, a New Growth-Inhibitory Substance in Human Tumor Systems*; Biochemistry; **1962**; 1(2); 340-343
135. H. T. Shigeura and C. N. Gordon; *The Mechanism of Action of Hadacidine*; Journal of Biological Chemistry; **1962**; 237(6); 1937-1940
136. H. T. Shigeura and C. N. Gordon; *Hadacidin, a New Inhibitor of Purine Biosynthesis*; Journal of Biological Chemistry; **1962**; 237(6); 1962-1966
137. T. Okada, T. Sawada, and K. Kubota; *Deferoxamine enhances anti-proliferative effect of interferon- γ against hepatocellular carcinoma cells*; Cancer Letters; **2007**; 248(1); 24-31
138. A. Kicic, A. C.G. Chua, and E. Baker; *Desferrithiocin is a more potent antineoplastic agent than desferrioxamine*; British Journal of Pharmacology; **2002**; 135; 1393-1402
139. R. J. Bergeron, P. F. Gavanaugh Jr., S. J. Kline, R. G. Hughes Jr., G. T. Elliott, and C. W. Porter; *Antineoplastic and antiherpetic activity of spermidine catecholamide iron chelators*; Biochemical and Biophysical Research Communications; **1984**; 121(3)
140. C. B. Yoo and P. A. Jones; *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*; Nature Reviews; **2006**; 5; 37-50
141. N. Nishino, D. Yoshikawa, L. A. Watanabe, T. Kato, B. Jose, Y. Komatsu, Y. Sumida, and M. Yoshida; *Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of cyclic tetrapeptides containing a retrohydroxamate as zinc ligand*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; **2004**; 14(10); 2427-2431
142. T. Liu, S. Kuljaca, A. Tee, and G. M. Marshall; *Histone deacetylase inhibitors: Multifunctional anticancer agents*; Cancer Treatment Reviews; **2006**; 32; 157-165
143. P. ten Holte, K. van Emelen, M. Janicot, P. C. Fong, J. S. de Bono, and J. Arts; *HDAC Inhibition in Cancer Therapy: An Increasingly Intriguing Tale of Chemistry, Biology and Clinical Benefit*; Topics in Medicinal Chemistry; **2007**; 1; 293-331
144. B. J. Hernlem, L. M. Vane, and G. D. Saylez; *The Application of Siderophores for Metal Recovery and Waste Remediation: Examination of Correlations for Predication of Metal Affinities*; Water Research; **1999**; 33(4); 951-960
145. D. Wolff-Boenisch and S. J. Traina; *A comparative study of the effect of desferrioxamine B, oxalic acid, and Na-alginate on the desorption of U(VI) from goethite at pH 6 and 25 °C*; Geochimica et Cosmochimica Acta; **2006**; 70(17); 4356-4366
146. P. Illmer; *A commercially available iron-chelating agent, Desferal, promotes Fe- and Al-mobilization in soils*; Soil Biology & Biochemistry; **2006**; 38(6); 1491-1493
147. C. Parra, M. F. Santiago, J. Rodriguez, and N. Durán; *Hydroxamate Iron Complex with Phenoloxidase Activity Acting on Lignin and Chlorolignins*; Biochemical and Biophysical Research Communications; **1998**; 249(3); 719-722
148. M. Arbeloa, G. Goma, J. de Leseleuc, and J.-C. Pommier, *Traitement Enzymatique d'une Pate Ligno-Cellulosique*, **1992**, FR2672066 (A1), France

149. S. J.M. Holmström, U. S. Lundström, R. D. Finlay, and P. A.W. Van Hees; *Siderophores in forest soil solution*; Biogeochemistry; **2004**; 71; 247-258
150. M. Shenker, I. Oliver, M. Helmann, Y. Hadar, and Y. Chen; *Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by Rhizopus arrhizus*; Journal of Plant Nutrition; **1992**; 15; 2173-2182
151. V. Fernández and G. Winkelmann; *The determination of ferric iron in plants by HPLC using the microbial iron chelator desferrioxamine E*; BioMetals; **2005**; 18; 53-62
152. A. Sil, V. S. Ijeri, and A. K. Srivastava; *Coated-wire iron(III) ion-selective electrode based on iron complex of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane*; Sensors and Actuators B: Chemical; **2005**; 106(2); 648-653
153. S. R. Smith and H. Holden Thorp; *Application of the electrocatalytic reduction of nitric oxide mediated by ferrioxamine B to the determination of nitric oxide concentrations in solution*; Inorganica Chimica Acta; **1998**; 273(1-2); 316-319
154. B. Schwyn and J. B. Neilands; *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*; Analytical Biochemistry; **1987**; 160(1); 47-56
155. M. Holzberg and W. M. Artis; *Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens*; Infection and Immunity; **1983**; 40(3); 1134-1139
156. S. M. Payne, *Detection, Isolation, and Characterization of Siderophores*, dans *Methods in Enzimology*. **1994**, Academic Pres, Inc. p. 329-344.
157. S. Pérez-Miranda, N. Cabirol, R. George-Téllez, L.S. Zamudio-Rivera, and F.J. Fernández; *O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection*; Journal of Microbiological Methods; **2007**; 70(1); 127-131
158. A. Baakza, A. K. Vala, B. P. Dave, and H. C. Dube; *A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats*; Journal of Experimental Marine Biology and Ecology; **2004**; 311; 1-9
159. T. Emery and J. B. Neilands; *Periodate Oxidation of Hydroxylamine Derivatives. Products, Scope and Application*; Journal of the American Chemical Society; **1960**; 82(18); 4903-4904
160. T. F. Emery and J. B. Neilands; *Further observations concerning the periodic acid oxidation of hydroxylamine derivatives*; Journal of Organic Chemistry; **1962**; 27(3); 1075-1077
161. I. G. Young, G. B. Cox, and F. Gibson; *2,3-Dihydroxybenzoate as a bacterial growth factor and its route of biosynthesis*; Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects; **1967**; 141(2); 319-31
162. K. Haselwandter and G. Winkelmann, *Chapter 16 : Identification and characterisation of siderophores of mycorrhizal fungi.*, dans *Mycorrhiza Manual*, e. Varma A, Editor. **1998**, Berlin: Springer-Verlag. p. 243-254.
163. C. L. Atkin, J. B. Neilands, and H. J. Phaff; *Rhodotorulic acid from species of Leucosporidium, Rhodosporidium, Rhodotorula, Sporidiobolus, and Sporobolomyces, and a new alanine-containing ferrichrome from Cryptococcus melibiosum*; Journal of Bacteriology; **1970**; 103(3); 722-733
164. X. Hu and G. L. Boyer; *Effect of metal ions on the quantitative determination of hydroxamic acids*; Analytical Chemistry; **1996**; 68(10); 1812-1815
165. G.-A. Snow; *Mycobactin. A growth factor for Mycobacterium johnei. Part II. Degradation, and identification of fragments*; Journal of the Chemical Society (Resumed); **1954**; 2588-2596
166. B. P. Dave and H. C. Dube; *Chemical characterization of fungal siderophores*; Indian Journal of Experimental Biology; **2000**; 38; 56-62

167. W. Rabsch and G. Winkelmann; *The specificity of bacterial siderophore receptors probed by bioassays*; Biology of Metals; **1991**; 4(4); 244-250
168. A. M. Nilius and S. G. Farmer; *Identification of extracellular siderophores of pathogenic strains of Aspergillus fumigatus*; Journal of Medical and Veterinary Mycology; **1990**; 28; 395-403
169. A. F. Vergne, A. J. Walz, and M. J. Miller; *Iron chelators from mycobacteria (1954–1999) and potential therapeutic applications*; Natural Product Reports; **2000**; 17(1); 99-116
170. G.-A. Snow; *Mycobactins: iron-chelating growth factors from mycobacteria.*; Bacteriological Reviews; **1970**; 34(2); 99
171. B. Monzyk and A. L. Crumbliss; *Kinetics and Mechanism of the Stepwise Dissociation of Iron(III) from Ferrioxamine B in Aqueous Acid*; Journal of the American Chemical Society; **1982**; 104(18); 4921-4929
172. D. H. Howard, R. Rafie, A. Tiwari, and K. F. Faull; *Hydroxamate siderophores of Histoplasma capsulatum*; Infection and Immunity; **2000**; 68(4); 2338-2343
173. K. Hantke, G. Nicholson, W. Rabsch, and G. Winkelmann; *Salmochelins, siderophores of Salmonella enterica and uropathogenic Escherichia coli strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN*; Proceedings of the National Academy of Sciences; **2003**; 100(7); 3677-3682
174. P. J. Warner, P. H. Williams, A. Bindereif, and J. B. Neilands; *ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of Escherichia coli.*; Infection and Immunity; **1981**; 33(2); 540-545
175. M. A. F. Jalal and D. van der Helm, *Isolation and Spectroscopic Identification of Fungal Siderophores, dans CRC Handbook of Microbial Iron Chelates.* **1991**, CRC Press. p. 235-269.
176. J. B. Neilands; *A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (Ustilago sphaerogena)*; Journal of the American Chemical Society; **1952**; 74(19); 4846-4847
177. H. Bickel, E. Gäumann, G. Nussberger, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser, A. Wettstein, and H. Zähler; *259. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten - Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrimycine A₁ und A₂, neuer Antibiotika der Sideramin-Gruppe*; Helvetica Chimica Acta; **1960**; 43(7); 2105-2118
178. H. Bickel, R. Bosshardt, E. Gäumann, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser, A. Wettstein, and H. Zähler; *260. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten - Über die Isolierung und Charakterisierung des Ferrioxamine A-F, neuer Wuchsstoffe der Sideramin-Gruppe*; Helvetica Chimica Acta; **1960**; 43(7); 2118-2128
179. W. Keller-Schierlein; *216. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen - Über die Konstitution von Ferrirubin, Ferrirhodin und Ferrichrom A*; Helvetica Chimica Acta; **1963**; 46(6); 1920-1929
180. M. Tschierske, H. Drechsel, G. Jung, and H. Zähler; *Production of rhizoferrin and new analogues obtained by directed fermentation*; Applied Microbiology and Biotechnology; **1996**; 45; 664–670
181. S. J. H. Hickford, F. C. Küpper, G. Zhang, C. J. Carrano, J. W. Blunt, and A. Butler; *Petrobactin Sulfonate, a New Siderophore Produced by the Marine Bacterium Marinobacter hydrocarbonoclasticus*; Journal of Natural Products; **2004**; 67(11); 1897-1899
182. M. K. Wilson, R. J. Abergel, K. N. Raymond, J. E. L. Arceneaux, and B. R. Byers; *Siderophores of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis*; Biochemical and Biophysical Research Communications; **2006**; 348(1); 320-325
183. R. E. Moore and T. Emery; *N^α-Acetylfusarinines: Isolation, Characterization, and Properties*; Biochemistry; **1976**; 15(13); 2719-2723

184. W. R. Burt; *Identification of coprogen B and its breakdown products from Histoplasma capsulatum*; Infection and Immunity; **1982**; 35(3); 990-996
185. H. Zähler, W. Keller-Schierlein, R. Hütter, K. Hess-Leisinger, and A. Deér; *Sideramine aus Aspergillaceen*; Archiv für Mikrobiologie; **1963**; 45; 119-135
186. T. Nishio, N. Tanaka, J. Hiratake, Y. Katsube, Y. Ishida, and J.-I. Oda; *Isolation and Structure of the Novel Dihydroxamate Siderophore Alcaligin*; Journal of the American Chemical Society; **1988**; 110; 8733-8734
187. H. Mor, Y. Kashman, G. Winkelmann, and I. Barash; *Characterization of siderophores produced by different species of the dermatophytic fungi Microsporum and Trichophyton*; BioMetals; **1992**; 5; 213-216
188. M. D. Bentley and R. J. Anderegg; *Isolation and identification of the Principal Siderophore of Dermatophyte Microsporum gypseum*; Biochemistry; **1986**; 25; 1455-1457
189. K. Haselwandter and G. Winkelmann; *Ferricrocin - an ectomycorrhizal siderophore of Cenococcum geophilum*; BioMetals; **2002**; 15; 73-77
190. C. B. Frederick, P. J. Szaniszló, P. E. Vickrey, M. D. Bentley, and W. Shive; *Production and Isolation of Siderophores from the Soil Fungus Epicoccum Purpurascens*; Biochemistry; **1981**; 20; 2432-2436
191. E. D. Letendre and W. A. Gibbons; *Isolation and Purification of Canadaphore, a Siderophore Produced by Helminthosporium Carbanum*; Biochemical and Biophysical Research Communications; **1985**; 129(1); 262-267
192. Rohm and Hass Compagny, *Amberlite™ XAD™, Polymeric Adsorbants*. **2000**.
193. Sigma Aldrich Supelco; *Amberlite XAD-2 Polymeric Adsorbent, Product Specification*; **1997**
194. K. Haselwandter, B. Dobernigg, W. Back, G. Jung, A. Cansier, and G. Winkelmann; *Isolation and Identification of hydroxamate siderophores of ericoid mycorrhizal fungi*; BioMetals; **1992**; 5; 51-56
195. K. M. Ledyard and A. Butler; *Structure of putrebactin, a new dihydroxamate siderophore produced by Shewanella putrefaciens*; Journal of Biological Inorganic Chemistry; **1997**; 2; 93-97
196. M. A. F. Jalal, S. K. Love, and D. van der Helm; *N^α-Dimethylcoprogens, Three novel trihydroxamate siderophores from pathogenic fungi*; Biology of Metals; **1988**; 1; 4-8
197. R. Z. Sayyed and S. B. Chincholkar; *Purification of siderophores of Alcaligenes faecalis on Amberlite XAD*; Bioresource Technology; **2006**; 97; 1026-1029
198. M. Persmark, D. Expert, and J. B. Neilands; *Isolation, Characterisation, and Synthesis of Chrysobactine, a Compound with Siderophore Activity from Erwinia chrysanthemi*; Journal of Biological Chemistry; **1989**; 264(6); 3187-3193
199. G. Benz and D. Schmidt; *Albomycins, IV. - Isolation and total synthesis (N⁵-acetyl-N⁵-hydroxy-L-ornithyl)-(N⁵-acetyl-N⁵-hydroxy-L-ornithyl)-N⁵-acetyl-N⁵-hydroxy-L-ornithine*; Liebigs Annalen der Chemie; **1984**; 1984(8); 1434-1440
200. G. J. Sharman, D. H. Williams, D. F. Ewing, and C. Ratledge; *Determination of the structure of exochelin MN, the extracellular siderophore from Mycobacterium neoaurum*; Chemistry & Biology; **1995**; 2(8); 553-561
201. P. McCormack, P. J. Worsfold, and M. Gledhill; *Separation and detection of siderophores produced by marine bacterioplankton using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry*; Analytical Chemistry; **2003**; 75(11); 2647-2652

202. S. Kilz, C. Lenz, R. Fuchs, and H. Budzikiewicz; *A Fast Screening Method for the Identification of Siderophores from Fluorescent spp. Pseudomonas by Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry*; Journal of Mass Spectrometry; **1999**; 34(4); 281-290
203. J. Lesec, *Chromatographie par perméation de gel, Chromatographie d'exclusion stérique*, dans *Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation*. p. 1-12.
204. E. Lesuisse, P.-L. Blaiseau, A. Dancis, and J.-M. Camadro; *Siderophore uptake and use by the yeast Saccharomyces cerevisiae*; Microbiology; **2001**; 147(2); 289-298
205. L. E. Arnow; *Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures*; Journal of Biological Chemistry; **1937**; 118(2); 531-537
206. E. Fargin, M. Sergent, D. Mathieu, and R. Phan-Tan-Luu; *Aproche méthodologique de la recherche expérimentale*; Bio-sciences; **1985**; 85; 77-82
207. A. Aubert-Pouëssel, M.-C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C.N. Montero-Menei, E. Garcion, D.C. Bibby, P. Menei, and J.-P. Benoit; *In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres*; Journal of Controlled Release; **2004**; 95(3); 463-475
208. J.M. Péan, M.C. Venier-Julienne, R. Filmon, M. Sergent, R. Phan-Tan-Luu, and J.P. Benoit; *Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles*; International Journal of Pharmaceutics; **1998**; 166(1); 105-115
209. société LPRAI, *Comment faire pour que l'expérimentation coûte moins cher et vous apporte le maximum d'information ?*, Pages, 26 Juillet 2008
210. E. Viollier, P. W. Inglett, K. Hunter, A. N. Roychoudhury, and P. van Cappellen; *The ferrozine method revisited: Fe (II)/Fe (III) determination in natural waters*; Applied Geochemistry; **2000**; 15(6); 785-790
211. C. R. Gibbs; *Characterization and application of FerroZine iron reagent as a ferrous iron indicator*; Analytical Chemistry; **1976**; 48(8); 1197-1201
212. R. C. Summerbell; *The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology*; Journal of Clinical Microbiology; **1993**; 31(3); 572-577
213. M. Kodric, A. N. Shah, L. M. Fabbri, and M. Confalonieri; *An Investigation of Airway Acidification in Asthma Using Induced Sputum: A Study of Feasibility and Correlation*; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; **2007**; 175(9); 905-910
214. S. M. Kraemer; *Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores*; Aquatic Sciences; **2004**; 66(1); 3-18
215. G. L. Boyer, S. A. Kane, J. A. Alexander, and D. B. Aronson; *Siderophore formation in iron-limited cultures of Frankia sp. strain 52065 and Frankia sp. strain CeSI5¹*; Canadian Journal of Botany; **1999**; 77(9); 1316-1320
216. B. Haas, J. Kraut, J. Marks, S. C. Zanker, and D. Castignetti; *Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients*; Infection and Immunity; **1991**; 59(11); 3997-4000
217. T. Hoffmann, A. Schutz, M. Brosius, A. Volker, U. Volker, and E. Bremer; *High-salinity-induced iron limitation in Bacillus subtilis*; Journal of bacteriology; **2002**; 184(3); 718-727
218. Xuewu Liu and Frank J. Millero; *The solubility of iron hydroxide in sodium chloride solutions*; Geochimica et Cosmochimica Acta; **1999**; 63(19/20); 3487-3497
219. A. B. Thompson, T. Bohling, F. Payvandi, and S. I. Rennard; *Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis*; Journal of Laboratory and Clinical Medicine; **1990**; 115(2); 148-158

220. D. E. W. Reid, V. Carroll, C. O'May, A. Champion, and S. M. Kirov; *Increased airway iron as a potential factor in the persistence of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis*; European Respiratory Journal; **2007**; 30(2); 286-292
221. T. D. Brogan, H. C. Ryley, L. Neale, and J. Yassa; *Soluble proteins of bronchopulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma, and bronchitis*; Thorax; **1975**; 30(1); 72-79
222. P. Ferenc Levay and M. Viljoen; *Lactoferrin: a General Review*; Haematologica; **1995**; 80(3); 252-267
223. K. A. Pidcock, J. A. Wooten, B. A. Daley, and T. L. Stull; *Iron Acquisition by Haemophilus influenzae*; Infection and Immunity; **1988**; 56(4); 721-725
224. D. W. Reid, G. J. Anderson, and I. L. Lamont; *Cystic fibrosis: ironing out the problem of infection?*; American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology; **2008**; 295(1); L23-L24
225. G. S. de Hoog, F. D. Marvin-Sikkema, G. A. Lahpoor, J. C. Gottschall, R. A. Prins, and E. Gueho; *Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi Pseudallescheria boydii and Scedosporium prolificans*; Mycoses; **1994**; 37; 71-78
226. R. J. Courcol, D. Trivier, M. C. Bissinger, G. R. Martin, and M. R. Brown; *Siderophore production by Staphylococcus aureus and identification of iron-regulated proteins.*; Infection and Immunity; **1997**; 65(5); 1944
227. S. E. Dale, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, and D. E. Heinrichs; *Role of siderophore biosynthesis in virulence of Staphylococcus aureus: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore*; Infection and Immunity; **2004**; 72(1); 29-37
228. S. Konetschny-Rapp, G. Jung, J. Meiwes, and H. Zähler; *Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci*; European Journal of Biochemistry; **1990**; 191(1); 65-74
229. J.-M. Meyer; *Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species*; Archives of Microbiology; **2000**; 174; 135-142
230. H. Hayen and D. A. Volmer; *Rapid identification of siderophores by combined thin-layer chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*; Rapid Communications in Mass Spectrometry; **2005**; 19(5); 711-720
231. D. H. Howard; *Iron gathering by zoopathogenic fungi*; FEMS Immunology and Medical Microbiology; **2004**; 40(2); 95-100
232. M. A. F. Jalal, R. Mocharla, C. L. Barnes, M. Billayet Hossain, D. R. Powell, D. Larry Eng-Wilmot, S. L. Grayson, B. A. Benson, and D. van der Helm; *Extracellular Siderophores from Aspergillus ochraceus*; Journal of Bacteriology; **1984**; 158(2); 683-688
233. C. Wiebe and G. Winkelmann; *Kinetic studies on the specificity of chelate-iron uptake in Aspergillus.*; Journal of Bacteriology; **1975**; 123(3); 837-842
234. G. Charlang, N. G. Bradford, N. H. Horowitz, and R. M. Horowitz; *Cellular and Extracellular Siderophores of Aspergillus nidulans and Penicillium chrysogenum*; Molecular and Cellular Biology; **1981**; 1(2); 94-100
235. E. A. Yates, B. Philipp, C. Buckley, S. Atkinson, S. R. Chhabra, R. E. Sockett, M. Goldner, Y. Dessaux, M. Camara, H. Smith, and P. Williams; *N-Acylhomoserine Lactones Undergo Lactonolysis in a pH-, Temperature-, and Acyl Chain Length-Dependent Manner during Growth of Yersinia pseudotuberculosis and Pseudomonas aeruginosa*; Infection and Immunity; **2002**; 70(10); 5635-5646
236. B. R. O'Driscoll, O. Cromwell, and A. B. Kay; *Sputum leukotrienes in obstructive airways diseases*; Clinical and Experimental Immunology; **1984**; 55(2); 397

237. K. C. Jost Jr., D. F. Dunbar, S. S. Barth, V. L. Headley, and L. B. Elliott; *Identification of Mycobacterium tuberculosis and M. avium complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models*; Journal of Clinical Microbiology; **1995**; 33(5); 1270-1277
238. P. R. Bernstein; *Chemistry and Structure-Activity Relationships of Leukotriene Receptor Antagonists*; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; **1998**; 157(6); 220S-226
239. G. Bhatt and T. P. Denny; *Ralstonia solanacearum Iron Scavenging by the Siderophore Staphyloferrin B Is Controlled by PhcA, the Global Virulence Regulator*; Journal of Bacteriology; **2004**; 186(23); 7896-7904
240. J.-M. El Hage Chahine, A.-M. Bauer, K. Baraldo, C. Lion, F. Ramiandrasoa, and G. Kunesch; *Kinetics and Thermodynamics of Complex Formation between Fe^{III} and Two Synthetic Chelators of the Dicatecholspermidine Family*; European Journal of Inorganic Chemistry; **2001**; 2001; 2287-2296
241. E. A. Fadeev, M. Luo, and J. T. Groves; *Synthesis and structural modeling of the amphiphilic siderophore rhizobactin-1021 and its analogs*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; **2005**; 15(16); 3771-3774
242. E. A. Fadeev, M. Luo, and J. T. Groves; *Synthesis, Structure, and Molecular Dynamics of Gallium Complexes of Schizokinen and the Amphiphilic Siderophore Acinetoferrin*; Journal of the American Chemical Society; **2004**; 126(38); 12065-12075
243. L. Dong and M. J. Miller; *Total Synthesis of Exochelin MN and Analogues*; Journal of Organic Chemistry; **2002**; 67(14); 4759-4770
244. L. Dong, J. M. Roosenberg II, and M. J. Miller; *Total Synthesis of Desferrisalmycin B*; Journal of the American Chemical Society; **2002**; 124(50); 15001-15005
245. M. D. Surman and M. J. Miller; *Synthesis of a Conformationally Restricted Substrate Analogue of Siderophore Biosynthetases*; Organic Letters; **2001**; 3(4); 519-521
246. H. Anke and H. Diekmann; *Biosynthesis of Sideramines in Fungi. Mevalonate as a Precursor of Cis- and Trans-5-hydroxy-3-methyl-2-pentenoic acids*; FEBS Letters; **1971**; 17(1); 115-117
247. J. Widmer and W. Keller-Schierlein; *Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen - Synthesen in der Sideramin-Reihe : Rhodotorulasäure und Dimerumsäure*; Helvetica Chimica Acta; **1974**; 57(7); 1904-1912
248. B. Maurer and W. Keller-Schierlein; *Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 74. Mitteilung [1]. Synthese des Ferrichroms. 1. Teil: (S)- α -Amino- δ -nitro-ovaleriansäure (δ -Nitro-L-norvalin)*; Helvetica Chimica Acta; **1969**; 52(2)
249. G. Muller, S. J. Barclay, and K. N. Raymond; *The mechanism and specificity of iron transport in Rhodotorula pilimanae probed by synthetic analogs of rhodotorulic acid*; Journal of Biological Chemistry; **1985**; 260(26); 13916-13920
250. Y. Isowa, T. Takashima, M. Ohmori, H. Kurita, M. Sato, and K. Mori; *Synthesis of N ^{δ} -Hydroxyornithine*; Bulletin of the Chemical Society of Japan; **1972**; 45(5); 1461-1464
251. Y. Isowa, T. Takashima, M. Ohmori, H. Kurita, M. Sato, and K. Mori; *Synthesis of Rhodotorulic Acid*; Bulletin of the Chemical Society of Japan; **1972**; 45(5); 1467-1471
252. Y. Isowa, T. Takashima, M. Ohmori, H. Kurita, M. Sato, and K. Mori; *Acylation of Nd-Benzylxyornithine*; Bulletin of the Chemical Society of Japan; **1972**; 45(5); 1464-1466
253. T. Fujii and Y. Hatanaka; *A Synthesis of Rhodotorulic Acid*; Tetrahedron; **1973**; 29; 3825-3831

254. M. Sani, G. Candiani, F. Pecker, L. Malpezzi, and M. Zanda; *Novel highly potent, structurally simple γ -trifluoromethyl γ -sulfone hydroxamate inhibitor of stromelysin-1 (MMP-3)*; Tetrahedron Letters; **2005**; 46(14); 2393-2396
255. M. J. Collins; *Microwaves lend a hand*; Modern Drug Discovery; **2004**; JULY
256. O. Miyata, T. Koizumi, H. Asai, R. Iba, and T. Naito; *Imino 1,2-Wittig rearrangement of hydroximates and its application to synthesis of cytoxazone*; Tetrahedron; **2004**; 60(17); 3893-3914
257. K. Jenssen, K. Sewald, and N. Sewald; *Synthesis of Marimastat and a Marimastat Conjugate for Affinity Chromatography and Surface Plasmon Resonance Studies*; Bioconjugate Chemistry; **2004**; 15(3); 594-600
258. P. J. Maurer and M. J. Miller; *Microbial Iron Chelators: Total Synthesis of Aerobactin and Its Constituent Amino Acid, N^6 -Acetyl- N^6 -hydroxy lysine*; Journal of the American Chemical Society; **1982**; 104(11); 3096-3101
259. M.-C. Fournié-Zaluski, A. Coulaud, R. Bouboutou, P. Chaillet, J. Devin, G. Waksman, J. Costentin, and B. P. Roques; *New Bidentates as Full Inhibitors of Enkephalin-Degrading Enzymes: Synthesis and Analgesic Properties*; Journal of Medicinal Chemistry; **1985**; 28(9); 1158-1169
260. V. Dupont, A. Lecoq, J.-P. Mangeot, A. Aubry, G. Boussard, and M. Marraud; *Conformational Perturbations Induced by N-Amination and N-Hydroxylation of Peptided*; Journal of the American Chemical Society; **1993**; 115(20); 8898-8906
261. A. Alanine, A. Bourson, B. Büttelmann, R. Gill, M.-P. Heitz, V. Mutel, E. Pinard, G. Trube, and R. Wyler; *1-Benzoyloxy-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl-amines, a Novel Class of NR1/2B Subtype Selective NMDA Receptor Antagonists*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; **2003**; 13(19); 3155-3159
262. X. Hu, J. Zhu, S. Srivathsan, and D. Pei; *Peptidyl hydroxamic acids as methionine aminopeptidase inhibitors*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; **2004**; 14(1); 77-79
263. Y. Ye, M. Liu, J. L.-K. Kao, and G. R. Marshall; *Peptide-Bond Modification for Metal Coordination: Peptides Containing Two Hydroxamate Groups*; Biopolymers; **2003**; 71(4); 489-515
264. M. Frankel, Y. Knobler, E. Bonni, S. Bittner, and G. Zvilichovsky; *DL-Cyclocanalanine (Cyclohomoserine) and Related Compounds*; Journal of the Chemical Society (C); **1969**; 1746-1749
265. O. Mitsunobu; *The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Product*; Synthesis; **1981**(1); 1-28
266. K. C. K. Swamy, N. N. B. Kumar, E. Balaraman, and K. V. P. P. Kumar; *Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications*; Chemical Reviews; **2009**; Articles ASAP
267. E. K. Dolence and M. J. Miller; *Synthesis of Foroxymithine, a Microbial Fermentation Product and Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitor*; Journal of Organic Chemistry; **1991**; 56(2); 492-499
268. B. H. Lee, G. J. Gerfen, and M. J. Miller; *Constituents of Microbial Iron Chelators. Alternate Syntheses of δ -N-Hydroxy-L-ornithine Derivatives and Applications to the Synthesis of Rhodotorulic Acid*; Journal of Organic Chemistry; **1984**; 49(13); 2418-2423
269. D. W. Knight and M. P. Leese; *A survey of suitable protecting groups for the synthesis of hydroxylamines by Mitsunobu reactions*; Tetrahedron Letters; **2001**; 42; 2593-2595
270. T. Y. H. Wu, C. Hassig, Y. Wu, S. Ding, and P. G. Schultz; *Design, synthesis, and activity of HDAC inhibitors with a N-formyl hydroxylamine head group*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; **2004**; 14(2); 449-453

271. A. O. Stewart and J. G. Martin; *Synthesis of (1-aryl-1-alkylethyl)alkoxyamines*; Journal of Organic Chemistry; **1989**; 54(5); 1221-1223
272. J. M. Roosenberg II and M. J. Miller; *Total Synthesis of the Siderophore Danoxamine*; Journal of Organic Chemistry; **2000**; 65(16); 4833-4838
273. A. G. Anderson Jr. and F. J. Freenor; *Ether Cleavage by Triphenyldibromophosphorane*; Journal of Organic Chemistry; **1972**; 37(4); 626-630
274. A. Hofmann, R. Ren, A. Lough, and U. Fekl; *Highly substituted cyclohexanes: strong proximity effects influence synthetic access to 1,3,5-tris(bromomethyl)-1,3,5-trialkylcyclohexanes (alkyl = methyl, n-propyl)*; Tetrahedron Letters; **2006**; 47(15)
275. Z. Li, S. Crosignani, and B. Linclau; *A mild, phosphine-free method for the conversion of alcohols into halides (Cl, Br, I) via the corresponding O-alkyl isoureas*; Tetrahedron Letters; **2003**; 44(44); 8143-8147
276. H.-P. Nguyen, H. Matondo, and M. Baboulène; *Ionic liquids as catalytic "green" reactants and solvents for nucleophilic conversion of fatty alcohols to alkyl halides*; Green Chemistry; **2003**; 5; 303-305
277. Y. K. Chen, M. Yoshida, and D. W. C. MacMillan; *Enantioselective organocatalytic amine conjugate addition*; Journal of the American Chemical Society; **2006**; 128(29); 9328-9329
278. T. Kolasa and M. J. Miller; *1-Hydroxy-3-amino-2-piperidone (6-N-Hydroxycycloornithine) Derivatives: Key Intermediates for the Synthesis of Hydroxamate-Based Siderophores*; Journal of Organic Chemistry; **1990**; 55(6); 1711-1721
279. S. Fushiya, K. Maeda, T. Funayama, and S. Nozoe; *4-N-Hydroxy-L-2,4-diaminobutyrilic acid. A Strong Inhibitor of Glutamine Synthetase*; Journal of Medicinal Chemistry; **1988**; 31(2); 480-483
280. S. J. Davies, A. P. Ayscough, R. P. Beckett, R. A. Bragg, J. M. Clements, S. Doel, C. Grew, S. B. Launchbury, G. M. Perkins, L. M. Pratt, H. K. Smith, Z.M. Spavold, S. W. Thomas, R.S. Todd, and M. Whittaker; *Structure-Activity Relationships of the Peptide Deformylase Inhibitor BB-3497: Modification of the Methylene Spacer and the P1' Side Chain*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; **2003**; 13(16); 2709-2713
281. J. Hu and M. J. Miller; *A New Method for the Synthesis of N^ε-Acetyl-N^ε-hydroxy-L-lysine, the Iron-Binding Constituent of Several Important Siderophores*; Journal of Organic Chemistry; **1994**; 59; 4858-4861
282. M. J. Milewska and A. Chimiak; *An Alternative Synthesis of N⁵-Acetyl-N⁵-hydroxy-L-ornithine from L-Ornithine*; Synthesis; **1990**(3); 233-234
283. Q. X. Wang, J. Hing, and O. Phanstiel IV; *An Improved Synthesis of O-Benzoyl Protected Hydroxamates*; Journal of Organic Chemistry; **1997**; 62(23); 8104-8108
284. A. M. Berman and J. S. Johnson; *Copper-Catalyzed Electrophilic Amination of Organozinc Nucleophiles: Documentation of O-Benzoyl Hydroxylamines as Broadly Useful R₂N(+) and RHN(+) Synthons*; Journal of Organic Chemistry; **2006**; 71(1); 219-224
285. M.J. Milewska and A. Chimiak; *Oxidation of amino acid. Part V. A novel synthesis of N⁶-Acetyl-N⁶-hydroxylysine from lysine*; Tetrahedron Letters; **1987**; 28(16); 1817-1819
286. Hidetoshi Tokuyama, Takeshi Kuboyama, and Tohru Fukuyama; *Transformation of Primary Amines to N-monoalkylhydroxylamines: N-hydroxy-(S)-1-phenylethylamine oxalate*; Organic Syntheses; **2003**; 80; 207-212
287. J. D. Fields and P. J. Kroop; *Surface-Mediated Reactions. 9. Selective Oxidation of Primary and Secondary Amines to Hydroxylamines*; Journal of Organic Chemistry; **2000**; 65(19); 5937-5941

288. T. Polonski and A. Chimiak; *Oxidation of amino acid esters into N-hydroxyamino acid derivatives*; Tetrahedron Letters; **1974**; 15(28); 2453-2456
289. C. J. Hollowood, S. Yamanoi, and S. V. Ley; *Use of π -allyltricarbonyliron lactone complexes in the synthesis of taurospongins A: a potent inhibitor of DNA polymerase β and HIV reverse transcriptase*; Organic & Biomolecular Chemistry; **2003**; 1(10); 1664-1675
290. P. J. Kocienski, *Protecting Groups*. 3rd ed. **2003**: Thieme.
291. T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*. 2nd ed. **1991**: Wiley-Interscience.
292. K. C. Nicolaou, D. E. Lizos, D. W. Kim, D. Schlawe, R. G. De Noronha, D. A. Longbottom, M. Rodriguez, M. Bucci, and G. Cirino; *Total synthesis and biological evaluation of halipeptins A and D and analogues*; Journal of the American Chemical Society; **2006**; 128(13); 4460-4470
293. M. E. Krafft, Y. Y. Cheung, and K. A. Abboud; *Total Synthesis of ($\pm$)-Asteriscanolide*; Journal of Organic Chemistry; **2001**; 66(22); 7443-7448
294. E. Pretsch, J. Seibl, W. Simon, and T. Clerc, *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*. 2nd, English ed. **1989**: Springer-Verlag.
295. E. J. Corey and J. A. Katzenellenbogen; *A New Stereospecific Synthesis of Trisubstituted and Tetrasubstituted Olefins. The Conjugate Addition of Dialkylcopper-Lithium Reagents to α,β -Acetylenic Esters*; Journal of the American Chemical Society; **1969**; 91(7); 1851-1852
296. S. F. Sabes, R. A. Urbanek, and C. J. Forsyth; *Efficient Synthesis of Okadaic Acid. 2. Synthesis of the C1-C14 Domain and Completion of the Total Synthesis*; Journal of the American Chemical Society; **1998**; 120(11); 2534-2542
297. S. Mori, E. Nakamura, and K. Morokuma; *Mechanism of Addition of Organocuprates to Alkynyl Carbonyl Compounds. A Mechanistic Bridge between Carbocupration and Conjugate Addition*; Organometallics; **2004**; 23(5); 1081-1088
298. P. Van der Veken, I. Kertész, K. Senten, A. Haemers, and K. Augustyns; *Synthesis of (E)- and (Z)-fluoro-olefin analogues of potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors*; Tetrahedron Letters; **2003**; 44(33); 6231-6234
299. P. Van der Veken, K. Senten, I. Kertész, I. De Meester, A.-M. Lambeir, M.-B. Maes, S. Scharpé, A. Haemers, and K. Augustyns; *Fluoro-Olefins as Peptidomimetic Inhibitors of Dipeptidyl Peptidases*; Journal of Medicinal Chemistry; **2005**; 48(6); 1768-1780
300. D. A. Evans and W. Cameron Black; *Total synthesis of (+)-A83543A [(+)-lepicidin A]*; Journal of the American Chemical Society; **1993**; 115(11); 4497-4513
301. R. Esmond, B. Fraser-Reid, and B. B. Jarvis; *Synthesis of Trichoverrin B and Its Conversion to Verrucarins J*; Journal of Organic Chemistry; **1982**; 47(17); 3358-3360
302. W. R. Roush and T. A. Blizzard; *Synthesis of Epoxytrichothecenes: Verrucarins J and Verrucarins J Isomers*; Journal of Organic Chemistry; **1984**; 49(10); 1772-1783
303. C. L. Rand, D. E. van Horn, M. W. Moore, and E.-I. Negishi; *A Versatile and Selective Route to Difunctional Trisubstituted (E)-Alkene Synthons via Zirconium-Catalyzed Carboalumination of Alkynes*; Journal of Organic Chemistry; **1981**; 46(20); 4093-4096
304. K. Jarowicki and P. Kocienski; *Protecting groups*; Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1; **2000**(16); 2495-2527

305. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, and F. Albericio; *Amino Acid-Protecting Groups*; Chemical Reviews; **2009**; Articles ASAP
306. D. Schirlin, F. Gerhart, J. M. Hornsperger, M. Hamon, J. Wagner, and M. J. Jungs; *Synthesis and Biological Properties of α -Mono- and α -Difluoromethyl Derivatives of Tryptophan and 5-Hydroxytryptophan*; Journal of Medicinal Chemistry; **1988**; 31(1); 30-36
307. E. Cama, H. Shin, and D. W. Christianson; *Design of Amino Acid Sulfonamides as Transition-State Analogue Inhibitors of Arginase*; Journal of the American Chemical Society; **2003**; 125(43); 13052-13057
308. R. Albert, J. Danklmainer, H. Höning, and H. Kandolf; *A Simple and Convenient Synthesis of β -Aspartates and γ -Glutamates*; Synthesis; **1987**(7); 635-637
309. J. Ohkanda and A. Katoh; *N-Hydroxyamide-Containing Heterocycles. 4.¹ Synthesis and Fe^{III}-Chelating Properties of Novel Hexadentate Ligands Composed of N-Hydroxy-2(1H)-Pyrazinone, Amino Acid Residues, and Tris(2-aminoethyl)amine*; Journal of Organic Chemistry; **1995**; 60(6); 1583-1589
310. A. Takasu, T. Houjyou, Y. Inai, and T. Hirabayashi; *Three-Dimensional Arrangement of Sugar Residues along a Helical Polypeptide Backbone: Synthesis of a New Type of Periodic Glycopeptide by Polymerization of a β -O-Glycosylated Tripeptide Containing α -Aminoisobutyric Acid*; Biomacromolecules; **2002**; 3(4); 775-782
311. A. Hassner and V. Alexanian; *Direct Room Temperature Esterification of Carboxylic Acids*; Tetrahedron Letters; **1978**; 46; 4975-4978
312. Y. Jin and D. H. Kim; *Inhibition Stereochemistry of Hydroxamate inhibitors for Thermolysin*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; **1998**; 8(24); 3515-3518
313. A. W. Grubbs, G. D. Artman III, and R. M. Williams; *Concise syntheses of the 1,7-dihydropyrano[2,3-g]indole ring system of the stephacidins, aspergamides and norgeamides*; Tetrahedron Letters; **2005**; 46; 9013-9016
314. H. Neumann, A. J. von Wangelin, S. Klaus, D. Strübing, D. Gördes, and M. Beller; *Anilines Made Easily: From Aldehydes to Tri-, Tetra-, and Pentasubstituted Anilines in Two Steps*; Angewandte Chemie International Edition English; **2003**; 42(37); 4503-4507
315. J.-B. Behr, C. Chevrier, A. Defoin, C. Tarnus, and J. Streith; *Asymmetric synthesis of potent glycosidase and very potent α -mannosidase inhibitors: 4-amino-4-deoxy-L-erythrose and 4-amino-4,5-dideoxy-L-ribose*; Tetrahedron; **2003**; 59(4); 543-553
316. K. Takahashi, M. Ikura, H. Habashita, M. Nishizaki, T. Sugiura, S. Yamamoto, S. Nakatani, K. Ogawa, H. Ohno, H. Nakai, and M. Toda; *Novel matrix metalloproteinase inhibitors: Generation of lead compounds by the in silico fragment-based approach*; Bioorganic & Medicinal Chemistry; **2005**; 13(14); 4527-4543
317. C. Arribas, M. C. Carreño, J. L. García-Ruano, J. F. Rodríguez, M. Santos, and M. Ascensión Sanz-Tejedor; *First Asymmetric Hetero Diels-Alder Reaction of 1-Sulfinyl Dienes with Nitroso Derivatives. A New Entry to the Synthesis of Optically Pure 1,4-Imino-L-ribitol Derivatives*; Organic Letters; **2000**; 2(20); 3165-3168
318. B. H. Lee and M. J. Miller; *Natural Ferric Ionophores: Total Synthesis of Schizokinen, Schizokinen A, and Arthrobactin*; Journal of Organic Chemistry; **1983**; 48(1); 23-31
319. G. Pattenden and T. Thompson; *Design and synthesis of novel tubular and cage structures based on thiazole-containing macrolactams related to marine cyclopeptides*; Chemical Communications; **2001**(8); 717-718
320. T. C. Nugent, R. Seemayer, and J. Liang; *Process for the Preparation of (S,S)-Cis-2-Phenyl-3-aminopiperidine*, **2004**, WO 2004/037174 A2, USA

321. M. H. Rabinowitz, R. C. Andrews, J. D. Becherer, D. M. Bickett, D. G. Bubacz, J. G. Conway, D. J. Cowan, M. Gaul, K. Glennon, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, D. L. McDougald, M. L. Moss, D. L. Musso, and M. C. Rizzolio; *Design of selective and soluble inhibitors of tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE)*; Journal of Medicinal Chemistry; **2001**; 44(24); 4252-4267
322. H. A. Moynihan, S. M. Roberts, H. Weldon, G. H. Allcock, E. E. Änggård, and T. D. Warner; *Synthesis and biological activity of the novel nitric oxide synthase inhibitor N^ω-hydroxy-N^ω-methyl-L-arginine*; Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1; **1994**(7); 769-771
323. F. Yokokawa, H. Sugiyama, T. Shioiri, N. Katagiri, O. Oda, and H. Ogawa; *An expeditious synthesis of pentosidine, an advanced glycation end product*; Tetrahedron; **2001**; 57(22); 4759-4766
324. J. Ludwig, S. Bovens, C. Brauch, A.S. Elfringhoff, and M. Lehr; *Design and synthesis of 1-indol-1-yl-propan-2-ones as inhibitors of human cytosolic phospholipase A2?*; Journal of Medicinal Chemistry; **2006**; 49(8); 2611-2620
325. T. Tuccinardi, A. Martinelli, E. Nuti, P. Carelli, F. Balzano, G. Uccello-Barretta, G. Murphy, and A. Rossello; *Amber force field implementation, molecular modelling study, synthesis and MMP-1/MMP-2 inhibition profile of (R)- and (S)-N-hydroxy-2-(N-isopropoxybiphenyl-4-ylsulfonamido)-3-methylbutanamides*; Bioorganic & Medicinal Chemistry; **2006**; 14(12); 4260-4276
326. J. C. Hodges, W. Wang, and F. Riley; *Synthesis of a Spirocyclic Indoline Lactone*; Journal of Organic Chemistry; **2004**; 69(7); 2504-2508
327. K. A. Fennell and M. J. Miller; *Syntheses of amamistatin fragments and determination of their HDAC and antitumor activity*; Organic Letters; **2007**; 9(9); 1683-1685
328. A. J. Clark and J. L. Peacock; *Stereoselectivity in amidyl radical cyclisations. Acyl mode cyclisations*; Tetrahedron Letters; **1998**; 39(33); 6029-6032
329. C. Lamberth, F. Cederbaum, A. Jeanguenat, H.-J. Kempf, M. Zeller, and R. Zeun; *Synthesis and fungicidal activity of N-2-(3-methoxy-4-propargyloxy)phenethyl amides. Part II: Anti-oomycetic mandelamides*; Pest Management Science; **2006**; 62(5); 446-451
330. Q. X. Wang and O. Phanstiel IV; *Total synthesis of acinetoferrin*; Journal of Organic Chemistry; **1998**; 63(5); 1491-1495
331. A. Nemchik, V. Badescu, and O. Phanstiel IV; *N-(Benzoyloxy)amines: An investigation of their thermal stability, synthesis, and incorporation into novel peptide constructs*; Tetrahedron; **2003**; 59(24); 4315-4325
332. S.-Y. Han and Y.-A. Kim; *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*; Tetrahedron; **2004**; 60(11); 2447-2467
333. F.-L. Zhang, W. B. Schweizer, M. Xu, and A. Vasella; *A New Synthesis of Pteridines Substituted with Branched and Linear Alkenyl Groups at C(6). The Nitroso-Ene Reaction of 4-(Alkenoylamino)-5-nitrosopyrimidines*; Helvetica Chimica Acta; **2007**; 90; 521-534
334. H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, and A. Nudelman; *NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities*; Journal of Organic Chemistry; **1997**; 62(21); 7512-7515
335. D. Mossialosa and G. D. Amoutzias; *Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends ?*; International Journal of Medical Microbiology; **2009**; 299; 87-98
336. B. Schmekel, L. Seveus, S. Y. Xu, and P. Venge; *Human neutrophil lipocalin (HNL) and myeloperoxidase (MPO). Studies of lung lavage fluid and lung tissue*; Respiratory Medecine; **2000**; 94; 564-568

337. H. Ouchetto, M. Dias, R. Mornet, E. Lesuisse, and J.-M. Camadro; *A new route to trihydroxamate-containing artificial siderophores and synthesis of a new fluorescent probe*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **2005**; 13(5); 1759-1803
338. B. P. Callahan, J. V. Lomino, and R. Wolfenden; *Nanomolar inhibition of the enterobactin biosynthesis enzyme, EntE: Synthesis, substituent effects, and additivity*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **2006**; 16(14); 3802-3805

Liste des Figures

Figure 1 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B, C) de <i>S. apiospermum</i>	17
Figure 2 : Ulcérations provoquées par <i>S. apiospermum</i> au niveau de l'articulation des doigts	19
Figure 3 : Antifongiques utilisés en thérapeutique : a) amphotéricine B, b) 5-fluorocytosine, c) ketoconazole, d) ravuconazole, e) itraconazole, f) voriconazole, g) posaconazole	21
Figure 4 : Les différents mécanismes d'acquisition du fer par les champignons.....	23
Figure 5 : Mécanismes de transport du fer : A) système navette, B) système taxi	24
Figure 6 : Classification des sidérophores selon la fonction chimique : a) phénol/catéchol, b) hydroxamate, c) acide α -hydroxycarboxylique	25
Figure 7 : Exemples de sidérophores n'appartenant à aucune classe définie : a) aërobactine, b) anguibactine, c) acide avénique, d) nicotianamine	25
Figure 8 : Exemples de sidérophores appartenant à la classe des phénols/cathécols (A), des hydroxamates (B) et des acides α -hydroxycarboxyliques (C).....	26
Figure 9 : Action de la <i>L</i> -ornithine N ⁵ -oxygenase sur l'ornithine.....	28
Figure 10 : Noyau catéchol présent dans la structure de la dopamine	29
Figure 11 : Molécules chélatrices du fer capables de traverser la barrière hémato-encéphalique	30
Figure 12 : Chélateurs du fer utilisés en thérapeutique : a) déféroxamine B, b) déféripnone, c) déférasirox	30
Figure 13 : Structure des ferri-sidérophores utilisés en thérapeutique : A) déféroxamine B, B) déféripnone, C) déférasirox	32
Figure 14 : Exemple de complexe où le fer ferrique n'est pas entièrement complexé par insuffisance en ligands déféripnone	32
Figure 15 : Néoénactines à activité antifongique	33
Figure 16 : Structure de l'albomycine, de la ferrimycine et de la salmycine.....	34
Figure 17 : Exemples de conjugués sidérophore-molécule à activité antifongique	35
Figure 18 : Structure de l'acide dimérumique.....	36
Figure 19 : Structure chimique du paraquat (A) et de la doxorubicine (B)	36
Figure 20 : Sidérophores à activité antiproliférative : a) hadacine, b) déferrithiocine.....	38
Figure 21 : Mécanisme d'action des HDAC et HAT (HDAC: histone déacétylase, HAT: histone acétylase)	38
Figure 22 : Complexe fer/CAS/HDTMA de couleur bleue	42
Figure 23 : Détection des sidérophores sécrétés par un microorganisme cultivé sur milieu gélifié CAS.....	42
Figure 24 : Spectre d'absorbance de la féroxamine B dans l'UV-visible.....	43
Figure 25 : Test biologique en milieu gélifié pour la mise en évidence de la production de sidérophores	46
Figure 26 : Méthodes d'extraction des sidérophores ; A, extraction en une étape, B, extraction en deux étapes	48
Figure 27 : Extraction sur résine de type Amberlite XAD.....	50
Figure 28 : Etapes de préparation de l'extrait avant l'extraction des sidérophores de <i>S.</i> <i>apiospermum</i>	57
Figure 29 : Détection sur milieu gélifié CAS de la sécrétion de sidérophores par diverses souches fongiques : A, isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose : <i>S.</i> <i>apiospermum</i> IHEM 14451 (1) et IHEM 15149 (2) et <i>S. aurantiacum</i> LMA 40704806 col.a (3) ; B, isolats cliniques de <i>S. apiospermum</i> IHEM 15155 (4) et IHEM 13945 (5), et souche environnementale de <i>S. apiospermum</i> IHEM 20812 (6).....	63

Figure 30 : Etude de la cinétique de production de sidérophores par <i>S. apiospermum</i> IHEM 15155 en fonction du pH.....	66
Figure 31 : Chromatogramme de l'extrait brut à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic I (B, masse m/z = 537,9, à t _r = 3,2 min) et du pic II (C, masse m/z = 793,9, à t _r = 6 min)	67
Figure 32 : Spectres de masse du pic I (t _r = 3,1-4,2 min) et du pic II (t _r = 5,7-6,2 min) obtenus par LC-ESI+MS	68
Figure 33 : Spectres de masse après fragmentation MS ⁿ des produits de masse correspondant au pic I (A, MS ² m/z = 537,9) et au pic II, (B, MS ² m/z = 793,9 ; C, MS ³ m/z = 793,9 suivi de m/z = 648,9).....	69
Figure 34 : Concentration en fer dans le boudin de dialyse contenant une protéine d'hôte en présence de <i>S. apiospermum</i> IHEM 15155	71
Figure 35 : Electrophorèse urée-PAGE après 7 jours d'incubation de <i>S. apiospermum</i> en présence d'holo-transferrine. Témoins holo-transferrine mono- et bi-ferrique (piste 1), apo-transferrine (piste 2) et dialysat (piste 3).....	71
Figure 36 : Electrophorèse urée-PAGE après 7 jours d'incubation de <i>S. apiospermum</i> en présence de ferritine. Témoins ferritine (piste 1) et dialysat (piste 2).....	72
Figure 37 : Chromatogrammes des extraits de filtrats de culture de 10 souches de <i>S. apiospermum</i> , ° isolats cliniques (mucoviscidose), * souches d'origine environnementale	73
Figure 38 : Chromatogrammes des filtrats de culture de <i>S. apiospermum</i> obtenus par deux méthodes d'extraction : liquide/liquide et XAD4	74
Figure 39 : Comparaison des méthodes d'extraction par Amberlite XAD-4 et liquide/liquide, des sidérophores produits par <i>S. apiospermum</i> ; rendement d'extraction (A) et pureté de l'extrait (B) en sidérophore m/z = 794	75
Figure 40 : Répartition des pourcentages d'extraction des sidérophores en fonction des expériences ; en dessous, boîte à moustaches représentant la répartition des données....	77
Figure 41 : Quantification des effets des différents paramètres sur le rendement d'extraction en % (A) et la pureté du produit (B).....	79
Figure 42 : Rendement de l'extraction pour les sidérophores de <i>S. apiospermum</i> extraits (A) et pureté de l'extrait (B) obtenu avec ou sans ajout de fer sur résine Amberlite XAD-4 analysé par CLHP.....	79
Figure 43 : Détection sur milieu gélosé CAS pour quatre espèces de champignons : <i>A. flavus</i> (1), <i>A. fumigatus</i> (2), <i>A. terreus</i> (3) et <i>E. dermatitidis</i> (4).....	80
Figure 44 : Chromatogrammes de l'extrait brut d' <i>A. flavus</i> à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic I (B, masse m/z = 801,1).....	82
Figure 45 : Spectres de masse du pic I de l'extrait d' <i>A. flavus</i> (A, t _r = 7,4-8,8 min) obtenus par LC-ESI+-MS	82
Figure 46 : Chromatogrammes de l'extrait brut d' <i>A. terreus</i> à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic I (B, masse m/z = 538,0), du pic II (C, masse m/z = 801,1) et du pic III (D, masse m/z = 822,2).....	83
Figure 47 : Spectres de masse des pics de l'extrait d' <i>A. terreus</i> obtenus par LC-ESI+-MS ; A) pic I (t _r = 3,0-4,6 min), B) pic II (t _r = 7,5-8,2 min), C) pic III (t _r = 8,3-8,9 min).....	84
Figure 48 : Chromatogrammes de l'extrait brut d' <i>A. fumigatus</i> à 435 nm (A) et d'extraction de masse du pic III (B, masse m/z = 907,2), du pic IV (C, masse m/z = 906,2)	85
Figure 49 : Spectres de masse des pics de l'extrait d' <i>A. fumigatus</i> obtenus par LC-ESI+-MS ; A) pic III (t _r = 10,9-11,8 min), B) pic IV (t _r = 12,4-13,6 min)	86
Figure 50 : Chromatogrammes obtenus à 435 nm pour l'analyse des différents crachats	87
Figure 51 : Structure de l'acide dimérumique (A) et du N ^α -méthyl coprogène B (B).....	91
Figure 52 : Fragmentation des complexes fer(III) de l'acide dimérumique (A) et du N ^α -méthyl coprogène B (B) par ESI+-MS.....	92

Figure 53 : Mécanisme de soustraction du fer à une protéine d'hôte par <i>S. apiospermum</i> à travers la membrane de dialyse.	94
Figure 54 : Production de sidérophores par <i>S. apiospermum</i> sur milieu gélosé CAS : A) par isolat clinique ou souche, B) par regroupement des souches en fonction de leur origine	96
Figure 55 : Quantification de la production en N ^α -méthyl coprogène B de 10 souches de <i>S. apiospermum</i>	97
Figure 56 : Degrés de protonation de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque	99
Figure 57 : Structures des sidérophores extraits par la résine Amberlite XAD-4 ; A) pétrobactine, B) chrysobactine, C) bacillibactine	99
Figure 58 : Structure des sidérophores sécrétés par les microorganismes responsables d'infections respiratoires dans la mucoviscidose ; A) les pyoverdines, B) staphyloferrine A, C) pyochéline, D) coprogène, E) N,N',N''-triacétylfusarinine C, F) ferricrocine, G) ferrichrysine, H) ferrichrome	102
Figure 59 : Structures chimiques de molécules détectées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose ; A) N-acylhomosérine lactones, B) leucotriène D4, C) pyoverdine, D) mycoliate de 6,7-diméthoxycoumarine	104
Figure 60 : Structure des N-acyl-N-hydroxyornithine	109
Figure 61 : Biosynthèse des N-acyl-N-hydroxyornithine	110
Figure 62 : Biosynthèse de l'acide (2E)-5-hydroxy-3-méthylpent-2-énoïque	110
Figure 63 : Synthèse de l'acétate de (3E)-5-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-3-méthyl-5-oxopent-3-en-1-yl (3) par Widmer et coll.	111
Figure 64 : Réaction de déshydratation du 5-acétoxy-3-hydroxy-3-méthylpentanoate de <i>t</i> -butyle	111
Figure 65 : Synthèse de l'acide dimérumique par Widmer et coll.	112
Figure 66 : Structure de l'acide rhodotorulique	112
Figure 67 : Synthèse de l'acide rhodotorulique par Widmer et coll.	113
Figure 68 : Synthèse de l'acide rhodotorulique par Isowa et coll.	114
Figure 69 : Synthèse de l'acide rhodotorulique par Fujii et coll.	115
Figure 70 : Stratégie générale de la formation de la fonction hydroxamate	116
Figure 71 : Substitution nucléophile par un acide hydroxamique ; X= Br, OH (réaction de Mitsunobu)	116
Figure 72 : Différentes stratégies de substitution de l'alcool par l'hydroxylamine	117
Figure 73 : Formation d'hydroxylamine par addition [1,4] sur une double liaison	117
Figure 74 : Préparation d'hydroxylamine N-substituée <i>via</i> la préparation d'une hydroxylimine	118
Figure 75 : Formation de l'hydroxylamine par oxydation de la fonction imine	118
Figure 76 : Formation de l'hydroxylamine oxydation directe d'une amine	119
Figure 77 : Formation de l'hydroxylamine réduction du groupement nitro en hydroxylamine	119
Figure 78 : Comparaison de la structure de trois sidérophores, A) acide dimérumique, B) N ^α -méthyl coprogène B, C) fusarinine	121
Figure 79 : Etude rétrosynthétique de la fusarinine	122
Figure 80 : Etude rétrosynthétique du N ^α -méthyl coprogène B	123
Figure 81 : Etude rétrosynthétique de l'acide dimérumique	124
Figure 82 : Autres sidérophores ayant la fusarinine comme synthon de base ; A) asperchrome B1, B) coprogène, C) N,N',N''-Triacétylfusarinine C	125
Figure 83 : Formation du 4-(<i>t</i> -buthyldiphénysilanyloxy)but-1-yne	126
Figure 84 : Mécanisme de formation du 5-(alkyloxy)pent-2-ynate d'alkyle	126
Figure 85 : Formation du (2Z)-5-(alkyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-énate d'alkyle	127

Figure 86 : Mécanisme de formation des deux isomères du 5-(alkyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène d'alkyle	128
Figure 87 : Gène stérique provoqué par les différents groupements substituant de l'alcène chez le 5-(<i>t</i> -butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène de fluorénylméthyle	128
Figure 88 : Corrélations NOE caractéristiques de la configuration de la double liaison du 5-(<i>t</i> -butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)-pent-2-ène d'alkyle.....	129
Figure 89 : Spectre NOESY du (2 <i>Z</i>)-5-(<i>ter</i> -butyldiméthylsilanyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (33a)	129
Figure 90 : Structure du (2 <i>Z</i>) 5-(tétrahydropyranyloxy)-3-(phénylthio)pent-2-énoate de méthyle (33d)	130
Figure 91 : Formation du (2 <i>E</i>) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'alkyle.....	131
Figure 92 : Corrélations NOE caractéristiques de la configuration de la double liaison du 5-(<i>t</i> -butyldiméthylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'alkyle.....	131
Figure 93 : Spectre ¹ H-RMN NOESY de la molécule (2 <i>E</i>) 5-(<i>ter</i> -butyldiméthylsilanyloxy)-3-méthylpent-2-énoate de méthyle	131
Figure 94 : Formation du (2 <i>Z</i>) 5-(<i>ter</i> -butyldiméthylsilyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'éthyle.....	132
Figure 95 : Mécanisme de formation du (2 <i>Z</i>) 5-(<i>ter</i> -butyldiméthylsilyloxy)-3-méthylpent-2-ène d'éthyle	133
Figure 96 : Formation de l'acide (2 <i>E</i>) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque	133
Figure 97 : Exemples de synthèses de l'acide (2 <i>E</i>) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque préalablement publiées.....	134
Figure 98 : Synthèse de l'acide (2 <i>E</i>) 5-(alkyloxy)-3-méthylpent-2-énoïque	135
Figure 99 : Stratégie de formation de l'acide glutamique protégé	136
Figure 100 : Formation du (2 <i>S</i>) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoate de <i>t</i> -butyle en 3 étapes	137
Figure 101 : Mécanisme de formation de l'acide (2 <i>S</i>) 2-amino-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoïque	137
Figure 102 : Mécanisme de formation du (2 <i>S</i>) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-(méthyloxycarbonyl)-butanoate de <i>t</i> -butyle	138
Figure 103 : Formation du (2 <i>S</i>) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-hydroxybutanoate de <i>t</i> -butyle	139
Figure 104 : Mécanisme de formation de la <i>N</i> -benzyloxycarbonyl- <i>O</i> -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-hydroxylamine.....	140
Figure 105 : Formation du (2 <i>S</i>) <i>N</i> ^δ -(benzyloxycarbonyl)- <i>O</i> -(<i>t</i> -butyloxycarbonyl)-2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-(hydroxylamino)pentanoate de <i>t</i> -butyle	140
Figure 106 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu	141
Figure 107 : Formation du (2 <i>S</i>) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-(hydroxylamino)pentanoate de <i>t</i> -butyle.....	142
Figure 108 : Mécanisme de formation de l'ornithine protégée 53 à partir de 51	142
Figure 109 : Résumé de la formation de l'ornithine protégée 53 à partir d'acide glutamique	143
Figure 110 : Formation du (2 <i>S</i>) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)pentanoïque	144
Figure 111 : Stratégie d'obtention du (2 <i>S</i>) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-aminopentanoate de <i>t</i> -butyle.....	144
Figure 112 : Formation du (2 <i>S</i>) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)pentanoate de <i>t</i> -butyle.....	145

Figure 113 : Formation du (2S) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-aminopentanoate de <i>t</i> -butyle	145
Figure 114 : Mécanisme d'oxydation et d'acylation d'une amine par le peroxyde de dibenzoyle	146
Figure 115 : CCM de comparaison des différentes méthodes de séchage du BPO au cours de la réaction (silice, 2:98 méthanol/dichlorométhane, révélation par de la ninhydrine) ; 1) pas de séchage, 2) ajout de sulfate de sodium dans le milieu, 3) ajout de tamis moléculaire dans le milieu, 4) filtration du mélange DMF/BPO sur sulfate de magnésium	147
Figure 116 : Formation du (2S) 2-(<i>t</i> -butyloxycarbonylamino)-5-(phénylcarbonyloxyamino)-pentanoate de <i>t</i> -butyle	148
Figure 117 : Synthèse de la <i>N</i> ⁵ -oxyornithine	148
Figure 118 : synthèse de la fusarinine protégée	149
Figure 119 : Fragmentation par spectrométrie de masse obtenue par ionisation négative en électrospray de la molécule 60	149
Figure 120 : Déprotection de la fusarinine	150
Figure 121 : Spécificité des protections de la fusarinine 60	150
Figure 122 : Autres sidérophores ayant la fusarinine comme synthon de base ; A) asperchrome B1, B) coprogène, C) <i>N,N',N''</i> -Triacetylfusarinine C [5]	151
Figure 123 : Structure de l'acide dimérumique (A) et du <i>N</i> ^α -méthyl coprogène B (B).....	175
Figure 124 : Synthèse de la fusarinine protégée 60.....	177
Figure 125 : Sidérophores détectés dans le genre <i>Aspergillus</i> : A) ferrichrysine, B) <i>N,N',N''</i> -triacétylfusarinine C, C) coprogène	178

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison des trois principaux chélateurs du fer utilisés en thérapeutique.....	31
Tableau 2 : Caractéristiques des différentes résines.....	50
Tableau 3 : Origines des champignons testés.....	52
Tableau 4 : Domaine expérimental étudié pour l'extraction par la résine Amberlite XAD-4 .	58
Tableau 5: Matrice d'expériences.....	58
Tableau 6 : Plan d'expérimentation pour l'étude de l'extraction des sidérophores par la résine XAD-4.....	59
Tableau 7 : Analyse mycologique des crachats	62
Tableau 8 : Détection de la production de sidérophores sur milieu gélosé CAS d'isolats cliniques fongiques.....	64
Tableau 9 : Détection de la production de sidérophores sur milieu gélosé CAS de souches fongiques environnementales.....	64
Tableau 10 : Comparaison des valeurs statistiques de la production de sidérophores sur milieu gélosé CAS.....	65
Tableau 11 : t_c calculé pour le test de Student sur l'évaluation de la production de sidérophores par le rapport CAS ($t_c > 1,662$: significatif à 10%, $t_c > 1,987$: significatif à 5%).....	65
Tableau 12 : Production de sidérophores chez divers souches de <i>S. apiospermum</i>	73
Tableau 13 : Efficacité et spécificité en pourcentage de l'extraction par Amberlite XAD-4 des sidérophores pour l'ensemble des expériences du plan	77
Tableau 14 : Production de sidérophores sur milieu gélosé CAS par des espèces fongiques impliquées dans la mucoviscidose	81
Tableau 15 : Caractéristiques chromatographiques des pics détectés dans les filtrats de culture de champignons filamenteux isolés de patients atteints de mucoviscidose	86
Tableau 16 : Microorganismes responsables d'infections respiratoires dans la mucoviscidose et leurs sidérophores.....	101
Tableau 17 : Masses molaires de différents sidérophores produits par des microorganismes responsables d'infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose	105
Tableau 18 : Résumé des différentes stratégies d'obtention de la fonction hydroxylamine..	120

Annexes

Annexe 1	Composition du milieu YNB.....	208
Annexe 2	Dosage du fer par la méthode à la ferrozine	209
Annexe 3	Documentation technique sur la résine Amberlite XAD-4.....	213
Annexe 4	Table des valeurs critiques du test de Student.....	216
Annexe 5	Publications et travaux.....	217
Annexe 6	Biometals 2009	219

Annexe 1 Composition du milieu YNB

<u>Salts</u>	<u>mg/Liter</u>	Yeast Nitrogen Base (YNB) Dropout Base (DOB) Synthetic Defined Media (SD)
Potassium Phosphate, monobasic	1000	
Magnesium Sulfate	500	
Sodium Chloride	100	
Calcium Chloride	100	Yeast Nitrogen Base (YNB) Dropout Base (DOB) Synthetic Defined Media (SD)
<u>Vitamins</u>	<u>mg/Liter</u>	
Biotin	0.002	
Pantothenate, calcium	0.4	
Folic Acid	0.002	
Inositol	2	
Niacin	0.4	
PABA	0.2	
Pyridoxine, HCl	0.4	
Riboflavin	0.2	
Thiamine, HCl	0.4	
<u>Trace Elements</u>	<u>mg/Liter</u>	
Boric Acid	0.5	
Copper Sulfate	0.04	
Potassium Iodide	0.1	
Ferric Chloride	0.2	
Manganese Sulfate	0.4	
Sodium Molybdate	0.2	
Zinc Sulfate	0.4	
<u>Nitrogen</u>	<u>g/Liter</u>	Yeast Nitrogen Base (YNB) Dropout Base (DOB) Synthetic Defined Media (SD)
Ammonium Sulfate	5	
<u>Sugar</u>	<u>g/Liter</u>	Yeast Nitrogen Base (YNB) Dropout Base (DOB) Synthetic Defined Media (SD)
Dextrose	20	
<u>CSM Mixture</u>	<u>mg/Liter</u>	Yeast Nitrogen Base (YNB) Dropout Base (DOB) Synthetic Defined Media (SD)
Adenine	10	
L-Arginine HCl	50	
L-Aspartic Acid	80	
L-Histidine HCl	20	
L-Isoleucine	50	
L-Leucine	100	
L-Lysine HCl	50	
L-Methionine	20	
L-Phenylalanine	50	
L-Threonine	100	
L-Tryptophan	50	
L-Tyrosine	50	
Uracil	20	
L-Valine	140	

SDA = SD recipe + 1.7 g/L of Agar; DOBA = DOB recipe + 1.7 g/L of Agar

Annexe 2 Dosage du fer par la méthode à la ferrozine

1965239001V8

Fe
Fer



● Réactifs utilisables sur les analyseurs Roche/Hitachi suivants :

Réf.	Flacon	Contenu	717	747	747-400	902	904	911 912	917	MOD P	MOD D
11876996	1	REAGENT 6 x 64 ml									
	2	REAGENT 6 x 16 ml							●	●	
11929658	1	REAGENT 6 x 258 ml								●	●
11929666	2	REAGENT 6 x 68 ml									
11929674	1	REAGENT 4 x 641 ml									●
11929682	2	REAGENT 4 x 278 ml									
11970704	1	REAGENT 12 x 50 ml	●			●	●	●			
	2	REAGENT 6 x 20 ml									
11970747	1	REAGENT 6 x 100 ml	●				●	●			
	2	REAGENT 3 x 46 ml									
11970771	1	REAGENT 5 x 500 ml		●							
11970798	2	REAGENT 5 x 200 ml									
11970828	1	REAGENT 4 x 1020 ml			●						
11970844	2	REAGENT 4 x 430 ml									

Les analyseurs et les coffrets ne sont pas tous disponibles dans tous les pays. Pour l'utilisation sur d'autres analyseurs, veuillez contacter la société Roche Diagnostics de votre pays.

Français

Codes d'application

Pour Roche/Hitachi 904/911/912/917/MOD P/MOD D : ACN 661

Domaine d'utilisation

Test *in vitro* pour la détermination quantitative du fer dans le sérum et le plasma humains à l'aide des analyseurs automatiques de chimie clinique de Roche.

Généralités¹⁻⁵

Le fer apporté par l'alimentation est principalement résorbé sous forme de Fe^{2+} dans le duodénum et le jejunum proximal. A côté du fer hémérique divalent d'origine alimentaire se trouve du fer trivalent d'origine alimentaire qui doit être réduit à l'état ferreux par la vitamine C. Env. 1 mg de fer est absorbé quotidiennement. Les ions Fe^{2+} qui pénètrent dans les cellules muqueuses sont pris en charge par des substances de transport. Avant de passer dans le plasma, ils sont oxydés en Fe^{3+} par la céruléoplasmine ; c'est sous cette forme que le fer est lié à la transferrine. Le transport du fer dans le plasma se fait sous forme de complexe transferrine-fer. Une molécule de transferrine peut transporter au maximum deux ions Fe^{3+} . La quasi-totalité du fer sérique est lié à la transferrine.

Les dosages de fer (non hémérique) sont utiles pour le diagnostic et le suivi des anémies ferriprives, des hémochromatoses (maladies dues au dépôt dans les tissus de deux pigments ferrugineux, l'hémossidérite et l'hémofuchine, et caractérisées par une pigmentation de la peau) ainsi que des maladies rénales chroniques. On effectue des dosages de fer pour le diagnostic et le suivi d'anémies microcytaires (anémies dues à un trouble du métabolisme du fer ou à une hémoglobinoopathie par ex.), d'anémies macrocytaires (anémies par déficit en vitamine B12 ou en acide folique, anémies dues à un trouble du métabolisme induit par des médicaments ou d'étiologie inconnue par ex.) et d'anémies normocytaires (anémie due à une insuffisance rénale (déficit en érythropoïétine), anémie hémolytique, anémie due à une hémoglobinoopathie, une insuffisance médullaire ou des lésions médullaires d'origine toxique par ex.). De nombreuses méthodes photométriques ont été décrites pour le dosage du fer. Toutes ont en commun les étapes suivantes :

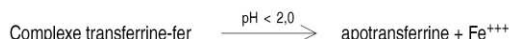
- dissociation des ions Fe^{3+} du complexe transferrine-fer à l'aide d'acides ou de détergent
- réduction du fer ferrique en fer ferreux
- réaction des ions Fe^{2+} avec un chromogène avec formation d'un dérivé coloré.

La méthode décrite ci-après est une méthode de dosage sans déprotéinisation qui fait appel à la FerroZine.

Principe

Test colorimétrique.

- Le réactif R1 (tampon/détergent) est ajouté à l'échantillon.
- Addition de R2 (ascorbate/FerroZine) et déclenchement de la réaction :



Les ions Fe^{3+} sont détachés, à un pH acide, de la transferrine. Les échantillons lipémiques sont clarifiés par un détergent. L'ascorbate réduit les ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} . Fe^{2+} forme un complexe coloré avec la FerroZine. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en fer et est mesurée par photométrie.

Réactifs - composition et concentrations

R1 Acide citrique : 200 mmol/l ; thiourée : 115 mmol/l ; détergent.

R2 Ascorbate de sodium : 150 mmol/l ; FerroZine : 6 mmol/l ; conservateur

Précautions d'emploi et mises en garde

Pour diagnostic *in vitro*.

Observer les précautions habituelles de manipulation en laboratoire. Mise en garde: ce réactif contient de la thiourée, substance connue des autorités californiennes comme pouvant provoquer le cancer ou des lésions affectant la reproduction. Elle peut aussi provoquer une irritation de la peau. En cas de contact, rincer abondamment avec de l'eau. En cas de contact avec les yeux ou d'ingestion, consulter immédiatement un médecin. Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels. L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux dispositions légales.

Préparation des réactifs

R1 : Prêt à l'emploi.

R2 : Prêt à l'emploi.

Conservation et stabilité

Avant ouverture des flacons : entre 2 et 8°C, jusqu'à la date de péremption indiquée

R1 : 28 jours après ouverture et réfrigérés sur l'analyseur

R2 : 28 jours conservation dans les flacons ouverts placés dans le compartiment réfrigéré de l'analyseur. Protéger de la lumière.

Prélèvement et préparation des échantillons

Seuls les échantillons suivants ont été testés et peuvent être utilisés.

Sérum : recueillir le sérum sur des tubes de prélèvement standard.

Plasma : plasma recueilli sur héparinate de lithium, de sodium ou d'ammonium. Le plasma recueilli sur oxalate ou EDTA conduit à des taux de récupération par défaut.

En cas d'utilisation de tubes primaires, suivre les instructions données par le fabricant.



Fe

Fer

Stabilité⁶: 7 jours entre 15 et 25°C
3 semaines à 2-8°C
plusieurs années entre -15 et -25°C

La séparation des éléments figurés du sérum ou du plasma doit avoir lieu dans l'heure qui suit le prélèvement du sang.
Les échantillons qui contiennent un précipité doivent être centrifugés avant l'analyse.

Matériel fourni

Voir paragraphe « Réactifs - composition et concentrations »

Matériel auxiliaire nécessaire

- Calibrateur : C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), Réf. 10759350 (USA # 759350)
- Contrôles : Precinorm U, par ex. Réf. 10171743 (USA # 171743) ou Precinorm U plus, Réf. 12149435 (USA # 2149435) ; Precipath U, par ex. Réf. 10171778 (USA # 171778) ou Precipath U plus, Réf. 12149443 (USA # 2149443).
- Solution physiologique de chlorure de sodium
- Solution SMS/Acid Wash ou solution de HCl 0,2 N pour les analyseurs Roche/Hitachi (à l'exception de Roche/Hitachi 747, 747-400 et MODULAR D)
- Solution de NaOH 1 N pour Roche/Hitachi 717
- Équipement habituel de laboratoire

Mode opératoire

Pour garantir le bon fonctionnement du test, se conformer aux instructions relatives à l'analyseur utilisé indiquées dans la présente notice. Se référer au manuel d'utilisation approprié ainsi qu'aux instructions spécifiques concernant le réglage des appareils.
En cas d'utilisation de tests non validés par Roche, les performances analytiques ne sont pas garanties et doivent être définies par l'utilisateur.

Calibration

Traçabilité :⁷ la méthode a été standardisée par rapport à un matériel de référence primaire.

S1 : Solution physiologique de chlorure de sodium

S2 : C.f.a.s. (Calibrator for automated systems)

Fréquence des calibrations :

Une calibration en deux points est recommandée.

- en cas de changement de lot de réactif
- si le contrôle de qualité l'exige.

Vérification de la calibration : n'est pas nécessaire.

Contrôle de qualité

Pour le contrôle de qualité, utiliser les matériaux de contrôle indiqués dans la liste ci-dessus. D'autres contrôles appropriés peuvent également être utilisés. La fréquence des contrôles et les limites de confiance doivent être adaptées aux exigences du laboratoire. Les résultats doivent se situer dans les limites de confiance. Chaque laboratoire établira la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites de confiance.

Calcul des résultats

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon.

Facteurs de conversion : $\mu\text{mol/l} \times 5,59 = \mu\text{g/dl}$
 $\mu\text{mol/l} \times 0,0559 = \text{mg/l}$
 $\mu\text{g/dl} \times 0,179 = \mu\text{mol/l}$
 $\mu\text{g/dl} \times 0,010 = \text{mg/l}$

Limites d'utilisation - interférences^{7,8}

(Pour les U.S.A. : pour les étapes de lavage particulières, se référer aux fiches techniques spéciales pour les différents analyseurs.)

Pour éviter une contamination des dosages de ferritine et de phénytoïne II sur les analyseurs Roche/Hitachi 902, 911, 912, 917 et MODULAR P et des dosages de carbamazépine, de ferritine et de phénytoïne II sur l'analyseur Roche/Hitachi 717, activer le programme de rinçage des systèmes de pipetage après les dosages de fer en utilisant la solution SMS/Acid Wash ou une solution de HCl 0,2 N. Pour éviter une perturbation des dosages d'albumine effectués avec le test Tina-quant (Albumine) sur l'analyseur Roche/Hitachi 717 due

Roche

à une contamination provenant des cuves, activer le programme de rinçage des cuves après les dosages de fer en utilisant une solution de NaOH.
Pour éviter l'interférence des dosages de salicylate sur les dosages de fer, activer, sur les analyseurs Roche/Hitachi 717, 902, 904, 911, 912, 914, 917 et MODULAR P, le programme de rinçage après les dosages de salicylate en utilisant la solution SMS/Acid Wash ou une solution de HCl 0,2 N.
Critère d'acceptabilité : recouvrement $\pm 10\%$ par rapport à la valeur initiale.
Ictère : on n'a pas observé d'interférence significative jusqu'à un indice I de 60 (concentrations approximatives de la bilirubine conjuguée et non conjuguée : 60 mg/dl ou 1026 $\mu\text{mol/l}$).
Hémolyse : on n'a pas observé d'interférence significative jusqu'à un indice H de 80 (concentration approximative d'hémoglobine : 80 mg/dl ou 50 $\mu\text{mol/l}$). Des concentrations d'hémoglobine plus élevées conduisent à l'obtention de résultats faussement positifs dus à une contamination de l'échantillon par le fer lié à l'hémoglobine.
Lipémie (Intralipid) : on n'a pas observé d'interférence significative de la lipémie jusqu'à un indice L (pour Lipémie) de 1000. Il n'y a pas de concordance satisfaisante entre la turbidité et la concentration en triglycérides.
Chez les patients sous traitement au fer, le fer contenu dans le médicament peut gêner la réaction et conduire à l'obtention de résultats faussement bas. Dans de très rares cas, la gammopathie, en particulier de type IgM (macroglobulinémie de Waldenström), peut conduire à des résultats erronés. Pour le diagnostic, les résultats doivent toujours être confrontés aux données de l'anamnèse du patient, au tableau clinique et aux résultats d'autres examens.

Domaine de mesure

5-1000 $\mu\text{g/dl}$ (0,90-179 $\mu\text{mol/l}$)

Les échantillons dont la concentration est supérieure à la limite supérieure du domaine de mesure sont réanalysés par l'analyseur grâce à la fonction réanalyse. Si l'analyseur ne permet pas de faire des réanalyses, diluer les échantillons manuellement à l'aide de solution physiologique de chlorure de sodium, d'eau distillée ou désionisée (par ex. dans le rapport 1 + 1). Multiplier le résultat par le facteur de dilution (2 dans l'exemple).

Domaines de mesure plus étendus en cas de réanalyse sur les analyseurs de la série 900 :

Roche/Hitachi 904/911/912

jusqu'à 2000 $\mu\text{g/ml}$ (358 $\mu\text{mol/l}$)

Roche/Hitachi 917/MODULAR P/MODULAR D

jusqu'à 2140 $\mu\text{g/dl}$ (383 $\mu\text{mol/l}$)

Valeurs de référence

Sérum, plasma⁹

Hommes : 59-158 $\mu\text{g/dl}$ (10,6-28,3 $\mu\text{mol/l}$)

Femmes : 37-145 $\mu\text{g/dl}$ (6,6-26,0 $\mu\text{mol/l}$)

La concentration en fer dans le sérum et le plasma dépend de l'alimentation et est sujette à des variations nycthémérales.¹⁰

Domaines de référence (U.S.A.)⁷

Hommes : 45-160 $\mu\text{g/dl}$ (8,1-28,6 $\mu\text{mol/l}$)

Femmes : 30-160 $\mu\text{g/dl}$ (5,4-28,6 $\mu\text{mol/l}$)

Chaque laboratoire devra vérifier la validité de ces valeurs et établir au besoin ses propres domaines de référence selon la population examinée.

Performances analytiques⁷

Les performances analytiques indiquées ci-dessous sont représentatives. Les résultats obtenus au laboratoire peuvent différer de ceux-ci.

Précision

La reproductibilité a été déterminée à l'aide de sérum humain et de contrôles selon un protocole interne (n = 21). Les résultats suivants ont été obtenus :

Echantillon	Précision intra-série			Précision inter-série		
	Moyenne		CV %	Moyenne		CV %
	$\mu\text{g/dl}$	$\mu\text{mol/l}$		$\mu\text{g/dl}$	$\mu\text{mol/l}$	
Sérum humain	52	9,31	1,2	46	8,23	1,8
Precinorm U	90	16,1	0,9	93	16,6	1,1
Precipath U	132	23,6	0,8	138	24,7	0,6



Fe

Fer

Roche**Sensibilité analytique (limite inférieure de détection)**

Limite de détection : 5 µg/dl (0,90 µmol/l)

La limite de détection correspond au plus faible taux d'analyte mesurable pouvant être distingué de zéro. Elle est obtenue par le calcul et correspond au plus faible taux de la gamme de standards + 3s (standard 1 + 3s, précision intra-série, n = 21).

Comparaison de méthodes

Une comparaison de la nouvelle méthode de dosage du fer de Roche (y) avec l'ancien test (x) sur un analyseur Roche/Hitachi 917 a conduit à l'obtention des corrélations suivantes (µg/dl) :

Passing/Bablok ¹¹	Régression linéaire
y = 0,985 x + 1,915	y = 0,975 x + 2,585
τ = 0,982	r = 0,999
s(md 95) = 5,4	Sy.x = 2,8

Nombre d'échantillons analysés : 90

Les concentrations des échantillons étaient situées entre 12 et 415 µg/dl (2,15 et 74,3 µmol/l).

Bibliographie

- Wick M, Pinggera W, Lehmann P, édit. Eisenstoffwechsel, Diagnostik und Therapie der Anämien, 3^e édition. Wienne/New York: Springer-Verlag, 1996.
- Bernat I. Eisenresorption. Dans: Bernat I, édit. Eisenstoffwechsel. Stuttgart/New York: Gustav Fischer, 1981:68-84.
- Bernat I. Eisenresorption. Dans: Bernat I, édit. Eisenstoffwechsel. Stuttgart/New York: Gustav Fischer, 1981:36-37.
- de Jong G, von Dijk IP, van Eijk HG. The biology of transferrin. Clin Chim Acta 1990;190:1-46.
- Siedel J, Wahlefeld AW, Ziegenhorn J. A new iron ferrozine reagent without deproteinization. Clin Chem 1984;30:975 (AACC-Meeting Abstract).
- Use of Anticoagulants in Diagnostic Laboratory Investigations. WHO publication WHO/DIL/LAB/99.1 Rev. 2. 2002.
- Documentation de Roche Diagnostics
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-474.
- Weippl G, Pantlitschko M, Bauer P et al. Normal values and distribution of single values of serum iron in cord blood. Clin Chim Acta 1973;44:147-149.
- Einer G, Zawta B. Präanalytikfibel, 2^e édition. Leipzig/Heidelberg: Verlag AW Barth, 1991.
- Bablok W et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-790.

Réglages des appareils**Pour les U.S.A.**

Pour de plus amples informations, se référer aux fiches techniques spéciales.

Roche/Hitachi 904/911/912/917 et MODULAR

Saisir les paramètres de programmation figurant sur la disquette, la fiche de réglages ou la fiche de codes-barres.

Roche/Hitachi 717

Température : 37°C

2 PROGRAMMATION DES TESTS

TEST	[FE]	
CODE REACTION (2 POINTS)	[2]	- [24] - [30]
VOLUME ECHANTILLON (µl)	[20]	- [10]
VOLUMES REACTIF R 1 (µl)	[250]	- [100] - [NON]
VOLUMES REACTIF R 2 (µl)	[50]	- [50] - [NON]
LONGUEURS D'ONDE (nm)	[700]	- [570]
TYPE CALIBRATION	[LINEAIRE]	- [0] - [0]
ETL. (1) CONC.-POS.	[]	- []
ETL. (2) CONC.-POS.	[]	- []
ETL. (3) CONC.-POS.	[0]	- [0]
ETL. (4) CONC.-POS.	[0]	- [0]
ETL. (5) CONC.-POS.	[0]	- [0]
ETL. (6) CONC.-POS.	[0]	- [0]
LIMITE DEV. STAND.	[0.1]	
LIMITE DUPLICAT	[45]	
LIMITE SENSIBILITE	[0]	
LIMITE D.O. (CINET)	[0]	- [CROIS.]
LIMITE PROZONE	[32000]	- [SUPER]
VALEURS USUELLES	[]	- []
VALEURS D'ALERTE	[]	- []
FACTEUR INSTRUMENT	[1.00]	

___ donnée mise en mémoire par le manipulateur

Roche/Hitachi 747

Température : 37°C

4.2 PROGRAMMATION DES TESTS

TEST	[FE]	
CODE REACTION (2 POINTS)	[2]	- [22]-[28]
LONGUEURS D'ONDE (nm)	[700 (sec.)]	- [570 (princ.)]
	SERUM	URINE
VOLUME ECHAN. (µl)	[20] - [10]	[] - []
VALEURS USUELLES	[] - []	[] - []
VALEURS D'ALERTE	[] - []	[] - []
LIMITE D.O. (CR/DECR)	[0] - [CROIT]	[] - []
LIMITE PROZONE	[32000] - [SUPER]	[] - []
	R1	R2
VOLUMES REACTIFS (µl)	[250]	[50]
CYCLE D'ANCRAGE	[0]	[0]
VOLUME DE DILUTION	[0]	
TYPE CALIBRATION	[LINEAIRE]	
NBRE POINTS	[0]	
ETL. (1) CONC. RACK POS.	[] - []-[]	
ETL. (2) CONC. RACK POS.	[] - []-[]	
ETL. (3) CONC. RACK POS.	[0] - []-[0]	
ETL. (4) CONC. RACK POS.	[0] - []-[0]	
ETL. (5) CONC. RACK POS.	[0] - []-[0]	
ETL. (6) CONC. RACK POS.	[0] - []-[0]	
LIMITE DEV. STAND.	[0.1]	
LIMITE DUPLICAT	[45]	
LIMITE SENSIBILITE	[0]	
INTERVALLE D.O. ET. 1 LEVEL	[] - []	
FACTEUR INSTRUMENT	[1.00]	

___ donnée mise en mémoire par le manipulateur



Fe

Fer

Roche

Roche/Hitachi 902

n°	<Paramètre>	
1	Nom test	FE
2	Code Réaction (Méthode)	Point Final 2
3	Code Réaction (2. test)	0
4	Temps dosage	10
5	1 ^e Point de Mesure	17
6	2 ^e Point de Mesure	20
7	3 ^e Point de Mesure	0
8	4 ^e Point de Mesure	0
9	Long. d'Onde (SEC)	700
10	Long. d'Onde (PRINC)	570
11	Volume Echt	20.0
12	Volume R1	250
13	Pos. R1	
14	Taille Flaçon R1	Grand
15	Volume R2	0
16	Pos. R2	0
17	Taille Flaçon R2	Petit
18	Volume R3	50
19	Pos. R3	
20	Taille Flaçon R3	Petit
21	Type Calibration	Linéaire
22	Type Calib. (Poids)	0
23	Conc. Standard 1	0
24	Pos. Standard 1	
25	Conc. Standard 2	
26	Pos. Standard 2	
27	Conc. Standard 3	0
28	Pos. Standard 3	0
29	Conc. Standard 4	0
30	Pos. Standard 4	0
31	Conc. Standard 5	0
32	Pos. Standard 5	0
33	Conc. Standard 6	0
34	Pos. Standard 6	0
35	DO Std 1	0
36	Facteur K	10000
37	Facteur K 2	10000
38	Facteur K 3	10000
39	Facteur K 4	10000
40	Facteur K 5	10000
41	Facteur A	0
42	Facteur B	0
43	Facteur C	0
44	Limite DS	0.1
45	Limite Duplication	50
46	Limite Sensibilité	100
47	Limite DO Std 1 (Bas)	0
48	Limite DO Std 1 (Haut)	4000
49	Limite DO	0
50	Limite DO (D/I)	Croissant
51	Limite Prozone	0
52	Limite Prozone (U/D)	Inférieure
53	Prozone (Point Final)	35
54	Valeurs Usuelles (Bas)	
55	Valeurs Usuelles (Haut)	
56	Facteur Instr. (a)	1
57	Facteur Instr. (b)	0
58	Attribution Touche	

..... donnée mise en mémoire par le manipulateur

Pour de plus amples informations, se référer au manuel de l'opérateur de l'analyseur utilisé, aux fiches techniques respectives, au dossier « Product Information » et aux notices d'utilisation de tous les réactifs nécessaires.

Les modifications importantes par rapport à la version précédente sont signalées par une barre verticale dans la marge.

 Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

CE



Annexe 3 Documentation technique sur la résine Amberlite XAD-4



AMBERLITE® XAD4 Industrial Grade Polymeric Adsorbent

PRODUCT DATA SHEET

AMBERLITE XAD4 is a polymeric adsorbent, supplied as white insoluble beads. It is a non ionic crosslinked polymer which derives its adsorptive properties from its patented macroreticular structure (containing both a continuous polymer phase and a continuous pore phase), high surface area, and the aromatic nature of its surface (Figure 1). This structure gives AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent

excellent physical, chemical and thermal stability. AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent can be used through repeated cycles, in column or batch modes, to adsorb hydrophobic molecules from polar solvents or volatile organic compounds from vapor streams. Its characteristic pore size distribution makes AMBERLITE XAD4 an excellent choice for the adsorption of organic substances of relatively low molecular weight.

PROPERTIES

Matrix _____	Macroreticular crosslinked aromatic polymer
Physical form _____	White translucent beads
Moisture holding capacity ^[1] _____	54 to 60 %
Shipping weight _____	680 g/L
Specific gravity _____	1.01 to 1.03
Particle size _____	
Harmonic mean size _____	0.49 - 0.69 mm
Uniformity coefficient _____	≤ 2.0
Fines content ^[1] _____	< 0.350 mm : 5.0 % max.
Coarse beads _____	> 1.18 mm : 5.0 % max.
Maximum reversible swelling _____	see Table 1
Surface area ^[2] _____	≥ 750 m ² /g
Porosity ^[2] _____	≥ 0.50 ml/ml

^[1] Contractual value

^[2] Values based on statistical quality control (SQC)

Test methods are available on request

SUGGESTED OPERATING CONDITIONS

pH range _____	0 - 14
Maximum temperature limit _____	150°C
Minimum bed depth _____	75 cm
Flow rate _____	
Loading _____	2 to 16 BV*/h
Displacement _____	1 to 4 BV/h
Regeneration _____	1 to 4 BV/h
Rinse _____	2 to 16 BV/h

* BV (Bed Volume) = 1 m³ solution per m³ resin

PROPERTIES (CONTD.)

Figure 1 : Chemical structure of AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent

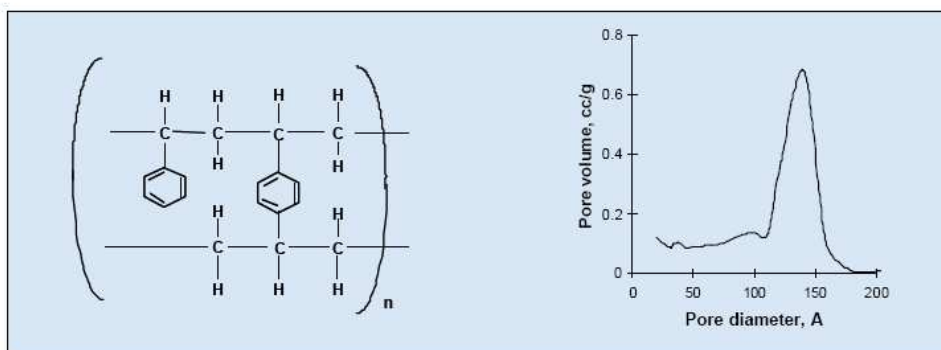


Figure 3 : Infrared Spectrum of Amberlite XAD4 polymeric adsorbent

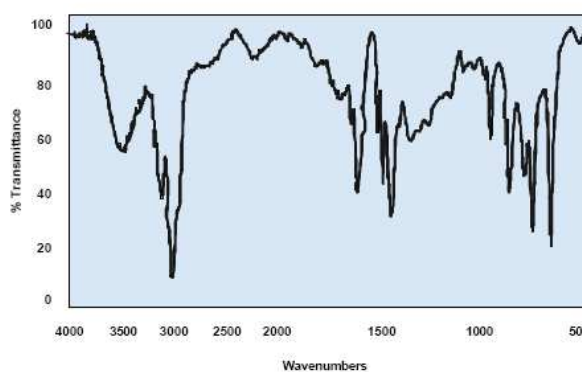


Table I: Percent swelling of Amberlite XAD4 polymeric adsorbent in various solvents (Water: Solvent)

Solvent	% Increase from as-received volume
Methanol	20
2-propanol	20
Acetone	20
p-Xylene (via methanol)	25

PRETREATMENT

AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent is shipped as a water wet product imbibed with sodium chloride (NaCl) and sodium carbonate (Na₂CO₃) salts to retard bacterial growth. These salts must be washed from the adsorbent prior to use and it is suggested that this be achieved by washing with water at a linear flowrate of 5-10 m/h until the required level is

achieved. In some sensitive applications, residual monomeric or oligomeric compounds may be required to be removed from the adsorbent. A regeneration with the proposed regenerant is also recommended prior to beginning the first service cycle. If the regenerant is an alcohol, it must be displaced with water prior to beginning the first loading cycle.

APPLICATIONS

- Removal of organic pollutants from aqueous wastes, ground water, and vapor streams.
- Removal of organic compounds from aqueous process streams and polar solvents.
- Recovery / recycle of phenolic and aromatic compounds.
- Removal of chlorinated solvents, herbicides, and pesticides from aqueous streams.
- Recovery of organic compounds in environmental and clinical analysis for subsequent identification.

REGENERANTS / ELUTING AGENTS

- Water miscible organic solvents (methanol, ethanol, acetone, isopropanol, etc.) for hydrophobic compounds.
- Pure solvents for regenerating resin fouled by oils and antifoams.
- Dilute bases (0.1 - 0.5% NaOH) for eluting weakly acidic compounds.
- Strong bases (2-4% NaOH) for regenerating resins fouled with proteins, peptides.
- Dilute acids (0.1 - 0.5% HCl) for weakly basic compounds.
- Dilute oxidising agents (< 0.5%) such as peroxide to enhance the removal of protein fouling.
- Buffer elution for pH sensitive compounds
- Water where adsorption is from an ionic solution.
- Hot nitrogen or steam for volatile materials.

FDA CLEARANCE

- AMBERLITE XAD4 polymeric adsorbent has clearance under FDA Food Additive Regulation 21 CFR 173.65 - Divinylbenzene Copolymer. The product may be used for the removal of organic substances from aqueous foods under the prescribed conditions outlined in 21CFR173.65.

HYDRAULIC CHARACTERISTICS

Figure 4 shows the bed expansion of AMBERLITE XAD4 as a function of backwash flow rate and water temperature. Figure 5 shows the pressure drop for AMBERLITE XAD4 as a function of service flow rate and water temperature. Pressure drop data are valid at the start of the service run with a clear water and a correctly classified bed.

Figure 4 : Bed Expansion

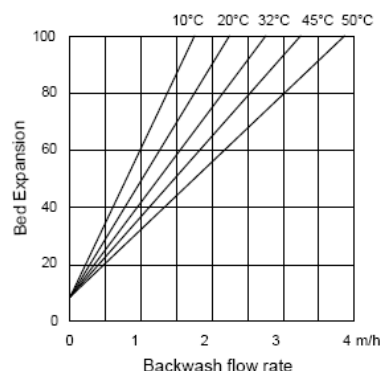
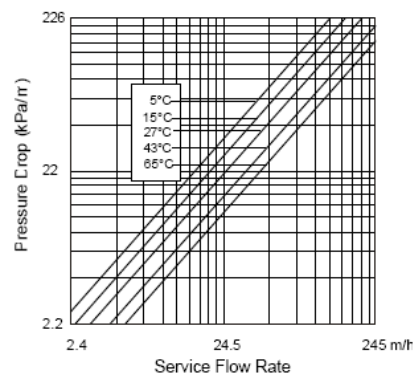


Figure 5 : Pressure Drop



Annexe 4 Table des valeurs critiques du test de Student

Degré de liberté	Risque d'erreur									
	0,50	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002	0,001	0,0001
1	1,000	3,078	6,314	12,706	31,281	63,657	127,32	318,31	636,62	6366,2
2	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,089	22,327	34,599	99,992
3	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,215	12,924	28,000
4	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610	15,544
5	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,893	6,869	11,178
6	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959	9,082
7	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408	7,885
8	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041	7,120
9	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781	6,594
10	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587	6,211
11	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437	5,921
12	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318	5,694
13	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221	5,513
14	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140	5,363
15	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073	5,239
16	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015	5,134
17	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965	5,044
18	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922	4,966
19	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883	4,897
20	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850	4,837
21	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819	4,784
22	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792	4,736
23	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,768	4,693
24	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745	4,654
25	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725	4,619
30	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646	4,482
35	0,682	1,306	1,690	2,030	2,438	2,724	2,996	3,340	3,591	4,389
40	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551	4,321
45	0,680	1,301	1,679	2,014	2,412	2,690	2,952	3,281	3,520	4,269
50	0,679	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	2,937	3,261	3,496	4,228
60	0,679	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	2,915	3,232	3,460	4,169
70	0,678	1,294	1,667	1,994	2,381	2,648	2,899	3,211	3,435	4,127
80	0,678	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	2,887	3,195	3,416	4,096
90	0,677	1,291	1,662	1,987	2,368	2,632	2,878	3,183	3,402	4,072
100	0,677	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	2,871	3,174	3,390	4,053
150	0,676	1,287	1,655	1,976	2,351	2,609	2,849	3,145	3,357	3,998
200	0,676	1,286	1,653	1,972	2,345	2,601	2,839	3,131	3,340	3,970
300	0,675	1,284	1,650	1,968	2,339	2,592	2,828	3,118	3,323	3,944
500	0,675	1,283	1,648	1,965	2,334	2,586	2,820	3,107	3,310	3,922
1000	0,675	1,282	1,646	1,962	2,330	2,581	2,813	3,098	3,300	3,906
infini	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,090	3,291	3,891

Annexe 5 Publications et travaux

Publication acceptées

Biometal 2009 « *Hydroxamate siderophores of Scedosporium apiospermum* », S. Bertrand, G. Larcher, A. Landreau, P. Richomme, O. Duval, J.-P. Bouchara

Communication Orale:

7-8 Septembre 2005, **15èmes conférences du GP2A** à Bath « *The siderophores of Scedosporium apiospermum: determination, synthesis and applications* », S. Bertrand, O. Duval, G. Larcher

7-8 Juin 2007, **ECMM ISHAM Working Group on Pseudallescheria / Scedosporium Infections** à Angers « *Siderophores of Scedosporium apiospermum: characterization and possible relation between siderophore production and pathogenicity* », S. Bertrand, G. Larcher, O. Duval and P. Richomme and J.-P. Bouchara

7-8 Juin 2009, **ISHAM Working Group on Filamentous fungi and chronic respiratory infections in cystic fibrosis** à Angers « *Siderophores, new potential marker of Scedosporium apiospermum lung colonisation of cystic fibrosis patients* », S. Bertrand, G. Larcher, O. Duval and P. Richomme and J.-P. Bouchara

Posters :

15-16 Septembre 2005, **14èmes conférences du GP2A** à Angers « *Purification and Characterisation of Siderophores from Scedosporium apiospermum, an Emerging Opportunistic Pathogenic Fungus* », S. Bertrand, O. Duval, G. Larcher, S. Mallet, P. Richomme

15 Juin 2006, **Forum des doctorants** de l'Université d'Angers, « *La Stratégie du "Cheval de Troie", De l'Histoire à la Chimie* », S. Bertrand, O. Duval, G. Larcher, **Prix « Terre des Sciences » de la Communication Scientifique et Technique**

27-28 Octobre 2006, **3èmes Journées Internationales de l'AFERP** à Rennes « *Identification of Siderophores from Scedosporium apiospermum, an Emerging Opportunistic Pathogenic fungus* », S. Bertrand, O. Duval, G. Larcher, J.-P. Bouchara, P. Richomme

13-15 September 2007, **Conférence du European Iron Club** à Londres, « *Siderophores of Scedosporium apiospermum: characterization and possible link between siderophore production and lung colonisation* », S. Bertrand, O. Duval, G. Larcher, J.-P. Bouchara, P. Richomme

1

2 Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum*

3 Samuel Bertrand · Gérald Larcher ·
4 Anne Landreau · Pascal Richomme ·
5 Olivier Duval · Jean-Philippe Bouchara

6 Received: 30 April 2009 / Accepted: 1 July 2009
7 © Springer Science+Business Media, LLC. 2009

8 **Abstract** *Scedosporium apiospermum* is an emerg-
9 ing pathogen colonizing the airways of patients with
10 cystic fibrosis and causing severe infections in
11 immunocompromised hosts. In order to improve our
12 knowledge on the pathogenic mechanisms of this
13 fungus, we investigated the production of sidero-
14 phores. Cultivation on CAS medium and specific
15 assays for different classes of siderophores suggested
16 the secretion of hydroxamates. A maximal production
17 was obtained by cultivation of the fungus at alkaline

pH in an iron-restricted liquid culture medium. 18
Siderophores were then extracted from the culture 19
filtrate by liquid/liquid extraction, and separated by 20
reverse phase high performance liquid chroma- 21
tography. Two siderophores, dimerumic acid and 22
N^z-methyl coprogen B, were identified by electro- 23
spray ionization-mass spectrometry and MS–MS 24
fragmentation. Finally, comparison of various strains 25
suggested a higher production of *N*^z-methyl coprogen 26
B by clinical isolates of respiratory origin. Studies are 27
undergone in order to determine the potential useful- 28
ness of these siderophores as diagnostic markers of 29
scedosporiosis. 30

A1 SB, GL, AL and JPB are members of the ECMM (European
A2 Confederation of Medical Mycology)/ISHAM (International
A3 Society for Human and Animal Mycology) Working group on
A4 *Pseudallescheria/Scedosporium* infections, and of the ISHAM
A5 working group on fungal respiratory infections in cystic
fibrosis.

Keywords *Scedosporium apiospermum* · 31
Hydroxamate-type siderophores · 32
N^z-methyl coprogen B · Dimerumic acid 33

A6 S. Bertrand · A. Landreau · P. Richomme · O. Duval
A7 Laboratoire des Substances Naturelles et Analogues
A8 Structuraux, UPRES-EA 921, IFR 149 QUASAV, UFR de
A9 Pharmacie et Ingénierie de la Santé, Université d'Angers,
A10 16 Bd Daviers, 49000 Angers, France

Introduction 36

A11 G. Larcher (✉) · J.-P. Bouchara
A12 Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène,
A13 UPRES-EA 3142, IFR 132, Université d'Angers,
A14 16 Bd Daviers, 49000 Angers, France
A15 e-mail: gerald.larcher@univ-angers.fr

Iron is an essential element involved in many 37
important cellular processes such as DNA synthesis, 38
respiration and detoxification of free radicals. 39
Although it is widely distributed on Earth, iron is 40
not easily accessible to microorganisms because it is 41
mainly under the ferric state (Fe³⁺) which is poorly 42
soluble in water. In order to survive, most of the 43
microorganisms have developed numerous mecha- 44
nisms to scavenge iron (Howard 1999). One of them 45

A16 G. Larcher · J.-P. Bouchara
A17 Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre
A18 Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49933 Angers
A19 cedex 9, France

46	is the secretion of siderophores which occurs when	94
47	microorganisms grow in an iron-restricted environ-	95
48	ment. These small organic molecules have a very	96
49	high affinity for iron and can create very stable	97
50	complexes with ferric iron. These complexes are	
51	more soluble in water and therefore make iron	
52	available for fungi or bacteria. In pathogenic micro-	
53	organisms, siderophores have been suggested as	
54	virulence factors since they can interact with some	
55	host iron-containing proteins like transferrin. Sidero-	
56	phores are able to remove iron from these proteins	
57	directly (Hissen et al. 2004) or in combination with a	
58	proteolytic process (Wolz et al. 1994). Furthermore,	
59	it has been demonstrated that siderophore biosynthe-	
60	sis is crucial for virulence in several human, animal	
61	or plant pathogenic microorganisms (Haas et al.	
62	2008; Johnson 2008), including the opportunistic	
63	fungus <i>Aspergillus fumigatus</i> (Schrettl et al. 2004;	
64	Hissen et al. 2005).	
65	<i>Scedosporium apiospermum</i> , formerly considered	
66	as the anamorph state of <i>Pseudallescheria boydii</i> , is a	
67	filamentous fungus encountered in polluted soil and	
68	water which may cause various infections resulting	
69	from traumatic inoculation of some soil fungal	
70	elements such as cutaneous/subcutaneous mycetoma,	
71	or from the inhalation of some airborne spores such as	
72	sinusitis and pulmonary mycetoma (Guarro et al.	
73	2006). Besides, a large study on patients suffering from	
74	cystic fibrosis (CF) showed that it ranks the second	
75	among the filamentous fungi colonizing the respiratory	
76	tract of these patients (Cimon et al. 2000). More	
77	recently, it has been described as an emerging patho-	
78	gen causing severe and often lethal infections in	
79	immunocompromised patients, particularly lung trans-	
80	plant patients (Guarro et al. 2006). Equally, numerous	
81	cases of disseminated scedosporiosis with cerebral	
82	involvement have been reported after near-drowning,	
83	resulting from haematogenous spread from a primary	
84	pulmonary site of infection (Katragkou et al. 2007).	
85	Additionally, <i>S. apiospermum</i> is a therapy-refractory	
86	pathogen since it is resistant or poorly susceptible to	
87	almost all current antifungals (Hennequin et al. 1997).	
88	For all these reasons, <i>S. apiospermum</i> is a challenging	
89	pathogen and there is an urgent need for a better	
90	understanding of the pathogenesis of scedosporiosis.	
91	Potential virulence factors have been identified in	
92	<i>S. apiospermum</i> , including a subtilisin-like serine-	
93	protease (Larcher et al. 1996) and a Cu, Zn superoxide	
	dismutase (Lima et al. 2007). This study was therefore	94
	designed to identify siderophores in <i>S. apiospermum</i>	95
	since there is now accumulated evidence for their role	96
	as virulence factors in numerous pathogens.	97
	Materials and methods	98
	Microorganisms and culture conditions	99
	<i>Scedosporium apiospermum</i> 90.4595, originally iso-	100
	lated from a broncho-alveolar fluid in the Laboratory	101
	of Parasitology-Mycology of Angers University Hos-	102
	pital, was used throughout this study. This strain was	103
	previously used for purification and characterization	104
	of a subtilisin-like serine protease (Larcher et al.	105
	1996) and a Cu, Zn superoxide dismutase (Lima et al.	106
	2007) and it was deposited at the IHM (Institute of	107
	Hygiene and Epidemiology-Mycology section) cul-	108
	ture collection (Scientific Institute of Public Health,	109
	Brussels, Belgium) under the accession number	110
	15155. According to recent taxonomic changes	111
	(Gilgado et al. 2005, 2008), this strain was identified	112
	as <i>S. apiospermum</i> sensu stricto by sequencing of the	113
	internal transcribed sequence (ITS) regions (ITS1 and	114
	ITS2) of the RNAr genes. Other strains of the	115
	<i>S. apiospermum</i> complex, listed in Table 1, were also	116
	used for some experiments. All strains were routinely	117
	maintained on yeast extract-peptone-dextrose-agar	118
	(YPDA) plates containing 0.05% chloramphenicol	119
	with incubation at 37°C for 10–15 days.	120
	Unless otherwise specified, the inocula used in this	121
	study were obtained from 7-day-old cultures on	122
	YPDA by scraping off the agar plates in sterile ultra-	123
	pure water (MilliQ Plus, $R = 18.2 \text{ mOhm cm}^{-1}$ at	124
	25°C, Millipore), followed by three washes (15,000g,	125
	5 min) of the mycelium in ultra-pure water.	126
	Siderophore detection	127
	A modification of the universal chemical assay of	128
	Schwyn and Neilands (1987) was used to detect	129
	siderophore production in an agar-based culture	130
	medium. Chrome azurol S (CAS) agar plates (Sigma	131
	Chemical) were prepared with 1/10 CAS indicator	132
	solution and 9/10 yeast morphology agar (YMA;	133
	Difco Laboratories). Plates were inoculated by central	134

Table 1 Strains of *S. apiospermum* used in this study

IHEM number	Origin	Source	Date of isolation	Country of isolation
14263	Human (CF patient)	Sputum	09/01/98	Angers, France
14451	Human (CF patient)	Sputum	24/02/98	Giens, France
14268	Human (CF patient)	Sputum	08/01/98	Giens, France
14462	Human (CF patient)	Sputum	04/03/98	Tours, France
15155	Human	Bronchial aspiration	19/09/90	Angers, France
3817	Human	Cerebrospinal fluid	1986	Rotterdam, The Netherlands
6908	Human	Cutaneous/subcutaneous mycetoma	1992	Huy, Belgium
13947	Environment	Feathers of European starlings	27/12/93	Locarn, France
20812	Environment	Soil of potted plant	17/06/05	Angers, France
20828	Environment	Soil of potted plant	16/06/04	Angers, France

spotting and then incubated for 2 weeks at 37°C. A positive reaction consisted in a color change of CAS reagent from blue to orange, leading to a clear visible red-orange halo around the fungal colony. Siderophore production was determined by measuring the diameters of the red-orange halo and of the fungal colony. Results are expressed as the CAS rates which correspond to the ratio between these two diameters.

Siderophore production

For study of the kinetics of siderophore production, *S. apiospermum* IHEM 15155 was cultivated in a liquid culture medium (LCM) consisting in a copper- and iron-depleted yeast nitrogen base (YNB)-glucose 2% (BIO101™, QBiogene) supplemented with amino acids (Complete supplement mixture, CSM, QBiogene) according to Lesuisse et al. (2001), except that pH was adjusted to different values (pH 4, 7 or 8).

Cultures were performed in 200-ml flasks containing each 50 ml of LCM. Agitation was achieved using a magnetic stirrer if indicated, and cultures were incubated at 37°C for 2–10 days. After centrifugation at 50,000g for 30 min at 4°C, the supernatant was clarified through 0.45-µm-pore size membranes, lyophilized and finally solubilized in 1 ml ultrapure water for chemical assays for siderophore detection and characterization. Results were normalized to the mycelial dry weight determined after lyophilization of the fungal pellets. All experiments were performed in triplicate and mean values (±SD) were calculated.

Chemical assays for siderophore detection and characterization

Chemical assays were performed on concentrated culture filtrates. Production of phenolate/catecholate-type siderophores was investigated by the Arnow test (Arnow 1937) and absorption at 318 nm (Young et al. 1967). Hydroxamate-type siderophores were quantified by the periodate oxidation assay (Emery and Neillands 1962) and the ferric perchlorate test (Atkin et al. 1970). Catechol, 2,3-dihydroxybenzoic acid, acetohydroxamic acid and deferoxamine B mesylate (DFB) were obtained from Sigma and used as controls.

For the ferric perchlorate test, siderophore concentration was normalized as DFB equivalent. Standard curve was obtained with DFB, using serial twofold dilutions ranging from 0.25 to 0.004 mM. Results are expressed in µmol DFB equivalent per g of fungal biomass.

Siderophore extraction

The culture filtrate was supplemented with ferric chloride 0.1% and ammonium sulfate to reach 80% saturation. After stirring overnight at 4°C, the suspension was filtered through Celite® 521 (Aldrich) which gave the crude extract.

Extraction of siderophores was performed according to the methodology of Neillands (Neillands 1952). Siderophores were extracted 6 times with 50 ml of benzyl alcohol from 1 l of crude extract. The benzyl

194 alcohol extract was then washed with 50 ml of an
195 ammonium sulfate saturated solution and finally dried
196 by anhydrous sodium sulfate. To 300 ml of the organic
197 phase, 3 l of diethylether were added and the sidero-
198 phores were extracted 10 times with 100 ml of ultra-
199 pure water. The aqueous phase was then washed with
200 100 ml of diethylether. Finally, water was evaporated
201 under reduced pressure to obtain the siderophore
202 extract.

203 HPLC–UV–Vis–ESI–MS identification

204 Siderophores were identified by high performance
205 liquid chromatography (HPLC) which was carried
206 out according to McCormack et al. (2003) using a
207 quaternary pump (Separations Module, Waters 2795)
208 and a Polymerex® RP-1 (40 × 4.00 mm, 5 µm,
209 100 Å, Phenomenex) stationary phase under a flow
210 rate of 1 ml min⁻¹. The siderophore extract was
211 solubilised in sterile ultra-pure water (1 g l⁻¹) and
212 20 µl of the obtained solution were injected in the
213 column. The mobile phase consisted in a combination
214 of 0.1% aqueous formic acid (eluent A), and 0.1%
215 formic acid methanol (eluent B). Elution was con-
216 ducted using a linear gradient starting from a mix of
217 95% eluent A/5% eluent B and ending after 20 min
218 by a mix of 5% eluent A/95% eluent B, followed by a
219 10-min elution with 5% eluent A/95% eluent B.
220 Siderophores were detected by UV–visible spectro-
221 photometry at 254 and 435 nm (Dual λ Absorbance
222 Detector, Waters 2487) and identified by positive
223 electrospray ionization mass spectroscopy (ESI+–MS
224 or ESI+–MS–MS; Esquire 300^{plus}, Bruker). The flow
225 rate into the mass spectrometer was 150 ml min⁻¹.

226 Production of siderophores by the different strains
227 studied was quantified on chromatograms obtained at
228 435 nm. Results were normalized to the mycelial dry
229 weight.

230 Results

231 Detection of siderophores on solid culture 232 medium

233 *Scedosporium apiospermum* IHEM 15155 was culti-
234 vated on CAS medium. After incubation for 2 weeks,
235 a red/orange halo appeared around the fungal colony,
236 attesting the chelation of iron in the culture medium

237 and the secretion of siderophores by the fungus
238 (Fig. 1). A red/orange halo was also observed around
239 colonies for all the other stains tested on CAS
240 medium. Slight variations were seen in the CAS rates
241 which ranged from 1.5 to 5.8, and *S. apiospermum*
242 IHEM 15155 ranked the second among all the strains
243 tested with a CAS rate value of 5.3 (data not shown).

Siderophore type determination

245 Concentrated culture filtrate from *S. apiospermum*
246 IHEM 15155 grown in LCM gave a negative reaction
247 for the Arnow test and absorption at 318 nm which
248 are specific for phenolates/cathecolates-type sidero-
249 phores. Conversely, the periodate oxidation test and
250 the ferric perchlorate test were positive, thus sug-
251 gesting the secretion of hydroxamate-type sidero-
252 phores in the culture medium, and identical results
253 were obtained for all the other strains tested.

Determination of optimum conditions for siderophore production

256 In order to obtain an optimal siderophore production
257 by *S. apiospermum*, different factors potentially influ-
258 encing its production were studied: pH, incubation



Fig. 1 Growth of *S. apiospermum* IHEM 15155 on CAS medium after 2 weeks of incubation. Note the large red-orange halo around the colony indicating iron complexation, and therefore the secretion of siderophores

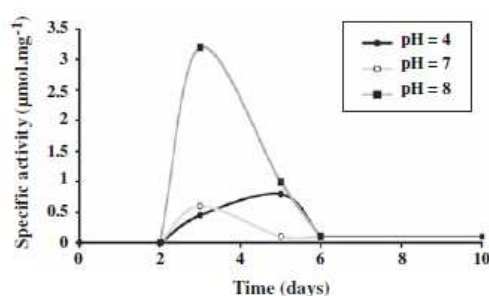


Fig. 2 Influence of culture conditions on siderophore production by *S. apiospermum* IHEM 15155

time and agitation. Figure 2 shows that siderophore secretion by *S. apiospermum* was largely influenced by pH and the duration of incubation. Increasing the pH induced a significant increase in siderophore production which was maximal at pH 8. Study of the kinetics of siderophore production showed a maximum production after 4 days of incubation, which decreased drastically at day 5.

A very weak siderophore specific activity was observed when the fungus was cultivated under agitation ($0.133 \mu\text{mol mg}^{-1}$). Cultivation of the fungus

without agitation appeared to be suitable for siderophore production since it resulted in a 20-fold higher specific activity ($2.7 \mu\text{mol mg}^{-1}$).

Siderophore identification

After extraction, siderophores were analyzed by LC-MS. The chromatogram at 435 nm showed two peaks with retention times of 3.1–4.2 and 5.7–6.2 min (Fig. 3a) corresponding to $m/z = 537.9$ and $m/z = 793.9$ (Fig. 4). The chromatograms of the extracted masses from the total ionic current fitted well with the 435 nm detection (Fig. 3). A bibliographic search for fungal siderophores showed that only two siderophores have been described with these molecular masses: dimerumic acid ($[\text{M} + \text{Fe-2H}]^+ = 537.9$) and methyl coprogen B ($[\text{M} + \text{Fe-2H}]^+ = 793.9$) (Fig. 5). MS-MS fragmentation of the $m/z = 537.9$ and $m/z = 793.9$ (Fig. 6) confirmed their identification as dimerumic acid and methyl coprogen B, respectively (Fig. 7). For this last metabolite, MS³ fragmentation of the $m/z = 648.9$ molecular ion ($m/z = 519.9$ and $m/z = 537.9$) allowed us to determine the position of the methyl substituent and to identify it as *N*²-methyl coprogen B.

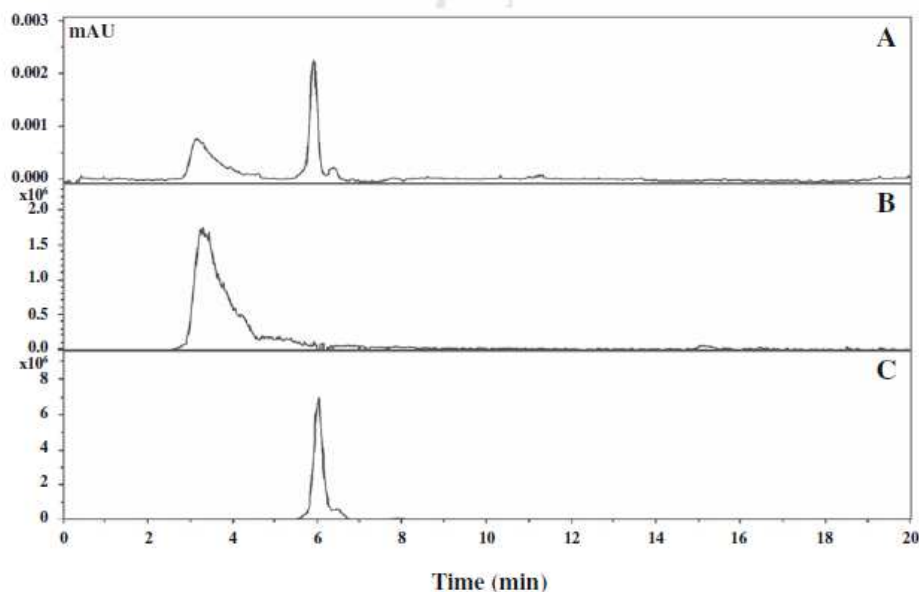


Fig. 3 RP-LC chromatograms of culture filtrate from *S. apiospermum* IHEM 15155, a Detection at 435 nm; b extracted mass for $m/z = 537.9$; and c extracted mass for $m/z = 793.9$

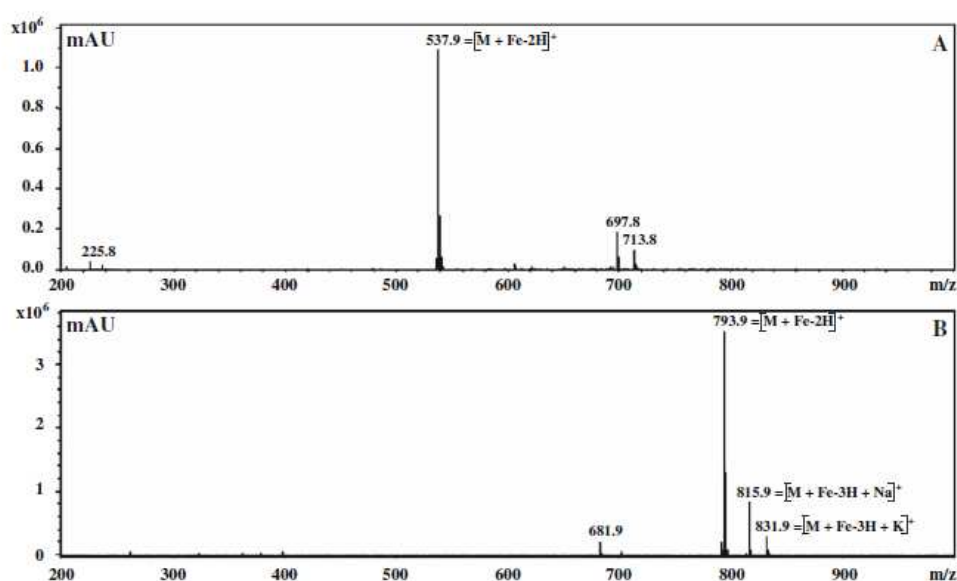
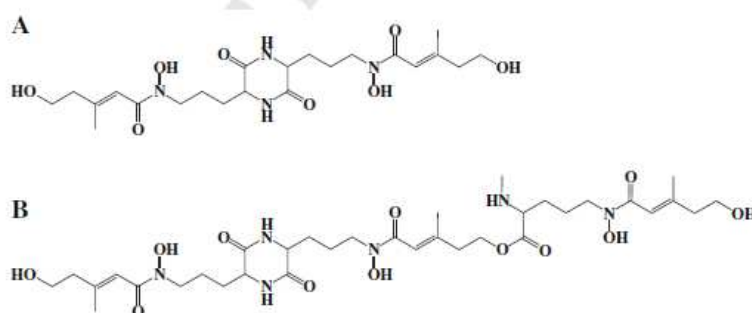


Fig. 4 ESI+-MS profiles according to peak retention time, a 3.1–4.2 min; and b 5.7–6.2 min

Fig. 5 Chemical structure of siderophores from *S. apiospermum*. a Dimeric acid; and b *N*^α-methyl coprogen B



293 Comparison of siderophore production
294 by different strains of *S. apiospermum*

295 The influence of the origin of the strain on sidero-
296 phore production was investigated by cultivating ten
297 strains of the *S. apiospermum* complex with various
298 clinical or environmental origins in LCM adjusted to
299 pH 7. Culture supernatants were analyzed by LC-UV
300 after liquid/liquid extraction of the siderophores.
301 Whereas only two strains (IHEM 14263 and 20812)
302 were found to produce dimeric acid, *N*^α-methyl
303 coprogen B was detected in the culture supernatant
304 for all the strains studied. In addition, the highest

production of *N*^α-methyl coprogen B was seen for
strains isolated from respiratory specimens and for
strain IHEM 3817 which was recovered from a
cerebrospinal fluid (Fig. 8).

Discussion

After a long period where the *S. apiospermum*
complex was considered as a causative agent of
cutaneous/subcutaneous or pulmonary mycetoma
almost exclusively, the occurrence of this fungus in
CF (Cimon et al. 2000) and a worrisome number of

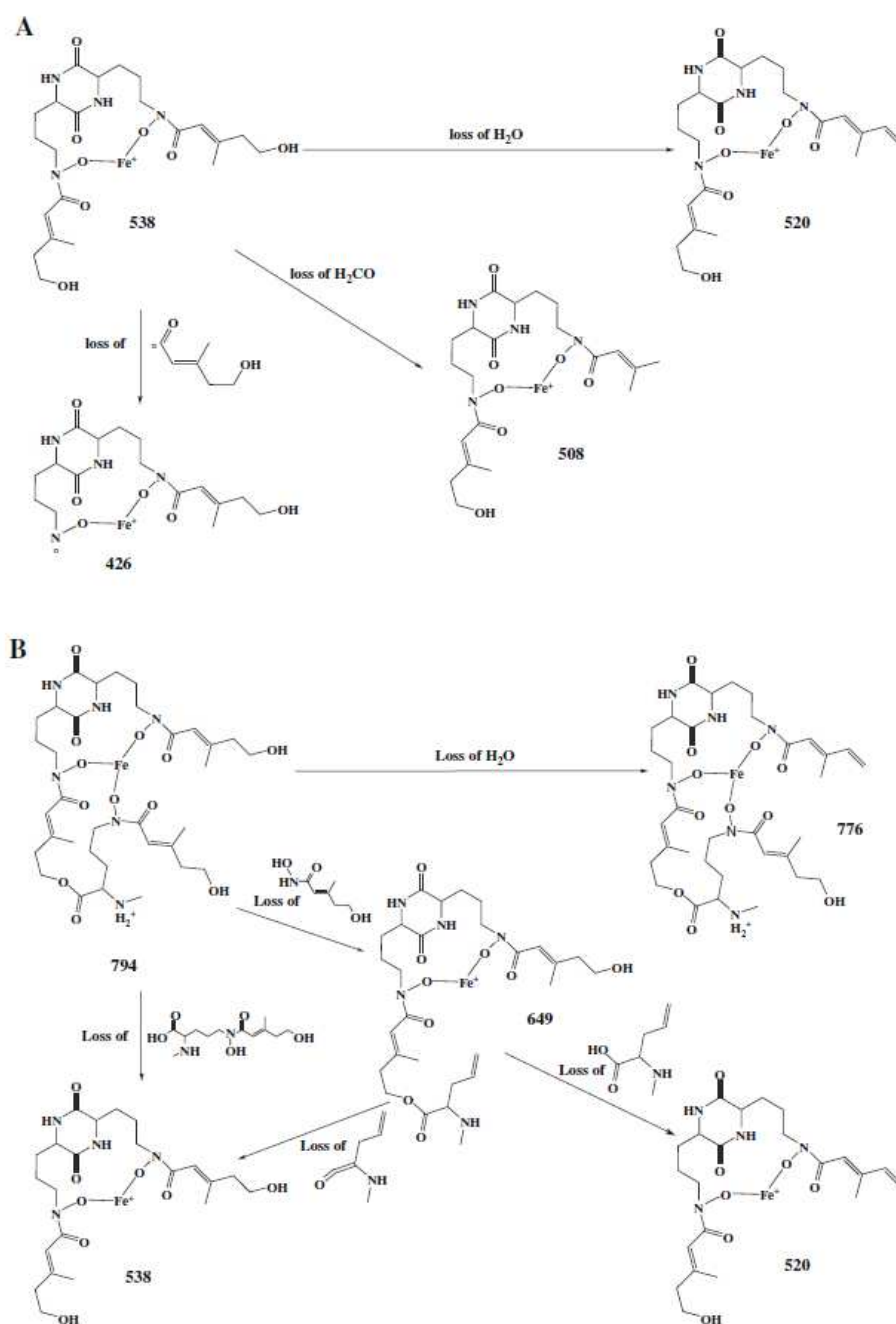


Fig. 7 Fragmentation scheme of iron chelate of dimeric acid (a) or N^2 -methyl coprogen B (b) by ESI+-MS

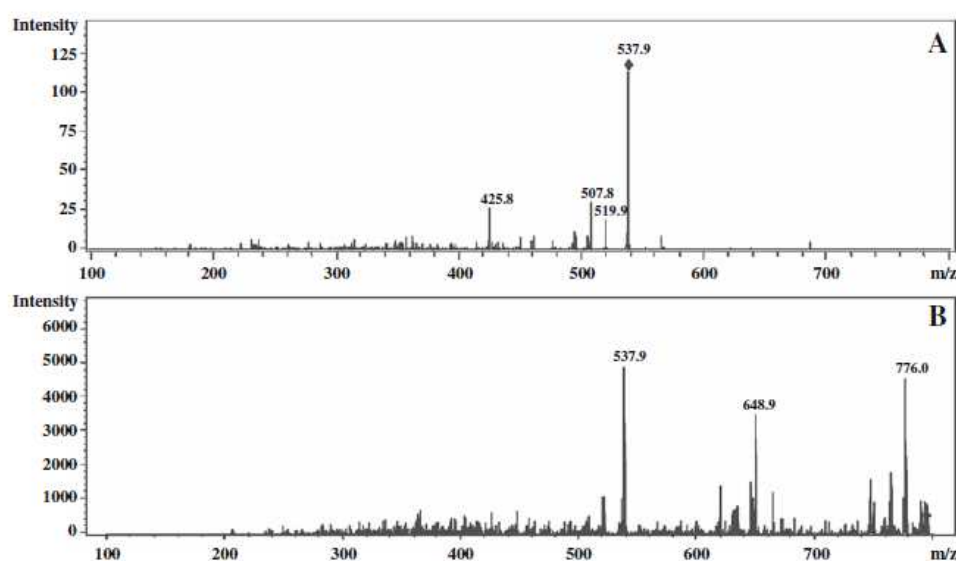


Fig. 6 ESI+-MS-MS profiles of $m/z = 537.9$ (a) and $m/z = 793.9$ (b)

problematic infections in case of corticosteroid-induced diabetes (a common complication of CF) (Guignard et al. 2008) or lung transplantation (which remains the ultimate treatment of CF patients) (Symons et al. 2006), have generated a new interest in basic research on this fungus. However, very little information are still available on the pathogenesis of scedosporiosis. Only two putative virulence factors have been identified for *S. apiospermum*, i.e. an alkaline serine-protease belonging to the subtilisin subfamily (Larcher et al. 1996) and a Cu, Zn superoxide dismutase (Lima et al. 2007) which may help the fungus to invade the host tissues and to evade the host immune response, respectively.

Iron is required for many crucial processes of the fungal physiology and knowledge in the mechanisms developed by *S. apiospermum* for iron uptake is still in infancy. As far as we know, a unique publication, mainly focused on taxonomic purposes, suggested the secretion of siderophores for *S. apiospermum* (De Hoog et al. 1994). Our results allowed a definitive demonstration of the production of siderophores by this fungus by cultivation of various strains on CAS medium and the production of a red/orange halo around the colonies which attested the

iron complexation by small molecules diffusing in the agar-based culture medium.

The optimal conditions for siderophore production by strain IHEM 15155 were then investigated. Our results showed that it was largely influenced by pH of the culture medium. Siderophore production monitored during fungal growth by the Arnou assay and normalized to the mycelial dry weight was fivefold higher at pH 8 compared to that observed at neutral or acid pH. This phenomenon is well known in other microorganisms (Neilands 1984). Under basic conditions, ferric iron is poorly soluble and forms ferric hydroxide precipitates (Raymond et al. 1984; Kraemer 2004), thus increasing iron stress and stimulating siderophore secretion. Conversely, acid conditions favor the solubility of ferric iron, facilitating iron acquisition by direct reduction mechanisms. Besides, some microorganisms release in their environment small acid molecules in order to decrease the pH and subsequently to increase iron solubility (Winkelmann 2007). At acid pH (like pH 4), iron stress is therefore lower, thus resulting in a reduced siderophore production. Agitation of the culture medium also largely influenced siderophore production since cultivation of the fungus without

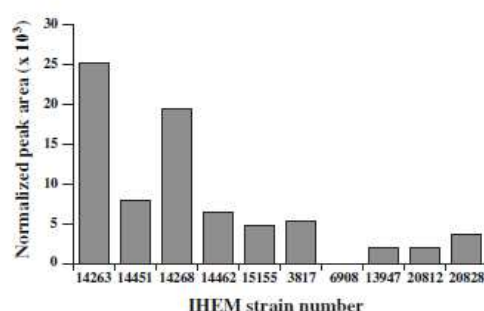


Fig. 8 Production of N^2 -methyl coprogen B by different strains of the *S. apiospermum* complex as measured by HPLC–UV after culture in LCM adjusted to pH 7 and liquid/liquid extraction

agitation resulted in a 20-fold higher production compared to that observed with continuous stirring. Same results have been reported for other putative virulence factors of *S. apiospermum* such as the subtilisin-like serine proteinase (Larcher et al. 1996). This may be related to the different metabolic pathways used for fungal growth under aerobic or anaerobic culture conditions. Under aerobic conditions, the fungal metabolism requires iron-dependent proteins (Neilands 1984), such as cytochromes of the mitochondrial respiratory chain and Fe/S proteins. In contrast, agitation results in a reduced oxygen pressure, leading to fermenting metabolism. Under these conditions, the need for iron is markedly lower, thus resulting in a low siderophore production.

Optimal conditions for siderophore production were defined as cultivation of the fungus without any agitation for 4 days at 37°C in LCM adjusted to pH 8. This result is in agreement with previous studies on other fungal pathogens showing a maximal siderophore secretion for an incubation time ranging from 2 to 7 days (Neilands 1984). Compared to the mycelial dry weight, secretion of siderophores drastically decreased after 4 days of incubation, indicating a fast growth of *S. apiospermum* after siderophore secretion. It has been observed in some bacteria belonging to the genus *Frankia* that siderophores are secreted prior to the production of extracellular proteins (Boyer et al. 1999).

Growth conditions during lung colonization in CF patients are related to the optimum culture conditions for production of siderophores by *S. apiospermum*, including low iron availability (Lamont et al. 2009),

neutral pH (Kodric et al. 2007) and aerobic conditions (stirring or not). The CF lung is also characterized by secretions with a high viscosity and a high sodium chloride concentration (Davis 2006). However, little information is available on the influence of these parameters on siderophore secretion by microorganisms colonizing the respiratory tract of CF patients. For *Bacillus subtilis*, it has been observed that an increase in sodium chloride concentration leads to a higher production of siderophores (Hoffmann et al. 2002). Moreover, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* can be detected in sputum samples from CF patients (Haas et al. 1991). Therefore, we can hypothesize that altered lung physiology in CF patients constitutes favorable conditions for siderophore production by *S. apiospermum*.

These culture conditions allowed us to characterize further the siderophores secreted by *S. apiospermum* IHEM 15155 which was conducted first by LC–MS. A bibliographic search for fungal siderophores revealed two already known siderophores for the masses detected, i. e. dimerumic acid for $m/z = 537.9$ and N -methyl coprogen B for $m/z = 793.9$ (Howard et al. 2000). These two siderophores belong to the hydroxamate class and more precisely to the family of coprogens which are secreted by several other fungi (Renshaw et al. 2002), including the Dematiaceous *Stemphylium botryosum* (Manulis et al. 1987) and the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* (Howard et al. 2000). Chemical identification of siderophores from *S. apiospermum* was in agreement with the proposed hydroxamate structure suggested from specific assays for the different classes of siderophores, since only chemical tests specific for hydroxamates were positive on concentrated culture medium. In order to confirm the identification, fragmentation of the molecules corresponding to the two masses was realized and results were compared to the proposed structures. Fragmentation patterns confirmed the identification of these siderophores as dimerumic acid and N^2 -methyl coprogen B. Detection of hydroxamate-type siderophores in *S. apiospermum* is not really surprising since it is well known that siderophores secreted by fungi principally belong to the hydroxamate class (Renshaw et al. 2002). Polycarboxylates are exclusively found in Zygomycetes (Van Der Helm and Winkelmann 1994) and strikingly, phenolates/catecholates have never been

- 447 reported in fungi. In our study, specific assays for
448 phenolates/catecholates were negative for all the
449 strains tested, in agreement with the scientific liter-
450 ature (Holzberg and Artis 1983; Renshaw et al.
451 2002).
- 452 Siderophore production by *S. apiospermum* was
453 also found to be dependent on the strain. Despite
454 slight variations in the CAS rate, comparison of ten
455 strains of the *S. apiospermum* complex with various
456 environmental or clinical origins revealed important
457 differences in the production of *N*^ε-methyl copro-
458 gen B when grown at pH 7 which is usually the pH in
459 respiratory secretions (Kodric et al. 2007). Two
460 groups were found in the ten strains studied. The first
461 group was related to lung colonization or pulmonary
462 infection since it was composed of strains IHEM
463 14263, 14451, 14268 and 14462 recovered from
464 sputum samples from patients with CF and of strain
465 IHEM 15155 isolated from a bronchial aspiration
466 from a patient with unknown predisposing factor. The
467 second group comprised three environmental strains,
468 IHEM 13947, 20812 and 20828 isolated from soil or
469 feathers of European starlings, and the strain IHEM
470 6908 which was recovered from a case of cutaneous/
471 subcutaneous mycetoma. Although preliminary, these
472 results suggest a specialization or adaptative process
473 in strains of the *S. apiospermum* complex. A high
474 production level of *N*^ε-methyl copro-
475 gen B seemed to be a common feature of strains capable of chronic
476 colonization of the airways in patients with CF or
477 involved in lung diseases. Curiously, a high produc-
478 tion level of this siderophore was also seen for strain
479 IHEM 3817 which was recovered from a cerebrospinal
480 fluid. However, CSN involvement is commonly
481 seen in disseminated scedosporiosis following a
482 primary pulmonary site of infection or colonization,
483 for examples after lung transplantation in chronically
484 colonized CF patients (Symoens et al. 2006) or after
485 near-drowning (Katrakou et al. 2007). A retrospec-
486 tive analysis of a large number of cases of scedos-
487 poriosis after near-drowning always revealed
488 preceding clinical and/or radiological evidence of
489 lung disease indicating the mode of invasion
490 (Katrakou et al. 2007). Interestingly, strains of the
491 *S. apiospermum* complex were also divided into three
492 groups by means of DNA–DNA reassociation tech-
493 niques methods (De Hoog et al. 1994). Most strains
494 belonging to group I were recovered from pulmonary
495 colonization or infections, whereas group II mainly
496 comprised clinical strains isolated from the ear, nose
497 and throat area (principally fungal sinusitis) and
498 group III was composed of environmental strains.
- 499 Together these results provide new insights into the
500 mechanisms of iron uptake by *S. apiospermum*.
501 Further studies are needed to confirm the possible link
502 between production of *N*^ε-methyl copro-
503 gen B and lung
504 colonization or infection. Additionally, this hydroxa-
505 mate-type siderophore has never been described for
506 the other microorganisms colonizing the airways of CF
507 patients. Studies are now conducted in order to
508 determine whether or not *N*^ε-methyl copro-
509 gen B could be detected directly from sputum samples and if it
510 could be used as a biological marker for pulmonary
511 infection or colonization by *S. apiospermum*.
- 512 **Acknowledgments** We thank S. Fournier from the Plateforme
513 d'Ingénierie et Analyses Moléculaires of Angers University for
514 the LC–MS measurements. During this study, Samuel Bertrand
515 was recipient of a grant from "Conseil Général du Maine et
516 Loire, France".
- 517 **References**
- 518 Amow LE (1937) Colorimetric determination of the compo-
519 nents of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures.
520 J Biol Chem 118:531–537
- 521 Atkin CL, Neilands JB, Phaff HJ (1970) Rhodotorulic acid
522 from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rho-*
523 *dotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new
524 alanine-containing ferriochrome from *Cryptococcus*
525 *melibiosum*. J Bacteriol 103:722–733
- 526 Boyer GL, Kane SA, Alexander JA et al (1999) Siderophore
527 formation in iron-limited cultures of *Frankia* sp. strain
528 52065 and *Frankia* sp. strain CeSI5¹. Can J Bot 77:
529 1316–1320
- 530 Cimon B, Carrère J, Vinatier J-F et al (2000) Clinical signifi-
531 cance of *Scedosporium apiospermum* in patients with
532 cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19:53–56
- 533 Davis PB (2006) Cystic fibrosis since 1938. Am J Respir Crit
534 Care Med 173:475–482
- 535 de Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA et al (1994)
536 Ecology and physiology of the emerging opportunistic
537 fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolifi-*
538 *cans*. Mycoses 37:71–78
- 539 Emery TF, Neilands JB (1962) Further observations concerning
540 the periodic acid oxidation of hydroxylamine derivatives.
541 J Org Chem 27:1075–1077
- 542 Gilgado F, Cano J, Gene J et al (2005) Molecular phylogeny of
543 the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of
544 two new species. J Clin Microbiol 43:4930–4942
- 545 Gilgado F, Cano J, Gene J et al (2008) Molecular and pheno-
546 typic data supporting distinct species statuses for *Sced-*
547 *osporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and
548 the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. J Clin
549 Microbiol 46:766–771

- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horr  R et al (2006) *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol* 44:295–327
- Guignard S, Hubert D, Dupont B et al (2008) Multifocal *Scedosporium apiospermum* spondylitis in a cystic fibrosis patient. *J Cyst Fibros* 7:89–91
- Haas B, Kraut J, Marks J et al (1991) Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 59:3997–4000
- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 46:149–187
- Hennequin C, Benailly N, Silly C et al (1997) In vitro susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2064–2066
- Hissen AHT, Chow JMT, Pinto LJ et al (2004) Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect Immun* 72:1402–1408
- Hissen AHT, Wan ANC, Warwas ML et al (2005) The *Aspergillus fumigatus* siderophore biosynthetic gene sidA, encoding L-ornithine N⁵-oxygenase, is required for virulence. *Infect Immun* 73:5493–5503
- Hoffmann T, Schutz A, Brosius M et al (2002) High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:718–727
- Holzberg M, Artis WM (1983) Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. *Infect Immun* 40:1134–1139
- Howard DH (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 12:394–404
- Howard DH, Rafie R, Tiwari A et al (2000) Hydroxamate siderophores of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 68:2338–2343
- Johnson L (2008) Iron and siderophores in fungal–host interactions. *Mycol Res* 112:170–183
- Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M et al (2007) *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses* 50:412–421
- Kodric M, Shah AN, Fabbri LM et al (2007) An investigation of airway acidification in asthma using induced sputum: a study of feasibility and correlation. *Am J Respir Crit Care Med* 175:905–910
- Kraemer SM (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* 66:3–18
- Lamont I, Konings A, Reid D (2009) Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Biomaterials* 22:53–60
- Larcher G, Cimon B, Symoens F et al (1996) A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem J* 315:119–126
- Lesuisse E, Blaiseau P-L, Dancis A et al (2001) Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147:289–298
- Lima OC, Larcher G, Vandeputte P et al (2007) Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu, Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes Infect* 9:558–565
- Manulis S, Kashman Y, Barash I (1987) Identification of siderophores and siderophore-mediated uptake of iron in *Stemphylium Botryosum*. *Phytochemistry* 26:1317–1320
- McCormack P, Worsfold PJ, Gledhill M (2003) Separation and detection of siderophores produced by marine bacterioplankton using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 75:2647–2652
- Neilands JB (1952) A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*). *J Am Chem Soc* 74:4846–4847
- Neilands JB (1984) Methodology of siderophores. *Struct Bonding* 58:1–24
- Raymond KN, M ller G, Matzanke BF (1984) Complexation of iron by siderophores—a review of their solution and structural chemistry and biological function. *Top Curr Chem* 123:49–102
- Renshaw JC, Robson GD, Trinci APJ et al (2002) Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycol Res* 106:1123–1142
- Schrettl M, Bignell E, Kragl C et al (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med* 200:1213–1219
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56
- Symoens F, Knoop C, Schrooyen M et al (2006) Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 25:603–607
- Van Der Helm D, Winkelmann G (1994) Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. In: Winkelmann G, Winge DR (eds) *Metal ions in fungi*. Marcel Dekker, New York, pp 39–98
- Winkelmann G (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biomaterials* 20:379–392
- Wolz C, Hohloch K, Ocaktan A et al (1994) Iron release from transferrin by pyoverdine and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 62:4021–4027
- Young IG, Cox GB, Gibson F (1967) 2,3-Dihydroxybenzoate as a bacterial growth factor and its route of biosynthesis. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj* 141:319–331